



**HAL**  
open science

# Conception, synthèse et vectorisation d'inhibiteurs potentiels de la protéine bactérienne TonB

Bénédicte Pesset

► **To cite this version:**

Bénédicte Pesset. Conception, synthèse et vectorisation d'inhibiteurs potentiels de la protéine bactérienne TonB. Biologie moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ089 . tel-01599231

**HAL Id: tel-01599231**

**<https://theses.hal.science/tel-01599231v1>**

Submitted on 2 Oct 2017

**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.



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**



**École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

# THÈSE

Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

**Discipline : Chimie Organique**

Présentée et soutenue publiquement le **27 septembre 2012** par :

**Bénédicte PESSET**

---

## **Conception, synthèse et vectorisation d'inhibiteurs potentiels de la protéine bactérienne TonB**

---

**THÈSE dirigée par :**

**M. MISLIN Gaëtan**

Chargé de Recherches au CNRS, UMR7242, IREBS, Illkirch

**RAPPORTEURS :**

**Mme Isabelle MICHAUD-SORET**

**M. Pascal SONNET**

Directrice de Recherches au CNRS, UMR5249, CEA, Grenoble  
Professeur, Université de Picardie Jules Vernes, Amiens

**AUTRE MEMBRE DU JURY :**

**M. Michel ROHMER**

Professeur, Université de Strasbourg

Équipe "Transport Membranaires Bactériens"  
Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg  
UMR7242-CNRS/ Université de Strasbourg



*à mes parents,*

*à mon frère Rémi et à ma sœur Stéphanie*



# REMERCIEMENTS

*Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg, au sein de l'équipe "Transports Membranaires Bactériens". Je tiens donc à remercier le Dr. Isabelle Schalk pour m'avoir accueillie dans son équipe.*

*Je suis reconnaissante envers la Direction Générale de l'Armement dont le financement a rendu possible la réalisation de ces travaux.*

*J'exprime toute ma gratitude au Dr. Isabelle Michaud-Soret et au Pr. Pascal Sonnet, pour avoir, en qualité de rapporteurs de ce mémoire, accepté d'examiner ce travail. Mes remerciements vont également au Pr. Michel Rohmer, qui me fait l'honneur de juger ce travail.*

*Je souhaiterais remercier l'ensemble de nos collaborateurs sur ce projet : le Dr. Roland Stote, le Dr. Annick Dejeagere, le Dr. Gabrielle Zeder-Lutz, le Dr. Patrick Gizzi, le Dr. Clarisse Maechling, le Dr. Cyril Antheaume, et toutes les autres personnes travaillant au Service Commun d'Analyses.*

*Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Gaëtan Mislin, mon directeur de thèse, pour la qualité de son encadrement scientifique et ses conseils avisés au laboratoire. Je te remercie pour la confiance et la liberté que tu m'as accordées sur ce sujet ambitieux. Tu as toujours fait en sorte que l'on puisse travailler dans de bonnes conditions, et ton sens de l'humour y a fortement contribué. Ce fut un honneur de travailler pour le Dictateur... euh Docteur Amin Al-dehyde ben Zamide !*

*Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe : le Dr. Valérie Geoffroy, Karl Brillet, Véronique Gasser, Françoise Hoegy et Emmanuel Delorme, avec qui j'ai pu partager le quotidien de la vie au laboratoire, avec tout ce que cela implique de peines et de joies. Une pensée particulière pour Claire Ferret, qui a commencé sa thèse en même temps que moi : nous avons pu vivre et partager les mêmes inquiétudes, mais nous avons souvent évoqué aussi ce que nous ferions "après", et monté nos châteaux en Espagne...*

*Je voudrais remercier les personnes qui m'ont accueillie à mon arrivée à Strasbourg : Sabrina Noël, Laurent Guillon, Laure Journet, Thibault Deloze et Kambiz Naderi. C'est avec vous que j'ai découvert le jargon des biologistes, pendant les pauses café notamment, avec vous que j'ai découvert Strasbourg et vécu des histoires abracadabrantes. Je remercie Sabrina en particulier, qui fût aussi ma tornade de labo, ainsi que Laurent, pour son humour décalé et son initiation à la chémoinformatique. Merci pour ta patience, et pour avoir gentiment prêté ton PC personnel pour le torturer avec tous les calculs de docking que nous avons lancé !*

*J'aimerais remercier chaleureusement mes collègues et amis Étienne Baco, Isabelle Pfeifer, Olivier Cunrath, Charlène Karsten, Étienne Schaeffer et Raquel Vidal-Matos, ainsi que leurs compagnons Cécile Halabi, Philippe Lonjon, Nathalie Cunrath, Mélanie Schuh et Rémy Kréder. Nous avons passé d'excellents moments ensemble, que ce soit au travail ou en dehors. Je garderai un souvenir précieux de tous ces moments : l'horoscope du midi par Mr Happy ; les discussions animées sur le football, ou la découverte de la culture portugaise avec Raquel ; Étienne et Mélanie, les rois de l'improvisation (vive Anti Maux Roses !) ; Olivier, habité par cette mystérieuse force du 32, l'instigateur des apéros-doctorants et des Kinder-Fridays, l'optimisme à l'état pur ; Isabelle, ma coloc de labo, discrète mais toujours attentionnée, la reine du muffin multicolore ; la générosité de Cécile et Étienne, qui peut se cacher derrière une quiche d'anniversaire ; Charlène, une joyeuse petite pile électrique qui reste pragmatique dans l'adversité ; les soirées au Korrigan, les apéros Mõlkky... la liste est longue ! Merci à vous pour tous ces bons moments !*

*Bien sûr, que serait Strasbourg sans ma petite Anne-Marie ! Ma petite Auvergnate (^\_^) rencontrée aux Doctoriales, on a fait un bout de chemin ensemble depuis... Je te remercie tout simplement pour avoir été là au quotidien. Merci également à Éric, Seb, Mathieu, David, et Jamel, qui n'étaient jamais loin pour répondre à l'appel d'une petite bière et décompresser, ainsi que pour votre naturel grain de folie qui fait de ces soirées passées ensembles des moments mémorables !*

*Une tendre pensée à mon amie Valérie, toujours présente, même si la distance nous sépare : tu as été mon soleil du sud-ouest pendant ces trois années ! Je suis heureuse que tu aies trouvé le bonheur avec Benoît...*

*Je ne serais sans doute pas arrivée au bout de ces trois années sans le soutien précieux de ma deuxième famille : Steph, Seb, Laurène, Nanal, Loki, Max, Agathe, PY, Angel et Léandre, le petit dernier. Nous avons vécu ensemble de grands moments de bonheur et de partage, mais aussi des jours plus sombres. Un mélange qui explique sans doute la force de notre amitié. Vous m'avez entourée de votre chaleur et de vos rires pendant chacun de nos week-ends, qui resteront mythiques ! Je ne vous remercierai jamais assez pour ça. Nanal, où que tu sois à présent, continue à veiller sur nous.*

*Enfin, à ceux qui occupent depuis toujours une place privilégiée dans mon cœur, à mon frère et à ma sœur, ainsi qu'à mes parents, je vous dis simplement : merci. Je n'y serais pas arrivé sans vous, votre soutien et votre amour indéfectibles.*





# ABRÉVIATIONS

AAAE	:	<i>Aryl Acid Adenylating Enzyme</i>
ABC	:	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADN	:	Acide desoxyribonucléique
4-AMP	:	4-Aminométhylpipéridine
APTS	:	Acide <i>p</i> -toluènesulfonique
ARN	:	Acide ribonucléique
Bbc	:	But-2-ynylbioxycarbone
Boc	:	<i>t</i> -Butylcarbone
Cbz	:	Benzylcarbone
CLHP	:	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
DBF	:	Dibenzofulvène
DIPEA	:	Diisopropyléthylamine
DMAP	:	Diméthylaminopipéridine
DMF	:	Diméthylformamide
EDCI	:	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
FDA	:	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	:	9-Fluorenylméthoxycarbone
FP	:	Polarisation de fluorescence
Gp	:	Groupe protecteur
GST	:	<i>Glutathione S-transferase</i>
HBTU	:	Hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyl-uronium
HOBt	:	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazole
HSQC	:	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IMDAF	:	<i>Intramolecular Diels-Alder reaction of Furans</i>
ITC	:	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
Lf	:	Lactoferrine
LPS	:	Lipopolysaccharides

MCR	:	<i>Multi-Components Reaction</i>
ME	:	Membrane Externe
MI	:	Membrane Interne
MM/PBSA	:	<i>Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
NRPS	:	<i>Non-Ribosomal Peptide Synthetase</i>
OPOE	:	Octylpolyoxyéthylène
PBP	:	<i>Periplasmic Binding Protein</i>
Pch	:	Pyochéline
pmf	:	<i>proton motive force</i>
Pvd	:	Pyoverdine
quant.	:	quantitatif
Rdt	:	Rendement
RL	:	Réactif de Lawesson
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	:	<i>Root-Main Square Deviation</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SM(HR)	:	Spectrométrie de Masse (Haute Résolution)
SPR	:	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TAEA	:	Triaminoéthylamine
TBAF	:	Fluorure de tétrabutylammonium
Tf	:	Transferrine
TFA	:	Acide trifluoroacétique
THF	:	Tétrahydrofurane
TME	:	Transporteur de Membrane Externe
Tpseoc	:	2-(Triphénylsilyl)éthoxycarbonyle

# TABLE DES MATIÈRES

<b>DES BACTERIES ET DES HOMMES...</b>	<b>1</b>
<b>I. LES BACTERIES : DES ORIGINES DE LA VIE A LA MENACE INFECTIEUSE.....</b>	<b>3</b>
A. GENERALITES .....	3
1. <i>Historique</i> .....	3
2. <i>Structure cellulaire</i> .....	4
3. <i>Interactions avec l'être humain et pathologies bactériennes</i> .....	5
B. LES ARMES BACTERIOLOGIQUES .....	6
1. <i>De l'usage des bactéries sur les champs de batailles</i> .....	6
2. <i>Le risque bioterroriste aujourd'hui</i> .....	7
<b>II. LES ANTIBIOTHERAPIES ACTUELLES.....</b>	<b>10</b>
A. QU'EST CE QU'UN ANTIBIOTIQUE ?.....	10
B. MODES D'ACTION DES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES.....	13
1. <i>Les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane</i> .....	13
2. <i>Les inhibiteurs de la synthèse protéique</i> .....	15
3. <i>Les inhibiteurs de la transcription ou de la réplication de l'ADN</i> .....	20
C. L'APPARITION DE SOUCHES ANTIBIORESISTANTES.....	22
1. <i>Généralités</i> .....	22
2. <i>Les mécanismes de résistances aux antibiotiques</i> .....	24
<b>LES MECANISMES BACTERIENS D'ACQUISITION DU FER : UNE CIBLE POUR DE NOUVELLES STRATEGIES ANTIBIOTIQUES ?.....</b>	<b>29</b>
<b>I. LE FER : GENERALITES.....</b>	<b>31</b>
A. D'OU VIENT LE FER ? .....	31
B. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	31
C. UN ELEMENT ESSENTIEL A LA VIE, MAIS PEU BIODISPONIBLE .....	32
<b>II. L'ASSIMILATION DU FER CHEZ LES BACTERIES A GRAM NEGATIF .....</b>	<b>34</b>
A. ASSIMILATION DU FER FERREUX PAR DIFFUSION PASSIVE.....	35
B. TRANSPORT DU FER FERRIQUE .....	36
1. <i>Les différentes sources de fer et leur assimilation</i> .....	37
2. <i>Mécanisme général du transport TonB-dépendant</i> .....	45

<b>LA MACHINERIE TONB EN TANT QUE CIBLE BIOLOGIQUE : ETAT DE L'ART .....</b>	<b>61</b>
<b>I. TONB, UNE CIBLE BIOLOGIQUE PROMETTEUSE .....</b>	<b>63</b>
A. TONB : UNE PROTEINE CRUCIALE POUR LA PROLIFERATION BACTERIENNE .....	63
B. TONB : UNE PROTEINE TRES CONSERVEE .....	64
C. TONB : UNE PROTEINE RARE DANS LES CELLULES BACTERIENNES .....	64
D. TONB : UNE PROTEINE EXCLUSIVEMENT BACTERIENNE .....	65
<b>II. INHIBITION DE TONB : DONNEES PRELIMINAIRES .....</b>	<b>66</b>
A. INHIBITION PAR SUREXPRESSION DE PROTEINES DANS LE PERIPLASME .....	66
B. INHIBITION DE L'INTERACTION TONB-TME PAR DES PEPTIDES .....	68
<b>CONCEPTION ET SYNTHESE D'INHIBITEURS POTENTIELS DE LA PROTEINE TONB .....</b>	<b>71</b>
<b>I. INHIBITEURS NON COMPETITIFS DE TONB .....</b>	<b>73</b>
A. A LA RECHERCHE D'UN SITE DE LIAISON POTENTIEL CHEZ <i>E. COLI</i> .....	73
B. UNE CAVITE CONSERVEE .....	75
C. ETUDE DYNAMIQUE DE LA CAVITE .....	76
<b>II. INHIBITEURS COMPETITIFS DE TONB .....</b>	<b>78</b>
A. CONCEPTION .....	78
1. <i>Etude de l'interaction TonB-boîte TonB des transporteurs de membrane externe</i> .....	78
2. <i>Définition de la séquence de la chaîne peptidique</i> .....	86
3. <i>Fonctionnalisation de la chaîne peptidique avec un hétérocycle</i> .....	88
4. <i>Amarrage préliminaire des molécules conçues</i> .....	90
B. SYNTHESE DES INHIBITEURS POTENTIELS DE TONB .....	92
1. <i>Synthèse peptidique</i> .....	92
2. <i>Synthèse des ancres hétérocycliques</i> .....	106
<b>EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES INHIBITEURS POTENTIELS DE TONB .....</b>	<b>121</b>
<b>I. GENERALITES .....</b>	<b>123</b>
A. NOTRE ORGANISME MODELE : <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	123
B. EVALUATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE TONB : ETAT DE L'ART .....	125
<b>II. MISE AU POINT D'UN TEST D'AFFINITE <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>126</b>
A. CALORIMETRIE ISOTHERME A TITRATION (ITC) .....	127
1. <i>Principe</i> .....	127
2. <i>Résultats</i> .....	128

B.	POLARISATION DE FLUORESCENCE.....	129
1.	<i>Principe</i> .....	129
2.	<i>Résultats</i> .....	131
C.	RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPR).....	136
1.	<i>Principe</i> .....	136
2.	<i>Résultats</i> .....	137
<b>III.</b>	<b>TESTS D'ACTIVITES <i>IN CELLULO</i> : PERSPECTIVES .....</b>	<b>146</b>
	<b>VECTORISATION D'ANTIBIOTIQUES PAR LA PYOCHELINE.....</b>	<b>149</b>
<b>I.</b>	<b>VECTORISATION D'ANTIBIOTIQUE PAR LES SIDEROPHORES .....</b>	<b>151</b>
A.	PRINCIPE GENERAL .....	151
B.	LES SIDEROMYCINES .....	152
C.	LES CONJUGUES SIDEROPHORE-ANTIBIOTIQUE SYNTHETIQUES ET HEMISYNTHETIQUES.....	154
<b>II.</b>	<b>LA PYOCHELINE .....</b>	<b>156</b>
A.	GENERALITES .....	156
B.	SYNTHESE TOTALE ET ASPECTS STEREOCHIMIQUES.....	157
<b>III.</b>	<b>VECTORISATION D'ANTIBIOTIQUES PAR LA PYOCHELINE : ETAT DE L'ART.....</b>	<b>160</b>
A.	VECTORISATION D'ANTIBIOTIQUES PAR UNE PYOCHELINE FONCTIONNALISEE EN POSITION C5 .....	160
B.	VECTORISATION DE FLUOROQUINOLONES PAR UNE PYOCHELINE FONCTIONNALISEE EN POSITION N3" .....	163
<b>IV.</b>	<b>SYNTHESE DE CONJUGUES PYOCHELINE-ANTIBIOTIQUES : TRAVAUX DE THESE.....</b>	<b>164</b>
A.	SYNTHESE DE LA PYOCHELINE FONCTIONNALISEE EN POSITION N3" .....	166
B.	SYNTHESE DU LINEZOLIDE ET DE SES ANALOGUES .....	169
C.	SYNTHESE DU BRAS ESPACEUR .....	171
D.	PERSPECTIVES : ASSEMBLAGES DES CONJUGUES PYOCHELINE-ANTIBIOTIQUES .....	172
	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>175</b>
	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>181</b>
	<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>189</b>
<b>I.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES INFORMATIQUES .....</b>	<b>191</b>
A.	CARACTERISATION DE LA CAVITE IDENTIFIEE DANS TONB .....	191
B.	ETUDE MOLECULAIRE DYNAMIQUE DE L'INTERACTION TONB-FHUA .....	192

C. AMARRAGE MOLÉCULAIRE .....	192
<b>II. PROCOLES DE SYNTHES ET DONNEES ANALYTIQUES ET SPECTRALES .....</b>	<b>193</b>
A. PROCEDURES GENERALES .....	194
B. PROCOLES DE SYNTHESE ET CARACTERISATION DES PRODUITS .....	198
<b>III. MATERIELS ET METHODES BIOLOGIQUES .....</b>	<b>231</b>
A. ITC.....	231
B. POLARISATION DE FLUORESCENCE.....	231
C. SPR.....	234
<b>ANNEXES .....</b>	<b>237</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>243</b>

# **Des bactéries et des Hommes...**





# I. Les bactéries : des origines de la vie à la menace infectieuse

## A. Généralités

### 1. Historique

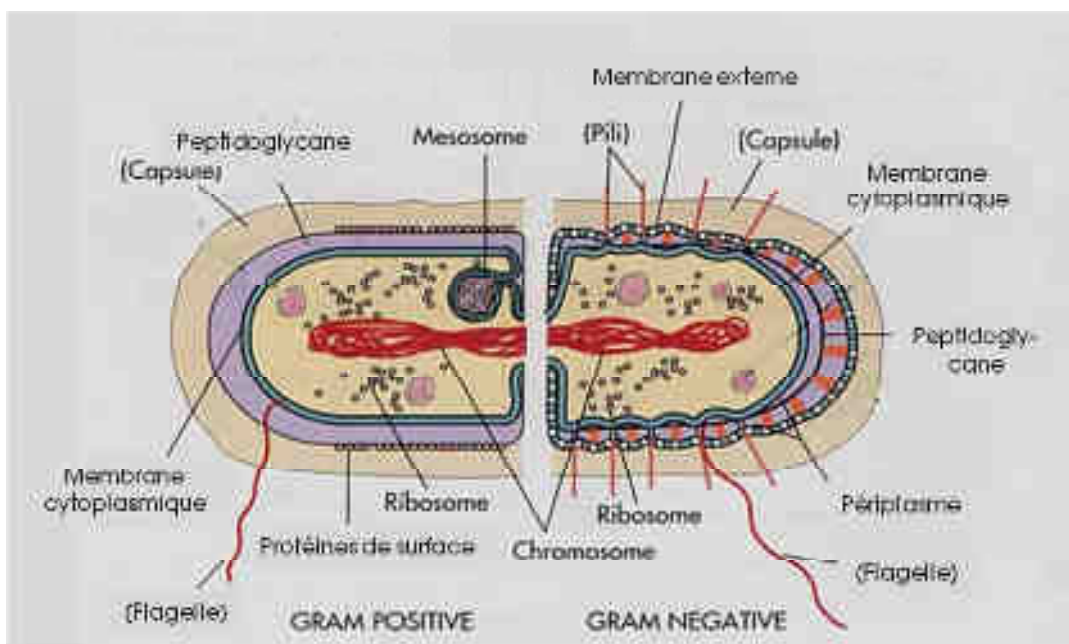
Les bactéries sont les premiers êtres unicellulaires apparus il y a environ 3,8 milliards d'années dans les fonds sous-marins.<sup>0</sup> Elles ont depuis colonisé tous les types de biotopes et se sont parfaitement intégrées dans les cycles biogéochimiques comme celui du carbone ou de l'azote dont elles sont devenues l'une des clefs de voûte.

Les bactéries furent observées pour la première fois par Antoine van Leeuwenhoek en 1676, grâce à un microscope de sa fabrication.<sup>1</sup> Il baptisa ces organismes "animalcules". Il faudra attendre 1828 et le microbiologiste Ehrenberg pour voir apparaître le mot "bactérie", qui provient du mot grec signifiant bâtonnet. La détection et l'identification de bactéries par la coloration de Gram a été inventée à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Paul Ehrlich.<sup>2</sup>

Depuis leur découverte, les hommes se sont attelés à étudier les bactéries afin de pouvoir en maîtriser l'utilisation. Les travaux de Louis Pasteur ont constitué une réelle avancée dans ce domaine. L'identification du pouvoir pathogène de certaines bactéries a entraîné la mise en place de mesures d'hygiène individuelles et collectives, ainsi que du procédé de pasteurisation dans l'industrie alimentaire. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Robert Koch démontra clairement que les bactéries pouvaient être responsables d'une maladie infectieuse. Il faudra toutefois attendre 1928 pour que le premier antibiotique, la pénicilline, soit découvert par Alexander Flemming. Aujourd'hui, les hommes utilisent couramment les bactéries dans l'industrie agroalimentaire, dans le traitement des déchets, ou dans la production de composés chimiques tels que des antibiotiques, des vaccins, des hormones ou des bases nucléotidiques.<sup>3</sup>

## 2. Structure cellulaire

Les bactéries sont des cellules procaryotes : ces organismes unicellulaires ne contiennent ni noyau, ni organites. Elles se distinguent par leur morphologie (cocci, bâtonnet, spirillum), leur relation vis-à-vis de l'oxygène (aérobie/anaérobie), et leur réaction à la coloration de Gram (positive/négative). Cette dernière permet de diviser les bactéries en deux groupes selon la composition de leur paroi cellulaire. Les bactéries à coloration de Gram positive possèdent une paroi cellulaire contenant un peptidoglycane épais, alors que celles à coloration de Gram négative présentent un peptidoglycane fin localisé dans le périplasma, entre la membrane cytoplasmique et une membrane cellulaire externe (Figure 1). Le peptidoglycane assure la rigidité de la paroi. Celle-ci donne sa forme à la bactérie et la protège à la fois des éléments extracellulaires toxiques et de l'éclatement sous l'effet de la pression osmotique du cytosol.



**Figure 1 :** Structures de bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les structures entre parenthèses ne sont pas présentes chez toutes les bactéries. Modifiée d'après : <http://micro.digitalproteus.com/morphology2.php>.

Certaines bactéries sont dotées d'une protection supplémentaire : elles peuvent se protéger de la phagocytose en s'entourant d'une fine couche de polysaccharides appelée capsule. Elles peuvent également disposer d'un flagelle pour se déplacer dans l'environnement.<sup>4</sup>

Certaines bactéries peuvent même fabriquer des endospores afin de résister à un stress environnemental ou chimique.<sup>5</sup>

Le cytoplasme contient quant à lui de nombreux compartiments où se déroulent tous les processus métaboliques nécessaires à la survie de la bactérie.<sup>6</sup> Il contient également l'information génétique, qui se présente sous la forme d'ADN circulaire chromosomique et extra-chromosomique appelés plasmides. Le génome bactérien est relativement variable : les bactéries sont capables de s'adapter rapidement à leur environnement par mutation génétique ou en acquérant de nouveaux gènes par transfert entre les membres d'une même espèce ou d'espèces différentes.<sup>7, 8</sup>

### **3. Interactions avec l'être humain et pathologies bactériennes**

Au cours de l'évolution, les bactéries ont été amenées à interagir avec de nombreux êtres vivants, dont l'être humain. Les hommes vivent en effet en symbiose avec certaines bactéries commensales. Les microorganismes composant la flore intestinale, par exemple, contribuent à la digestion des aliments et à la production de nutriments essentiels, mais nous protègent aussi d'infections pouvant être provoquées par des bactéries pathogènes.<sup>9</sup>

Néanmoins, les bactéries constituent l'un des plus grands périls auquel l'espèce humaine soit confrontée. Les maladies infectieuses ont joué jusqu'au XX<sup>ème</sup> siècle un rôle non négligeable dans l'histoire de l'humanité, en représentant la plus grande cause de mortalité et en occasionnant des épidémies qui ont notablement changé le cours de l'histoire. La découverte des antibiotiques a radicalement changé cet état de fait. À la fin des années 70, les antibiotiques apparaissaient même comme une arme absolue contre les infections d'origine bactérienne. Or, à l'heure actuelle, l'apparition croissante de microorganismes résistants aux antimicrobiens est devenue particulièrement préoccupante. Les microorganismes ont trouvé de nouveaux biotopes et se sont notamment développés dans les hôpitaux sous la forme d'infections nosocomiales, représentant un risque accru d'infections pour des patients déjà fragilisés.

En outre, les microorganismes pathogènes peuvent aussi être utilisés par l'Homme à mauvais escient, comme arme biologique. En effet, si l'utilisation de l'atome dans un but

militaire ou la production d'armes chimiques sont coûteuses et peuvent-être détectées, la production de bactéries comme arme biologique nécessite peu de moyens et peut s'organiser dans des sites plus restreints pouvant échapper à l'observation satellite. Les bactéries pathogènes ont ainsi été utilisées très tôt dans les conflits qui ont émaillé l'histoire de nos sociétés.

## **B. Les armes bactériologiques**

### **1. De l'usage des bactéries sur les champs de batailles**

L'utilisation des microorganismes comme arme biologique est bien plus ancienne qu'il n'y paraît. Il y a plus de 2000 ans, les archers scythes plongeaient les pointes de leurs flèches dans du purin ou des cadavres d'animaux putréfiés pour accroître l'efficacité mortelle de leurs armes. En 1344, à court d'arguments militaires « classiques », les Mongols décidèrent d'anéantir la ville de Caffa en Crimée en catapultant des cadavres de pesteux par delà les murailles. Ravagée par la maladie, la ville qui résistait depuis plusieurs années, tomba en quelques semaines aux mains des assaillants. Cet acte fût aussi à l'origine de la seconde épidémie de peste noire qui a ravagé le continent européen en provoquant la mort de plus de 20 millions de personnes.<sup>10</sup>

Au XX<sup>ème</sup> siècle, la meilleure connaissance des agents infectieux a permis d'étudier et de fabriquer des armes contenant des agents biologiques. Lors de la première guerre mondiale, les Allemands auraient utilisé les agents de la maladie du charbon et de la morve, *Bacillus anthracis* et *Burkholderia mallei*, afin d'infecter les animaux affectés au transport des troupes et de matériel des armées ennemies.<sup>11</sup> Pendant la seconde guerre mondiale, des programmes de préparation d'armes biologique ont été mis en œuvre par les États-Unis, le Canada, la Grande-Bretagne et le Japon. Des armes biologiques auraient été utilisées par les Japonais sur au moins 11 villes chinoises, en contaminant l'alimentation, l'eau, ou par aérosolisation à partir d'avions. On estime ainsi que plusieurs milliers de Chinois auraient été tués par l'utilisation d'armes biologiques au cours de la seconde guerre mondiale.<sup>11</sup> À la fin de la guerre, il fût confirmé que le centre de recherche militaire japonais expérimentait, entre autres, la maladie du charbon, la dysentérie, le choléra et la peste sur des prisonniers de guerre. Ces effroyables révélations incitèrent paradoxalement de nombreux pays à

poursuivre leurs programmes, quitte à polluer des sites entiers avec des agents pathogènes. Finalement, en 1969, le président Nixon annonça que les États-Unis renonçaient officiellement à l'usage des armes biologiques. Cette annonce fût suivie par la ratification par 140 pays, dont les États-Unis et l'URSS, du traité de non-prolifération des armes biologiques en 1972, lors de la convention de Genève.<sup>12</sup>

À cette époque, les armes biologiques semblaient définitivement bannies des arsenaux militaires. Néanmoins, à la fin des années 80, après l'effondrement des pays communistes, des observateurs de l'OTAN constatèrent que le traité de 1972 n'avait absolument pas été respecté par le pacte de Varsovie. En 1979, une aérosolisation accidentelle de spores de *Bacillus anthracis* dans un laboratoire militaire à Sverdlovsk, en URSS, fit une centaine de victimes dans le village voisin.<sup>13</sup> L'effondrement de l'URSS et le démantèlement anarchique de structures telles que le Centre de Recherches Militaires de Virologie et de Biotechnologies de Novosibirsk a conduit à la disparition inquiétante d'échantillons bactériens. Ces échantillons ont pu tomber dans les mains de terroristes qui pourraient en faire usage. Ainsi, plus récemment, en octobre 2001, l'envoi par courrier de lettres contenant des spores de *B. anthracis* a été responsable de 22 cas de maladie du charbon sur le territoire américain. Ces événements ont fait apparaître au grand jour la possibilité d'utiliser des agents infectieux à des fins terroristes, et ont montré que des moyens de dissémination originaux (ici, le courrier) pouvaient être employés dans ce but.

## 2. Le risque bioterroriste aujourd'hui

### a) Généralités

Le bioterrorisme peut être considéré comme une arme de désorganisation massive. Il est défini par l'utilisation intentionnelle, ou la menace d'emploi, d'organismes vivants quelle que soit leur nature, ou de substances dérivées de ces organismes, avec pour objectif de provoquer une maladie ou la mort de l'homme, d'animaux ou de plantes. La mortalité et la morbidité liées à un tel acte peuvent s'étaler dans le temps, d'autant plus que l'agent infectieux utilisé est contagieux.

Les agents de bioterrorisme peuvent être disséminés par différentes voies : par aérosolisation, qui consiste à diffuser des agents infectieux *via* les climatiseurs, par épandage ou par dispersion explosive, par contamination alimentaire et par voie cutanée.<sup>14</sup>

Les pathogènes susceptibles d'être utilisés par les bioterroristes ont été classés par les CDC (Centers for Disease Control) aux États-Unis en trois catégories : A, B, C.<sup>15</sup> La catégorie A représente le risque le plus élevé et intègre les microorganismes qui pourraient poser des problèmes majeurs en terme de dissémination, de contagion, de mortalité, ou de santé publique. Ils sont susceptibles de causer des réactions de panique et nécessitent donc une attention ou une préparation particulière pour pouvoir faire face au problème. La catégorie B inclut des microorganismes plus difficiles à disséminer, dont le taux de mortalité est plus faible, ou qui nécessitent des conditions de culture plus complexes. Ces agents nécessitent tout de même une surveillance et des capacités diagnostiques spécifiques. La catégorie C regroupe les maladies émergentes et les organismes génétiquement modifiés. Ces derniers représentent un risque particulier dans la mesure où ils peuvent avoir acquis de nouvelles propriétés, comme par exemple la sécrétion d'une toxine, une résistance aux antibiotiques ou aux vaccins traditionnels, une capacité renforcée de résistance environnementale, une modification rendant impossible leur détection par les techniques standards, etc.

#### b) Exemples de bactéries utilisables comme arme bactériologique

Bien que des modifications génétiques pourraient faire de n'importe quelle bactérie une arme redoutable, certains pathogènes sont plus susceptibles d'être utilisés par les bioterroristes. Comme nous l'avons mentionné précédemment, *Bacillus anthracis* a déjà prouvé son efficacité à semer la terreur en 2001 aux États-Unis. *Yersinia pestis* fait également partie des agents pathogènes les plus surveillés. Ne formant pas de spores, cet agent serait moins facile à disséminer par voie aérienne que le bacille du charbon, mais le retour de la peste dans notre société moderne ne manquerait pas de déclencher une importante vague de panique.

Un autre agent, moins connu, est celui de la tularémie. *Francisella tularensis*, un coccobacille à Gram négatif, est l'une des bactéries les plus infectantes : l'inoculation ou l'inhalation de 10 bactéries est suffisante pour infecter un être humain.<sup>16</sup> Cette bactérie de catégorie A

faisait notamment partie des organismes choisis pour le programme d'étude d'armes bactériologiques de l'URSS.<sup>14</sup>

La brucellose est une zoonose de catégorie B due à une bactérie du genre *Brucella*, un coccobacille à Gram négatif. Trois espèces prédominent : *Brucella melitensis*, l'espèce la plus pathogène, la plus invasive et la plus répandue dans le monde, *Brucella abortus* et *Brucella suis*. En France, *Brucella* atteint essentiellement les ruminants (bovins, caprins, ovins), qui constituent le réservoir.<sup>17</sup> L'intérêt de cet agent comme arme biologique réside dans le fait qu'une transmission aérosolisée est possible : l'inhalation de 10 à 100 bactéries suffit à provoquer la maladie chez l'Homme.<sup>14</sup>

Enfin, la morve, mais surtout la mélioïdose sont des infections particulièrement redoutées, dues à *Burkholderia mallei* et *B. pseudomallei* respectivement. La morve infecte essentiellement le cheval, et a été éradiquée d'Amérique du Nord, d'Australie et de la majeure partie de l'Europe grâce aux mesures de surveillance et d'abattage des animaux infectés ainsi que par les restrictions frontalières.<sup>11</sup> La mélioïdose est endémique au sud-est de l'Asie et au nord de l'Australie. La maladie est difficile à diagnostiquer à cause de la variété des symptômes, et est extrêmement difficile à éradiquer.<sup>18</sup> La mélioïdose pouvant rester sous forme dormante pendant des années, une attaque à *B. pseudomallei* aurait l'effet d'une bombe à retardement, dont l'issue serait fatale pour la plupart des patients.<sup>19</sup>

Cette liste d'agents bactériologiques utilisables dans le cadre d'attaques terroristes n'est malheureusement pas exhaustive. La difficulté majeure rencontrée par les autorités dans ce type d'attaque est le problème du diagnostic. L'aérosolisation des agents infectieux provoquera bien souvent une pneumonie, une éruption cutanée ou une atteinte neurologique, rendant l'identification de l'agent en cause difficile. Pendant ce temps, l'isolement des patients sera nécessaire pour éviter toute contagion. Enfin, il faudra évaluer la susceptibilité de l'agent bactériologique aux antibiotiques. Bien entendu, il faudra trouver en parallèle l'origine de l'infection et prendre des mesures adaptées en matière de décontamination. Pendant tout ce laps de temps, les populations civiles pourraient être en proie à la panique, désorganisant ainsi la société à différents niveaux. Cet effet secondaire pourrait en fait s'avérer plus nuisible que les effets directs de l'attaque bactériologique.



A l'orée du XXI<sup>ème</sup> siècle, la menace biologique a donc changé de visage. Aujourd'hui, le risque de contamination des troupes sur les théâtres d'opération en situation de guerre coexiste désormais avec l'utilisation d'armes bactériologiques dans le cadre d'attentats visant les populations civiles. Cette menace est prise très au sérieux au niveau international et des protocoles standards ont été mis en place afin de détecter le plus rapidement possible toute attaque de ce genre, identifier l'agent utilisé, et appliquer des mesures thérapeutiques adaptées. La production, à l'échelle d'une population, de sérum ou de vaccins nécessite une prise en charge à long terme, incompatible avec l'urgence que représente une dissémination volontaire de bactéries pathogènes. En première intention, et en l'absence de données claires sur la bactérie impliquée, le traitement curatif et prophylactique est fondé sur l'utilisation d'antibiotiques.<sup>11, 14</sup> Les différentes familles d'antibiotiques actuellement disponibles, ainsi que leur mode d'action vont maintenant être présentés succinctement.

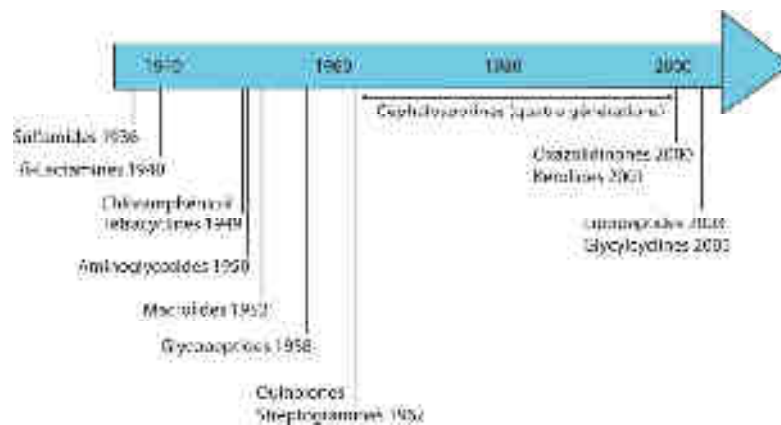
## II. Les antibiothérapies actuelles

### A. Qu'est ce qu'un antibiotique ?

La découverte des antibiotiques (du grec *anti* "contre" et *bios* "la vie") a bouleversé la médecine et la démographie. Les antibiotiques offrent des traitements efficaces contre la plupart des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Combinés à la vaccination, ils ont largement contribué à la disparition de grandes maladies épidémiques, telles que la tuberculose, la peste, le typhus, la lèpre, etc. En l'espace d'un demi-siècle, les antibiotiques ont augmenté de plus de dix ans l'espérance de vie de ceux qui y ont accès, soit plus qu'aucun autre traitement.<sup>11</sup> Le terme "antibiotique" fut proposé en 1941 par Selman Waksman pour désigner "*toute substance chimique produite par un microorganisme capable d'inhiber le développement ou de détruire d'autres microorganismes en solution diluée*".<sup>20</sup>

A l'aube du XX<sup>ème</sup> siècle et jusque dans les années 50, les antibiotiques étaient des molécules naturelles produites par des champignons, comme la pénicilline produite par *Penicillium notatum*, ou par des bactéries, comme la streptomycine, le chloramphénicol et l'érythromycine produits par des bactéries du genre *Streptomyces*.<sup>21, 22</sup> Ces organismes produisent des substances antibiotiques dans le but d'éliminer les bactéries concurrentes

dans leur biotope. Les sulfamides sont les premiers composés synthétiques dont l'action antibiotique a été découverte en 1936 par Gerhard Domagk.<sup>21, 23</sup> Dans les années 1950-1960, de nouveaux antibiotiques synthétiques ou semi-synthétiques sont apparus, comme les quinolones.<sup>24</sup> Après les années 1970, la recherche sur les antibiotiques à large spectre s'est fortement ralentie, l'arsenal thérapeutique du moment permettant alors de traiter efficacement la plupart des infections bactériennes. Seuls des antibiotiques optimisés et dérivés de classes de molécules existantes ont été commercialisés à cette époque. C'est le cas des céphalosporines (dérivés des  $\beta$ -lactamines) ou des cétolides (dérivés de macrolides).<sup>25</sup> Cependant, l'apparition de résistances de plus en plus nombreuses, l'émergence d'infections nouvelles et la réapparition de pathologies anciennes nous rappellent qu'aucune famille d'antibiotiques à large spectre n'a été mise sur le marché ces 40 dernières années, et qu'un effort d'innovation est nécessaire pour continuer à lutter efficacement contre les infections bactériennes (Figure 2).<sup>26</sup>

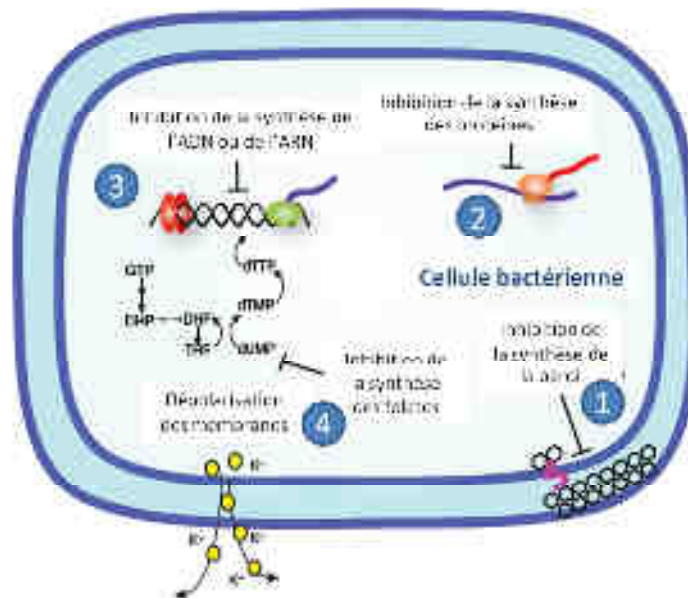


**Figure 2 :** Apparition, par ordre chronologique, des différentes classes d'antibiotiques en usage thérapeutique chez l'être humain. Adaptée de Walsh *et al.*<sup>27</sup>

Le principe d'action des antibiotiques consiste à bloquer sélectivement une étape d'un mécanisme essentiel à la survie ou à la multiplication des microorganismes. Les antibiotiques peuvent donc être "bactéricides", c'est-à-dire avoir une action toxique directe en tuant la bactérie, ou "bactériostatique" en bloquant la prolifération bactérienne.

Bien que la pharmacopée actuelle soit constituée d'une centaine d'antibiotiques différents, le nombre de cibles biologiques qu'ils atteignent reste limité à une quinzaine, et leurs mécanismes d'action se distribuent en quatre catégories (Figure 3) :

- (1) Les inhibiteurs de la biosynthèse du peptidoglycane :  $\beta$ -lactamines/ céphalosporines, glycopeptides, fosfomycine.
- (2) Les inhibiteurs de la synthèse protéique : aminoglycosides, tétracyclines, macrolides, cétolides, glycylyclines, oxazolidinones, lincosamides, phénicolis.
- (3) Les inhibiteurs de la transcription ou de la réplication de l'ADN : quinolones, fluoroquinolones.
- (4) Plus récemment, des composés agissant sur le métabolisme de l'acide folique ou qui détruit l'intégrité des membranes cellulaires (polymyxine, lipopeptides, peptides antimicrobiens).<sup>27</sup>



**Figure 3** : Principales cibles biologiques des antibiotiques actuels. Adaptée d'après Clatworthy *et al.*<sup>28</sup>

Nous allons maintenant passer en revue les modes d'action des différents antibiotiques actuels préconisés en cas d'attaque bactériologique : les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les oxazolidinones et les quinolones. Quelques exemples d'antibiotiques, reconnus comme les plus efficaces dans ce contexte, viendront illustrer le propos.

## B. Modes d'action des principaux antibiotiques

### 1. Les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

Les bactéries sont protégées de l'environnement extérieur par une paroi, qui est composée d'une couche de peptidoglycane plus ou moins épaisse. Le peptidoglycane est un polymère qui assure la solidité de l'enveloppe bactérienne et le maintien de la forme de la cellule contre la pression osmotique. Ce polymère est composé de sucres et d'acides aminés. Il est constitué d'une alternance de monomères composés d'une unité acide *N*-acétylmuramique (MurNAc) et d'une unité *N*-acétylglucosamine (GlcNAc). Une chaîne pentapeptidique (L-Ala-D-Glu-m-DAP-D-Ala-D-Ala) est connectée par une liaison éther à l'hydroxyle de la position 3 du MurNAc (Figure 4).

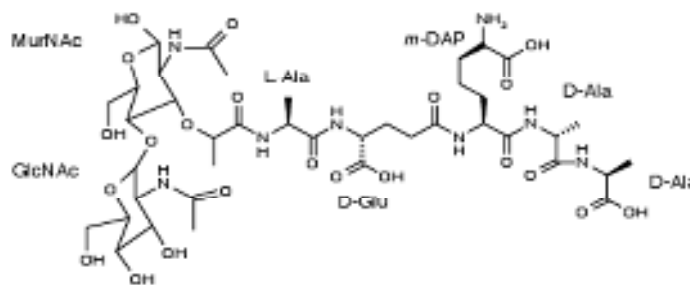
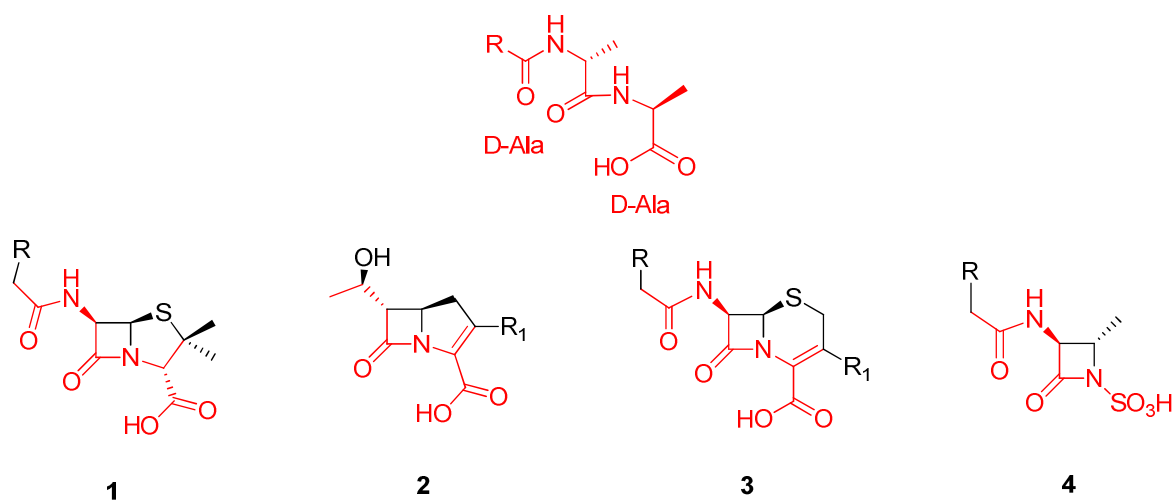


Figure 4 : Structure du monomère du peptidoglycane.

Ces monomères glycosidiques sont synthétisés dans le cytoplasme puis transportés à travers la membrane cytoplasmique. Les monomères sont tout d'abord associés entre eux par des réactions de transglycosidation de type  $\beta$ -1,4 pour créer des chaînes glycanes linéaires. Ensuite, des réactions de transpeptidation permettent de réticuler le peptidoglycane en établissant une liaison covalente entre deux chaînes peptidiques voisines. Cette réticulation confère sa solidité à la membrane bactérienne. Cette réaction est catalysée par une transpeptidase, la PBP (*penicillin binding protein*) qui reconnaît le motif D-Ala-D-Ala de la chaîne glycanes. Il existe un ensemble d'antibiotiques qui, en bloquant certaines étapes de la biosynthèse du peptidoglycane, fragilise fortement l'enveloppe externe des bactéries.<sup>29</sup> Ces dernières deviennent alors très sensibles à des stress extérieurs (pression osmotique, température, stress mécanique) pouvant provoquer la lyse cellulaire.

Les  $\beta$ -lactamines, qui inhibent la PBP, sont les inhibiteurs de la biosynthèse du peptidoglycane les plus connus.<sup>22</sup> Il existe plusieurs familles de  $\beta$ -lactamines, ayant comme point commun le cycle  $\beta$ -lactame dont l'intégrité est indispensable à l'activité antibactérienne. La nature des substituants autour de ce cycle caractérise les différents groupes de  $\beta$ -lactamines dont les plus emblématiques sont les pénicillines **1**, les carbapénèmes **2**, les céphalosporines **3**, et les monobactames **4**. L'activité des  $\beta$ -lactames provient de leur capacité à mimer le groupement D-Ala-D-Ala terminal des monomères ou des chaînes glycanes du peptidoglycane (Figure 5).



**Figure 5 :** Structures des principales familles de  $\beta$ -lactamines : pénicilline **1**, carbapénème **2**, céphalosporine **3** et monobactame **4**. Le motif structural mimant le dipeptide D-Ala-D-Ala est coloré en rouge.

Ces antibiotiques agissent comme des inhibiteurs suicides. Les  $\beta$ -lactamines peuvent servir de substrats de la PBP pendant la synthèse du peptidoglycane.<sup>30</sup> La sérine du site actif de l'enzyme s'additionne sur le carbonyle du cycle lactame. Contrairement à ce qui se passe avec le substrat naturel, il se forme un complexe acyle-enzyme covalent qui s'hydrolyse lentement, à une vitesse négligeable par rapport à la durée d'une génération bactérienne. L'enzyme active n'est donc pas régénérée suffisamment rapidement pour catalyser efficacement la biosynthèse du peptidoglycane (Figure 6).<sup>31</sup>

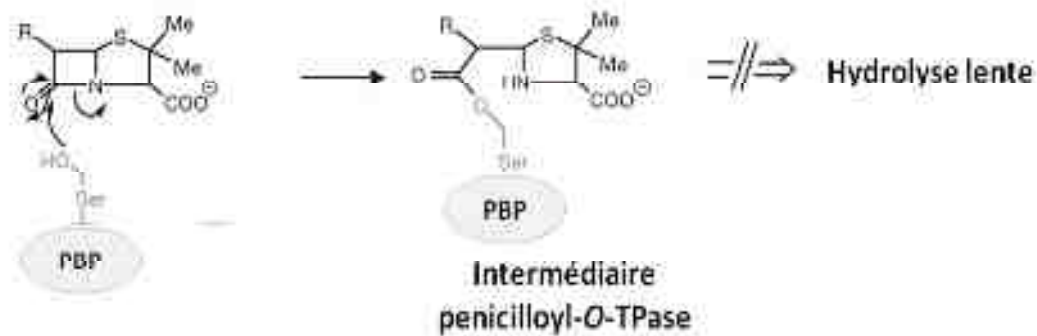


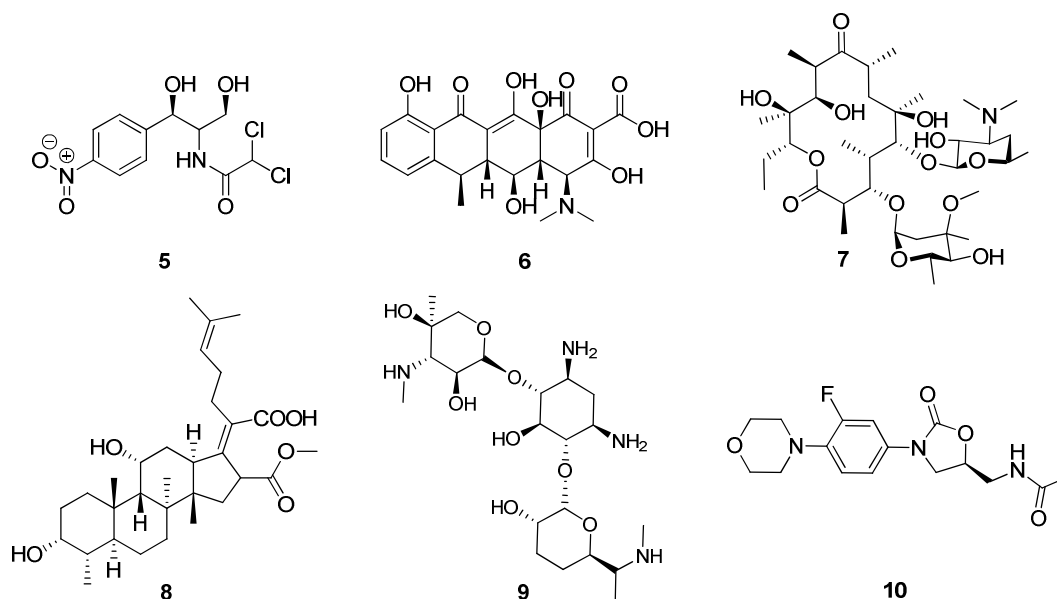
Figure 6 : Mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines. Adaptée de Walsh et *al.*<sup>31</sup>

La synthèse du peptidoglycane ralentie, la solidité de l'enveloppe se trouve compromise, ce qui accroît la perméabilité des membranes et induit progressivement le processus de lyse bactérienne.

## 2. Les inhibiteurs de la synthèse protéique

La synthèse des protéines est un processus essentiel des cellules vivantes catalysé par les ribosomes. Le fonctionnement de cette machinerie est sensiblement différent dans les cellules procaryotes et eucaryotes, ce qui explique l'efficacité et la sélectivité des antibiotiques qui la ciblent.

Les antibiotiques sont capables de bloquer la biosynthèse des protéines à différentes étapes. La plupart de ces molécules interagissent avec l'ARN ribosomique alors que d'autres bloquent la traduction en inhibant l'action des facteurs de traduction associés au ribosome. Parmi ces antibiotiques, les phénicolés, tel que le chloramphénicol **5**, bloquent la formation de la liaison peptidique ; les cyclines, comme la doxycycline **6**, et les macrolides, tels que l'érythromycine **7**, bloquent l'élongation de la chaîne polypeptidique ; l'acide fusidique **8** bloque la translocation du ribosome sur l'ARN messager ; les aminoglycosides (ou aminosides), dont fait partie la gentamycine **9**, induisent des erreurs dans le processus de traduction de l'ARN messager ; et les oxazolidinones, dont le linézolide **10** est le premier représentant, inhibent l'association des deux sous-unités ribosomales 30S et 50S (Figure 7).



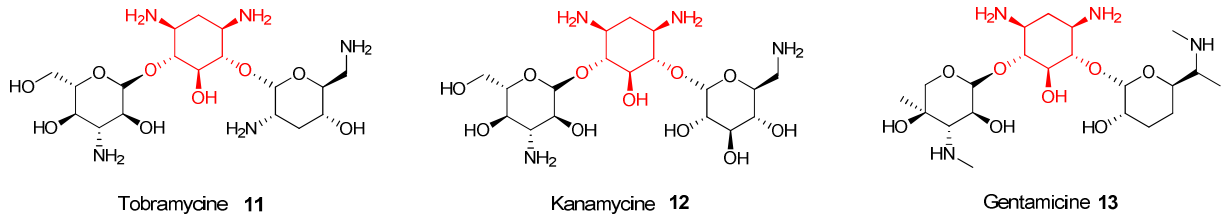
**Figure 7** : Exemples représentatifs des familles d'antibiotiques inhibant la synthèse des protéines chez les bactéries : le chloramphénicol **5**, la doxycycline **6**, l'érythromycine **7**, l'acide fusidique **8**, la gentamycine **9** et le linézolide **10**.

Parmi ces différentes classes d'antibiotiques, les aminoglycosides sont des antibiotiques à large spectre très puissants, et les oxazolidinones constituent la dernière classe d'antibiotiques mise sur le marché. Nous allons donc nous intéresser plus particulièrement à ces agents antibactériens.

#### a) Les aminosides

Les aminosides ont été les premiers antibiotiques découverts dans le cadre de criblages systématiques de produits naturels ayant des activités antibactériennes. En 1944, Waksman isola la streptomycine à partir de cultures bactériennes.<sup>21</sup> La streptomycine était alors le premier antibiotique efficace contre *Mycobacterium tuberculosis*. Au cours des décennies suivantes, beaucoup d'autres aminoglycosides (kanamycine, gentamycine, tobramycine) furent introduits et confirmèrent l'utilité de cette classe d'antibiotiques, notamment pour le traitement des infections aux bactéries à Gram négatif. Dans les années 70, les hémisynthèses des aminoglycosides dibekacine, amikacine et netilmicine ont démontré la possibilité d'obtenir des composés actifs contre des souches ayant développé une résistance envers les aminoglycosides classiques.<sup>32, 33</sup>

La structure générale des aminosides s'articule autour d'un cycle central aminocyclitol relié par des ponts glycosidiques à des sucres aminés. La tobramycine **11**, la kanamycine **12**, et la gentamicine **13** font partie des aminosides les plus puissants (Figure 8).

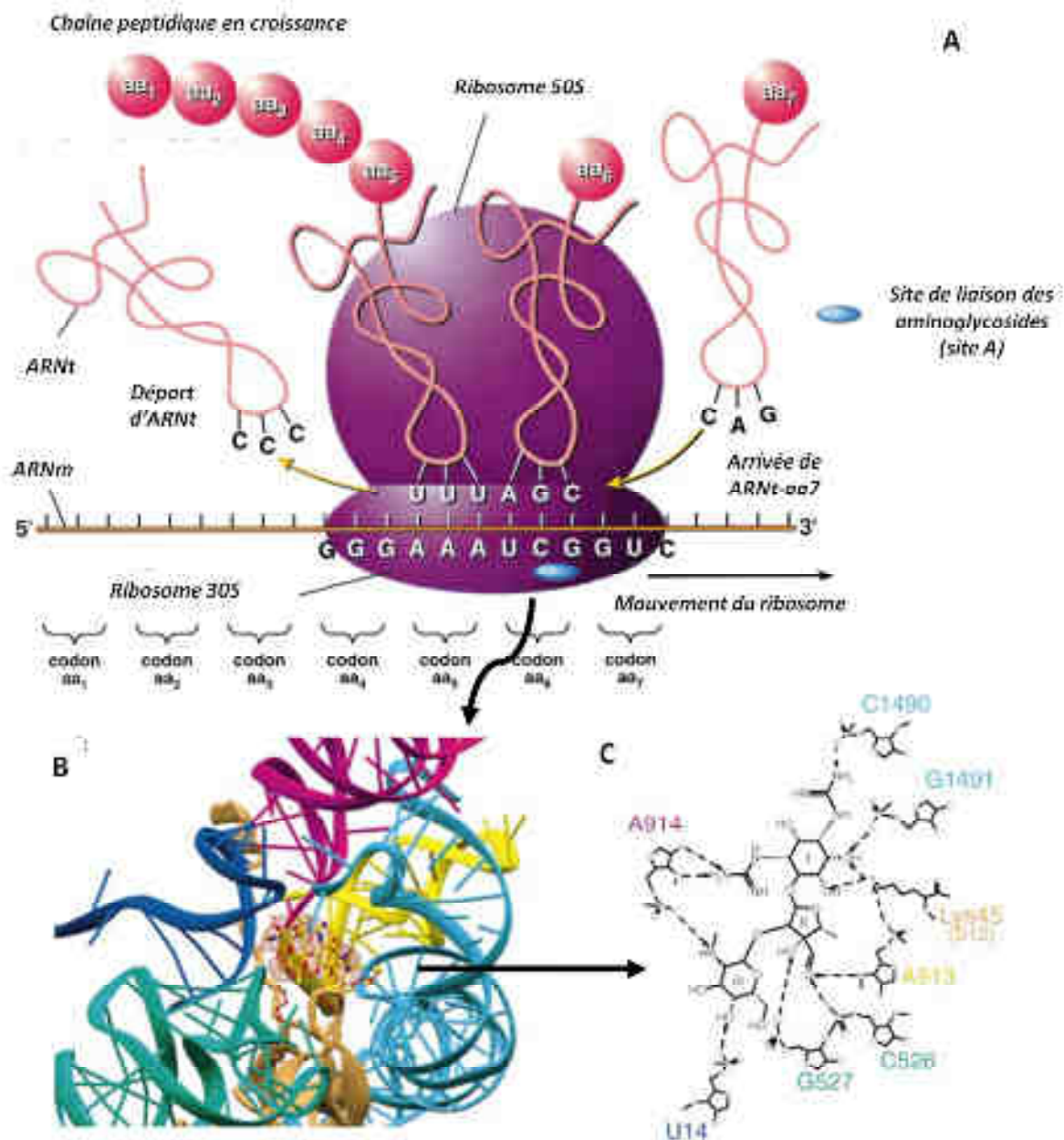


**Figure 8** : Structure de la tobramycine **11**, de la kanamycine **12** et de la gentamicine **13**. Le cycle aminocyclitol est coloré en rouge.

Le mécanisme d'action des aminosides repose sur leur pénétration dans le cytoplasme des bactéries où se localise leur cible, le ribosome. Ils ont pour cible principale la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ils se fixent sur l'ARN ribosomique (ARNr) 16S, sur le site accepteur des ARNt aminoacylés, appelé site A (Figure 9.A). Des études cinétiques et cristallographiques ont montré que les aminoglycosides se lient au site A grâce à des ponts salins et des liaisons hydrogène qui stabilisent une conformation locale particulière de la sous-unité 30S (Figures 9.B et 9.C).<sup>34</sup>

Cette stabilisation fausse le mécanisme de lecture de l'ARNm à traduire, favorisant ainsi une mauvaise incorporation d'acides aminés dans les protéines en cours de synthèse et une accumulation de protéines incorrectement traduites dans la bactérie.<sup>32, 35, 36</sup> Certaines de ces protéines vont endommager les membranes plasmiques en formant des pores qui favorisent une entrée non-contrôlée et irréversible d'ions mais aussi d'aminoglycosides dans la bactérie. Rapidement, la perturbation de la composition ionique intracellulaire s'accroît et l'augmentation du nombre de molécules d'aminoglycosides dans la cellule finit par provoquer l'inhibition de tous les ribosomes et l'arrêt de la synthèse des protéines, conduisant ainsi à la mort bactérienne.

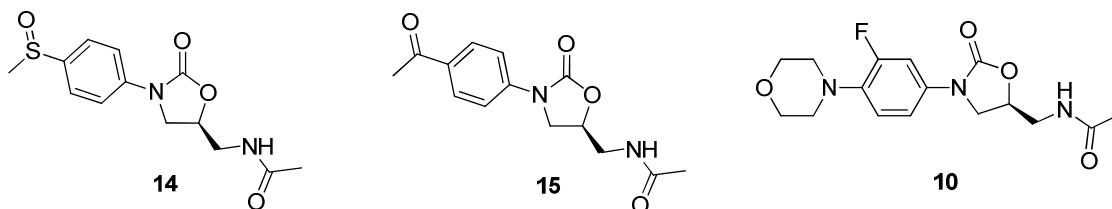




### b) Les oxazolidinones

Les oxazolidinones constituent l'une des familles d'antibiotiques les plus récentes et les plus innovantes contre les bactéries à Gram positif. L'activité antimicrobienne des oxazolidinones a été reportée pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1978.<sup>39</sup> En 1987, les oxazolidinones **14** et **15** décrites présentait un mécanisme d'action unique, une activité antibiotique prometteuse, une absence apparente de résistance et de bonnes propriétés

pharmacocinétiques. Une étude de relations structure-activité a montré que le groupement *N*-aryle, un substituant en para, la configuration absolue (5*S*) et la chaîne acétamidométhyle en C5 étaient nécessaires à l'activité antibactérienne. Ainsi, le linézolide **10** fut le premier antibiotique de cette famille à avoir été mis sur le marché il y a dix ans (Figure 10).<sup>40</sup>



**Figure 10** : Structures des premières oxazolidinones antimicrobiennes **14** et **15** et du linézolide **10**.

Le linézolide est notamment préconisé pour le traitement des infections d'*Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine et des infections nosocomiales causées par des staphylocoques résistants à la méthicilline. Il est considéré comme le dernier rempart contre nombre d'infections nosocomiales dues à des bactéries à Gram positif.

Le linézolide se lie à la sous-unité 50S du ribosome, dans le site actif de la peptidyl transférase, le site de la synthèse des protéines. Le linézolide, en bloquant l'initiation de la traduction, possède un mécanisme d'action unique.<sup>40</sup> Toutefois, le linézolide ne cible pas spécifiquement les ribosomes des cellules bactériennes et peut entraîner une myélosuppression réversible ainsi que l'inhibition réversible des monoamines oxydases chez l'Homme.<sup>41</sup> En raison de ces effets secondaires, le linézolide n'est donc utilisé qu'en cas d'infections sévères et ne peut être utilisé en traitement de longue durée. Des oxazolidinones de 2<sup>ème</sup> génération sont en cours de développement afin de minimiser ces effets secondaires. Actuellement, quatre molécules sont en cours d'évaluation clinique : le sutézolide **16**, le radézolide **17**, le AZD5847 **18**, et le tédizolide **19**, connu aussi sous le nom de torézolide (Figure 11).<sup>39</sup>

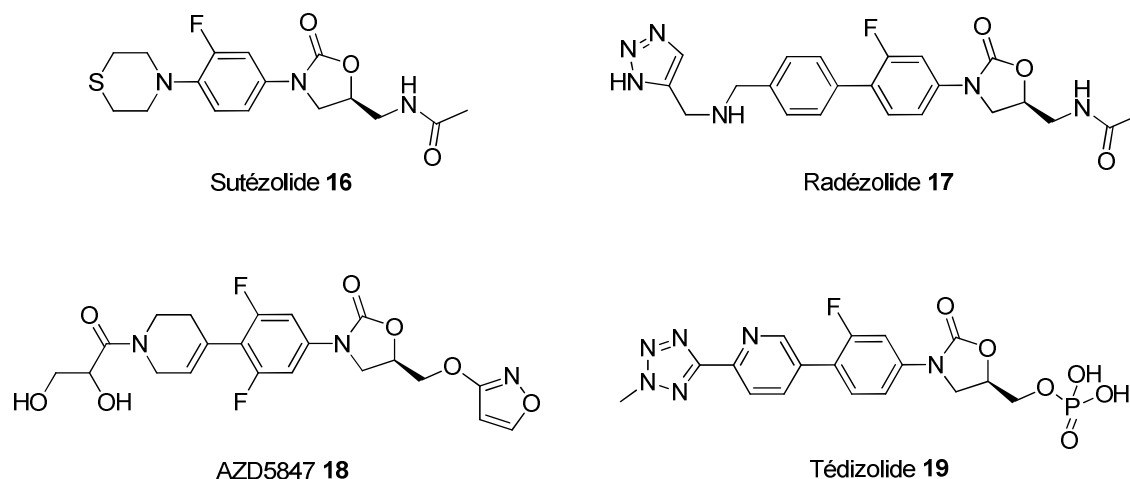


Figure 11 : Structures des oxazolidinones en cours d'évaluation clinique.

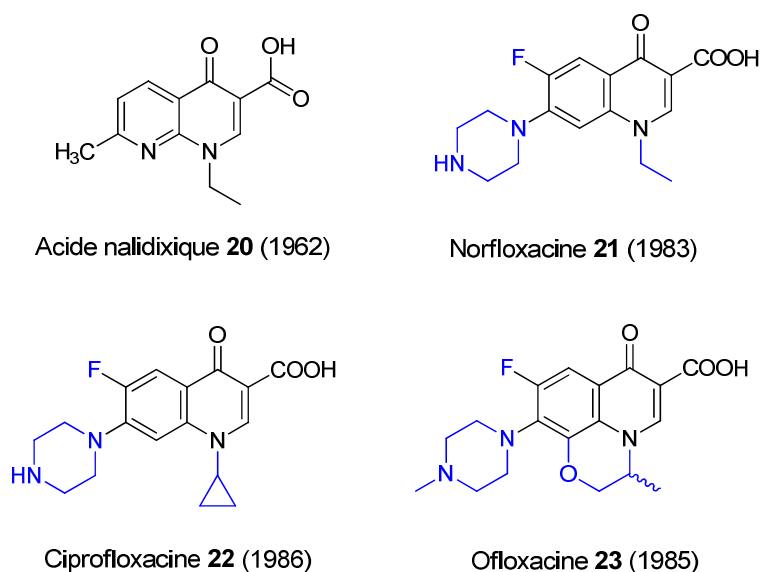
Ces composés présentent des modifications au niveau de la chaîne acyle et du substituant du groupe *N*-aryle dans le but d'améliorer l'activité, la solubilité, les propriétés pharmacocinétiques et surtout la sélectivité de cette classe d'antibiotiques. L'activité de ces molécules est souvent bien meilleure que celle du linézolide, mais des problèmes persistent sur les autres critères d'évaluation. Ceci explique qu'à ce jour, le linézolide reste la seule oxazolidinone autorisée sur le marché.<sup>39</sup>

### 3. Les inhibiteurs de la transcription ou de la réplication de l'ADN

La synthèse des acides nucléiques est vitale pour les cellules, car sans elle la division cellulaire et la fabrication des protéines est impossible. Un certain nombre de composés, dont les quinolones et fluoroquinolones, peuvent bloquer de manière directe ou indirecte ces voies de biosynthèse des acides nucléiques, et ont par conséquent une activité antibiotique.

C'est en 1962 que la première quinolone, l'acide nalidixique **20**, fut indiquée pour le traitement des infections des voies urinaires par certains bacilles à Gram négatif. L'acide nalidixique et ses dérivés constituent les quinolones de première génération. Ce n'est que dans les années 80 que furent synthétisés les fluoroquinolones, possédant un noyau quinoléine et un atome de fluor sur le cycle aromatique. Parmi elle, la norfloxacin **21** est le premier composé de la seconde génération des quinolones.<sup>42</sup> Par la suite, la

ciprofloxacine **22** et l'ofloxacine **23** ont prouvé leur efficacité dans le traitement d'infections causées par les pathogènes à Gram négatif et à Gram positif (Figure 12).<sup>43</sup>



**Figure 12** : Structures de l'acide nalidixique **20** et de quinolones de deuxième génération : norfloxacine **21**, ciprofloxacine **22** et ofloxacine **23**. Les substituants caractéristiques de ces fluoroquinolones sont colorés en bleu.

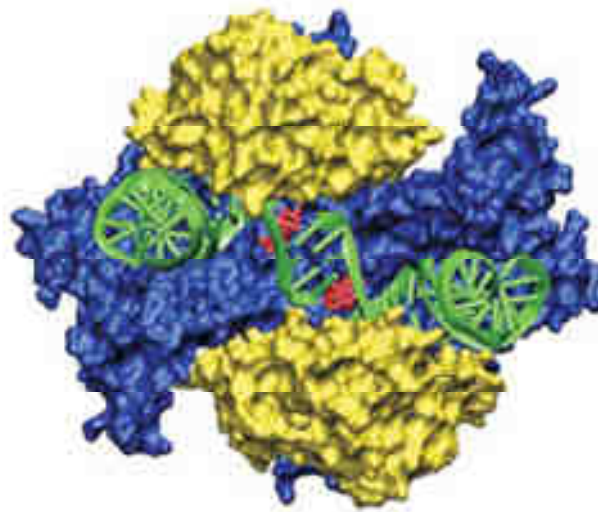
Plus récemment, une troisième et une quatrième génération de quinolones, se différenciant par de simples modifications de substituants sur le cycle aromatique ou quinoléine, ont été mises sur le marché, mais certains composés ont dû en être retirés ou bloqués en dernière phase de développement clinique à cause de leur toxicité.<sup>44, 45</sup>

Les quinolones agissent sur deux cibles spécifiques dans la cellule bactérienne : la topoisomérase II ou ADN-gyrase (cible principale chez les bactéries à Gram négatif), et la topoisomérase IV (cible principale chez les bactéries à Gram positif), qui sont des enzymes essentielles à la réplication et à la transcription de l'ADN. L'ADN-gyrase et la topoisomérase IV régulent le degré de surenroulement de l'ADN bactérien. Les deux enzymes sont capables de séparer ou d'enlacer des ADN circulaires doubles brins en réalisant une coupure simultanée des deux brins d'un des deux ADN, puis en faisant passer l'autre ADN à travers cette coupure. L'énergie nécessaire est fournie par l'hydrolyse de l'ATP.<sup>46</sup>

Les fluoroquinolones diffusent passivement par des porines à travers les membranes de la bactérie jusqu'au cytoplasme où elles vont inhiber l'activité de ces enzymes en formant un complexe ternaire fluoroquinolone-ADN-ADN-gyrase ou ADN-topoisomérase IV. En effet,

lors de l'étape de coupure du double brin d'ADN une poche se découvre dans l'enzyme. Cette poche permet aux quinolones de s'intercaler entre l'ADN-gyrase et les brins d'ADN.

L'organisation moléculaire du complexe ternaire avec les ADN-gyrases est actuellement mal connue. Toutefois, l'équipe de Sanderson a récemment résolu la structure du complexe ternaire entre la topoisomérase IV et la moxifloxacin, une fluoroquinolone de 4<sup>ème</sup> génération. Cette étude montre que deux molécules de fluoroquinolones sont présentes dans le complexe (Figure 13).<sup>47</sup>



**Figure 13** : Structure cristallographique du complexe entre la moxifloxacin (en rouge), l'ADN (en vert) et la topoisomérase IV (sous-unités en bleu et jaune).<sup>47</sup>

Les fluoroquinolones, en stabilisant le complexe ADN-topoisomérase, inhibent la synthèse de l'ADN et portent donc atteinte à un des processus vitaux de la cellule bactérienne.

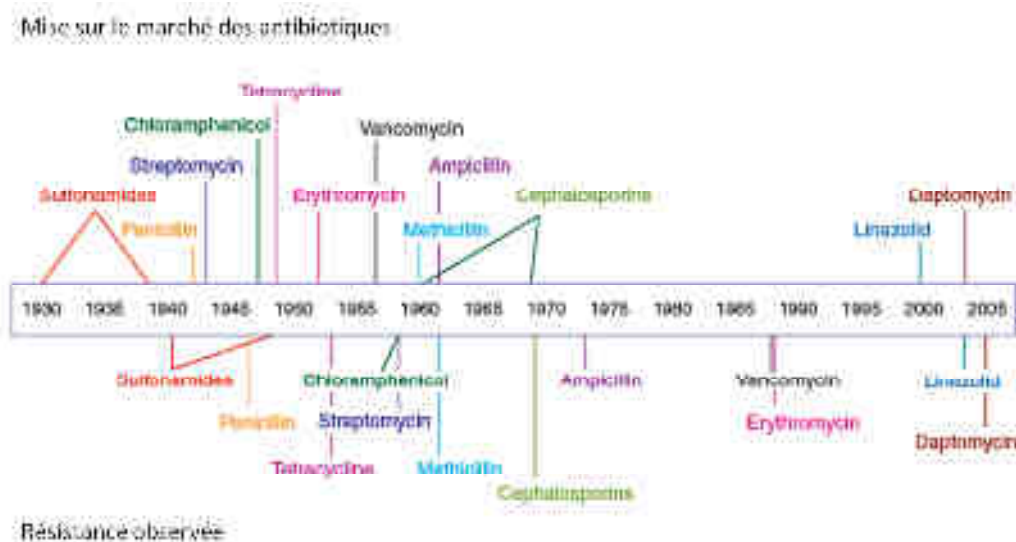
## C. L'apparition de souches antibiorésistantes

### 1. Généralités

Quelques années à peine après la découverte de la pénicilline, l'apparition de souches résistantes fut constatée dans les hôpitaux, y compris pour des microorganismes extrêmement banals.<sup>31, 48, 49</sup> Le staphylocoque est devenu, au fur et à mesure des découvertes de l'industrie pharmaceutique, successivement résistant aux sulfamides, à la pénicilline, aux tétracyclines, et même à la vancomycine.<sup>50, 51</sup> *Pseudomonas aeruginosa*,

*Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae* sont devenues résistantes à pratiquement tous les antibiotiques, à l'exclusion de la polymyxine.<sup>50, 52-54</sup> Une souche multirésistante de *Salmonella enterica* est responsable d'infections pouvant être létales.<sup>55, 56</sup> *Mycobacterium tuberculosis* présente un niveau de résistance croissant dans les pays de l'Est européen. Enfin, certaines infections urinaires causées par *Enterococcus faecalis* sont devenues intraitables.<sup>51</sup> Cette liste est malheureusement loin d'être exhaustive.

L'apparition de souches résistantes à un antibiotique est inévitable car elle répond à un processus d'évolution de type darwinien. La vitesse d'apparition de ces résistances est proportionnelle à l'ampleur de l'utilisation de l'antibiotique.<sup>49, 57</sup> L'utilisation déraisonnée des antibiotiques, prescrits à titre préventif, et non curatif, a exercé une pression sélective qui a favorisé l'émergence de souches résistantes parfois moins d'un an après la mise sur le marché du nouvel antibiotique. Ce fut notamment le cas de la streptomycine (Figure 14).<sup>31</sup> L'utilisation massive des antibiotiques par l'industrie agro-alimentaire, afin de prévenir les maladies infectieuses chez les animaux d'élevage, a également contribué à l'apparition de bactéries résistantes.<sup>31, 58, 59</sup> Enfin, les augmentations du nombre et de la fréquence des déplacements humains et des échanges internationaux n'ont pu, hélas, que contribuer à la dissémination de ces résistances aux quatre coins de la planète.



**Figure 14** : Frise chronologique représentant l'entrée sur le marché des antibiotiques (en haut) et l'année d'apparition des premières résistances (en bas). Adaptée de Clatworthy et al.<sup>28</sup>

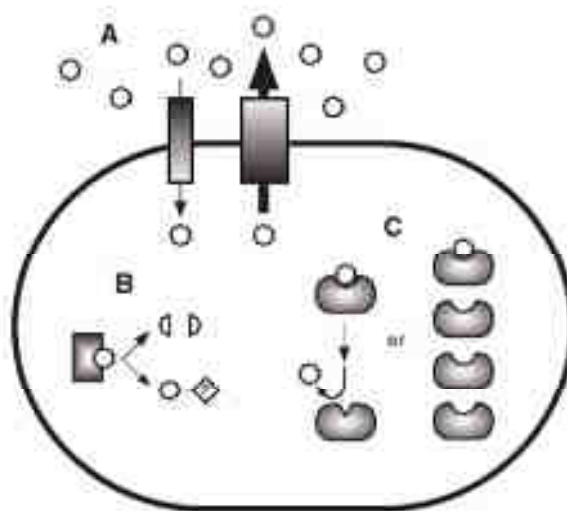
## 2. Les mécanismes de résistances aux antibiotiques

Chez la bactérie, la résistance aux antibiotiques peut être soit "naturelle", soit "acquise". La membrane externe des bactéries à Gram négatif leur confère généralement une faible perméabilité aux antibiotiques. Les bactéries qui produisent du biofilm, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, sont également moins sensibles aux antibiotiques. D'autres microorganismes sont naturellement dotés d'enzymes qui dégradent très efficacement les xénobiotiques. Enfin, la structure spécifique des liposaccharides (LPS) de *B. cepacia* engendre une forte résistance aux peptides antibactériens cationiques comme les aminosides.

La résistance acquise, quant à elle, est causée par la mutation d'un chromosome ou par l'acquisition de plasmides et/ou de transposons mutés que la bactérie peut aisément transmettre aux bactéries environnantes.<sup>51, 57, 60</sup> On estime ainsi que si une seule bactérie est résistante au sein d'une population, la majorité des microorganismes de cette même population sera résistante au bout de quelques heures, si la pression sélective exercée par l'antibiotique est maintenue.

Les trois principaux mécanismes de résistance existant chez la bactérie sont :

- (A) La prévention de l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule par l'inhibition des systèmes d'import et/ou l'augmentation des capacités d'efflux ;
- (B) L'inactivation des antibiotiques par hydrolyse ou par modification chimique ;
- (C) La diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, par mutation ou par augmentation de la production de la cible (Figure 15).



**Figure 15** : Les principaux mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques. A : diminution de l'import ou augmentation de l'efflux de l'antibiotique ; B : hydrolyse ou modification chimique de l'antibiotique ; C : modification ou augmentation de la production de la cible. Les sphères blanches représentent l'antibiotique. Tirée de Yoneyama *et al.*<sup>61</sup>

Nous allons décrire successivement et brièvement ces trois différents mécanismes de résistance à travers des exemples variés.

#### a) La prévention de l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule

L'activité létale d'un antibiotique est généralement proportionnelle à sa concentration intracellulaire. La bactérie va ainsi tendre à diminuer l'import du xénobiotique. L'imipénème, par exemple, est particulièrement actif sur *P. aeruginosa*. Cet antibiotique diffuse en fait à travers une porine spécifique, OprD. Or il est apparu que des souches cliniques de *P. aeruginosa* étaient devenues résistantes à l'imipénème, simplement en cessant d'exprimer cette porine.<sup>62, 63</sup>

Si les xénobiotiques arrivent à pénétrer dans les cellules, les bactéries essaieront d'augmenter l'efflux des antibiotiques à travers les membranes vers le milieu extracellulaire.<sup>64, 65</sup> *P. aeruginosa*, par exemple, en plus d'être particulièrement imperméable, possède 16 gènes codant pour des pompes à efflux dans son génome. Ainsi, une mutation conduisant à une surexpression de la pompe à efflux MexAB-OprM rend ce microorganisme résistant à de nombreux antibiotiques. À l'inverse, une perte de la fonction de cette même pompe engendre une hypersensibilité à de nombreux antibiotiques.<sup>66</sup>



b) L'inactivation des antibiotiques

L'inactivation enzymatique des antibiotiques par modification chimique (hydrolyse, conjugaison, etc...) est un mécanisme majeur de résistance vis-à-vis des antibiotiques naturels comme les  $\beta$ -lactamines ou les aminoglycosides. Pour les  $\beta$ -lactamines, le mécanisme le plus courant est l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame par des enzymes appelées les  $\beta$ -lactamases. Cette hydrolyse conduit à l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame qui devient donc inactif.<sup>61, 64</sup>

En revanche, les aminoglycosides ne possèdent pas de fonctions sensibles à l'hydrolyse. Les stratégies de résistances sont donc basées sur l'inactivation enzymatique de ces molécules. Ainsi, la *N*-acétylation des fonctions amines et l'*O*-phosphorylation ou l'*O*-adénylation des fonctions hydroxyles par des enzymes dédiées compromettent fortement la capacité des aminosides à lier leur cible et à exercer leur activité antibiotique.<sup>64, 67, 68</sup>

Contrairement aux antibiotiques naturels, il n'existe pas d'enzymes qui modifient ou hydrolysent les antibiotiques synthétiques. Le mécanisme de résistance mis en place face à ce type de composés est habituellement lié soit à l'efflux soit à une modification de la cible biologique.

c) Modification de la cible biologique

Le plus commun des mécanismes de résistance est l'acquisition de nouveaux gènes, transférés par des plasmides ou des transposons.<sup>69, 70</sup> Ceci conduit à une modification de la cible naturelle qui ne peut donc plus lier l'antibiotique. Pour les fluoroquinolones, une mutation dans les sous-unités de l'ADN-gyrase ou de la topoisomérase IV entraîne des modifications dans la poche de liaison de l'antibiotique.<sup>64, 71, 72</sup> Les fluoroquinolones ne peuvent alors plus s'intercaler entre l'enzyme et l'ADN pour former le complexe ternaire. Les résistances récentes au dernier antibiotique innovant mis sur le marché, le linézolide, sont également dues à une modification de la cible, l'ARNr 23S.<sup>73, 74</sup> Ce phénomène est aussi présent avec les antibiotiques naturels. Une mutation ou une modification des PBP diminue fortement l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines.<sup>30, 64, 75</sup> La surproduction des protéines cibles, sauvages ou mutées, par le microorganisme conduit aussi à limiter fortement l'impact de certains antibiotiques.

La découverte des antibiotiques au début du XX<sup>ème</sup> siècle a suscité l'espoir de voir un jour toutes les maladies d'origine bactérienne éradiquées. Or l'emploi abusif de ces substances en médecine et dans l'élevage a conduit à l'émergence de résistances. Certaines infections sont aujourd'hui très difficiles à traiter et posent un vrai problème de santé publique. Comme nous l'avons évoqué précédemment, ce problème s'ajoute au risque d'emploi de ces bactéries dans le cadre d'attentats bioterroristes. La recherche de nouvelles antibiothérapies est donc plus que jamais d'actualité pour apporter des solutions au problème d'antibiorésistance, et pour être en mesure de contrer une éventuelle attaque bioterroriste. Les antibiotiques actuellement disponibles agissant sur un nombre limité de cibles, de nouvelles cibles et de nouvelles molécules antibactériennes doivent être identifiées afin de conserver une longueur d'avance sur les infections. Dans ce contexte, les systèmes d'acquisition des nutriments au détriment de l'hôte comptent parmi les cibles les plus intéressantes. Il a ainsi été clairement établi que le métabolisme bactérien du fer est étroitement lié à la virulence.<sup>76, 77</sup> L'expression d'un système efficace d'assimilation du fer est indispensable à la survie des pathogènes et est donc liée à leur aptitude à infecter un hôte.<sup>78, 79, 80</sup> Les mécanismes d'acquisition du fer semblent donc être des cibles prometteuses pour la mise au point de nouvelles stratégies antibiotiques.<sup>81</sup>

L'objectif de notre projet est d'utiliser nos connaissances des systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram négatif pour développer de nouvelles antibiothérapies. Afin de replacer nos travaux dans leur contexte, les caractéristiques des différents systèmes impliqués dans le transport du fer vont être présentées dans la suite du manuscrit.



**Les mécanismes bactériens  
d'acquisition du fer : une  
cible pour de nouvelles  
stratégies antibiotiques ?**



# I. Le fer : généralités

## A. D'où vient le fer ?

Pour comprendre la provenance et l'abondance de cet élément sur notre planète, nous devons remonter jusqu'à la genèse de l'univers. C'est en effet lors du Big Bang que les noyaux atomiques constituant tous les corps de l'univers ont été créés. Les éléments chimiques les plus légers (hydrogène, hélium, lithium, béryllium et bore) se sont formés dans les premières minutes qui ont suivi le Big Bang, au cours du processus dit de nucléosynthèse primordiale. Les éléments plus lourds sont nés au cours de réactions thermonucléaires ayant lieu au cœur des étoiles, lors du processus dit de nucléosynthèse stellaire. Ce processus, amorcé par la combustion de l'hydrogène au cœur des étoiles, consiste à former des éléments de plus en plus lourds par réactions de fusion nucléaire en cascades. C'est au cours de la dernière étape de fusion que deux atomes de silicium 28 donnent naissance au fer 56. C'est l'élément le plus lourd, et donc le plus stable, produit par fusion, mais aussi le plus léger produit par fission. L'exceptionnelle stabilité du noyau atomique du fer explique donc son abondance dans l'univers et au sein de notre système solaire. C'est l'un des constituants majeurs des planètes telluriques telles que Mars. Sur la Terre, le fer est l'un des éléments fondamentaux constituant le noyau (34,6 %), avec le nickel (5 à 10 %). Dans la croûte terrestre, le fer est le quatrième élément le plus abondant (4,7 %), après l'oxygène (49,5 %), le silicium (25,8 %) et l'aluminium (7,8 %), où il est présent essentiellement sous forme d'hydroxydes de fer : hématite  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (70 % de fer) et magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (72 % de fer).<sup>82</sup>

## B. Propriétés physico-chimiques

Le fer, de numéro atomique 26, appartient à la première série des éléments de transition. C'est un élément ferromagnétique qui, dans les conditions normales de température et de pression, se présente sous la forme d'un solide cristallin de structure cubique centré.

De configuration électronique  $[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$ , le fer peut exister à des degrés d'oxydation allant de -II à +VI, les plus fréquents étant les degrés II ( $d^6$ ) et III ( $d^5$ ). Leur potentiel redox associé  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  ( $E = 0,77 \text{ V}$ ) est très variable : il peut aller de -500 mV à 600 mV selon les ligands du métal, couvrant ainsi quasiment toute la gamme de potentiels redox utilisés dans les systèmes biologiques.

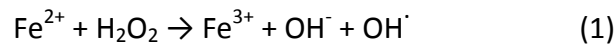
Les interactions entre le fer(II) ou le fer(III) avec des ligands à atomes donneurs peuvent être définies en utilisant le concept acide/base de Pearson. Le fer(III), avec un rayon ionique de 0,067 nm et une charge positive de 3, possède un petit rayon ionique et une forte densité de charge ; il peut donc être considéré comme un acide dur. Il s'associera de préférence à des ligands de type base dure, c'est-à-dire à des ligands comportant au moins un atome très électronégatif et possédant une orbitale vacante à haute énergie. Les ligands oxygénés comme les phénolates et les carboxylates, les ligands azotés de type imidazole, ainsi que les ligands soufrés tels que les thiolates, sont de ce type. Le fer(II), avec un rayon ionique de 0,083 nm et une charge positive de 2, possède un grand rayon ionique et une faible densité de charge ; il se situe donc à la frontière du métal dur/mou. Les interactions avec des ligands azotés (imidazole, pyrrole) et des ligands sulfurés (thiolate, méthionine) sont alors favorisées, au dépend des ligands oxygénés. Le fer(II) et le fer(III) forment généralement des complexes hexacoordinés octaédriques avec ces ligands, bien que des complexes tétracoordinés et pentacoordinés puissent exister.<sup>76</sup>

### **C. Un élément essentiel à la vie, mais peu biodisponible**

Le fer, élément *a priori* trivial, est en fait intimement lié à l'apparition de la vie sur Terre. D'une part, le champ magnétique terrestre, induit par les mouvements de convection de l'alliage liquide fer-nickel dans la couche externe du noyau terrestre, a joué le rôle d'un bouclier protecteur pour la Terre en déviant la trajectoire des particules nocives du vent solaire. Le champ magnétique a ainsi contribué à créer des conditions favorables à l'émergence de la Vie sur Terre. D'autre part, l'abondance du fer sur notre planète et la richesse de la chimie redox qui lui est associée expliquent son intégration au sein du vivant

dans une multitude de fonctions biologiques cruciales, et cela probablement très tôt dans l'histoire de l'évolution. En effet, cet élément est impliqué en tant que co-facteur enzymatique dans nombre de processus métaboliques majeurs, tels que la synthèse des acides nucléiques, la photosynthèse, le transport de l'oxygène, la régulation des gènes, le transfert d'électrons, etc.<sup>83,84</sup> Ainsi, à l'exception du spirochète *Borrelia burgdorferi* (pathogène responsable de la maladie de Lyme),<sup>85</sup> et des bactéries du genre *Lactobacillus*, qui basent leur métabolisme sur le cobalt ou le manganèse,<sup>86</sup> il apparaît que le fer est nécessaire à toute forme de vie sur Terre.

Malgré son abondance dans la nature, le fer reste peu biodisponible pour les êtres vivants. En effet, ce métal peut exister sous deux états d'oxydation en solution : le fer ferreux Fe(II) et le fer ferrique Fe(III). À pH physiologique et en milieu aérobie, le fer ferreux est très réactif et potentiellement toxique. Il est rapidement oxydé en fer ferrique *via* la réaction de Fenton (1), libérant des espèces oxygénées très réactives (ROS), telles que le radical hydroxyde (OH<sup>·</sup>), capable d'endommager gravement les cellules.

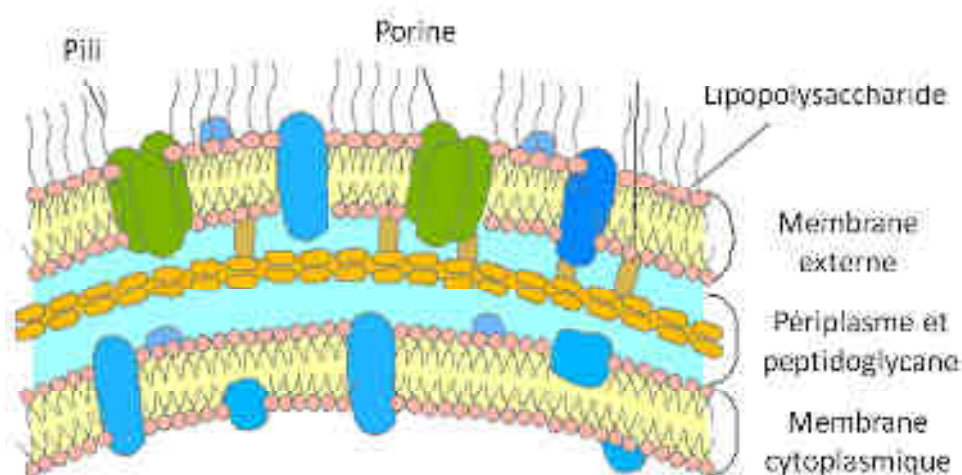


À pH 7, le fer ferrique précipite sous forme d'hydroxydes de fer(III) de type Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-nH<sub>2</sub>O, très stables et insolubles ( $K_s < 10^{-38}$  M). La concentration en ions Fe<sup>3+</sup> libres dans l'environnement est donc très faible, de l'ordre du nanomolaire.<sup>87</sup> Dans les cellules eucaryotes, le fer est séquestré et stocké dans des protéines spécifiques, si bien que la concentration en ions ferriques libres dans les fluides corporels est de l'ordre de 10<sup>-18</sup> M. Ainsi, quel que soit l'environnement colonisé par les bactéries, la concentration en fer biodisponible est généralement très faible et largement inférieure à la concentration optimale nécessaire à la prolifération bactérienne, estimée entre 10<sup>-7</sup> et 10<sup>-5</sup> M.<sup>88</sup> Pour faire face à la faible biodisponibilité du fer, les bactéries ont développé des mécanismes performants pour solubiliser et acquérir le fer, soit à partir de leur environnement, soit au détriment d'un hôte eucaryote. Ces différents mécanismes peuvent être présentés en focalisant notre propos sur les bactéries à Gram négatif, cibles principales de nos approches.



## II. L'assimilation du fer chez les bactéries à Gram négatif

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est constituée de deux membranes (interne et externe) délimitant un espace appelé périplasma (Figure 16). La membrane externe est une bicouche asymétrique, constituée de LPS dans le feuillet externe, et de phospholipides dans le feuillet interne. De nombreuses protéines de structure ou de transport, telles que les porines, sont enchâssées dans cette membrane. L'espace périplasmique contient le peptidoglycane, représente un espace de stockage d'enzymes et de nutriments, et joue un rôle dans la biosynthèse de certaines protéines ou dans le métabolisme de la cellule. Enfin, la membrane interne est le siège du métabolisme respiratoire de la bactérie. Elle contient les protéines des chaînes de transfert d'électrons, qui provoquent un flux de protons conduisant à la différence de potentiel électrochimique et de pH de part et d'autre de la membrane (force proton motrice). La membrane interne contient également des perméases qui commandent l'import sélectif de molécules dans le cytoplasme.



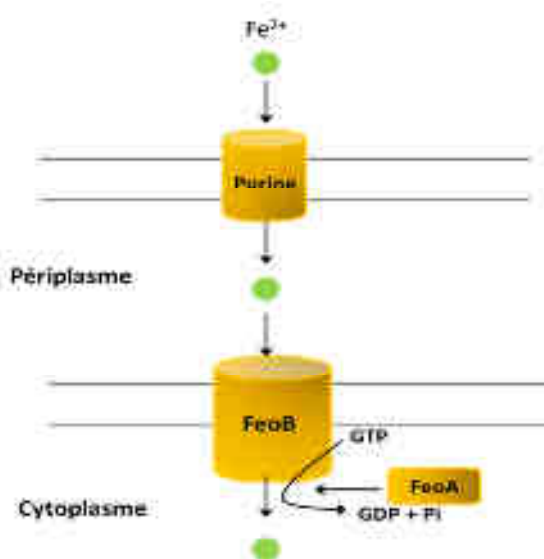
**Figure 16** : Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif. Modifiée d'après [www.conceptdraw.com/GramNegativeEnvelope.gif](http://www.conceptdraw.com/GramNegativeEnvelope.gif).

Les bactéries à Gram négatif sont donc dotées de trois barrières physiques possédant des propriétés physico-chimiques et mécaniques très différentes, que doivent traverser les nutriments, dont le fer, pour atteindre le cytoplasme. Au cours de l'évolution, ces

microorganismes se sont dotés de systèmes performants pour pouvoir acquérir le fer nécessaire à leur prolifération : acidifier le milieu extérieur pour rendre le fer(III) plus soluble, réduire le fer ferrique en fer ferreux, employer des chélateurs pour solubiliser le fer(III) ou puiser dans les métalloprotéines de l'hôte contenant du fer ferrique.<sup>89, 90</sup> Selon la stratégie mise en œuvre par le microorganisme, le fer est absorbé soit par diffusion passive, soit transporté de façon active dans la cellule.

### A. Assimilation du fer ferreux par diffusion passive

Le système de transport du fer ferreux a été identifié pour la première fois en 1987 chez *Escherichia coli*,<sup>91, 92</sup> puis a été découvert chez *Vibrio cholerae*,<sup>93, 94</sup> *Yersinia pestis*,<sup>95</sup> et *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>96</sup> Dans les conditions anaérobies (concentration en oxygène < 2 mg/L) et/ou à pH acide (pH < 4), le fer(III) environnemental est réduit en fer(II) par des réductases ferriques libérées dans le milieu extracellulaire par les entérobactéries ou les vibrions. Le système Feo transporte le fer ferreux extracellulaire dans le périplasma par diffusion grâce à une porine non définie. La perméase FeoB, enchâssée dans la membrane interne, permet son transfert dans le cytoplasme grâce à un mécanisme de transport actif lié à l'hydrolyse du GTP. L'activité GTPase de FeoB est stimulée en présence de la protéine cytoplasmique FeoA (Figure 17).<sup>97</sup>



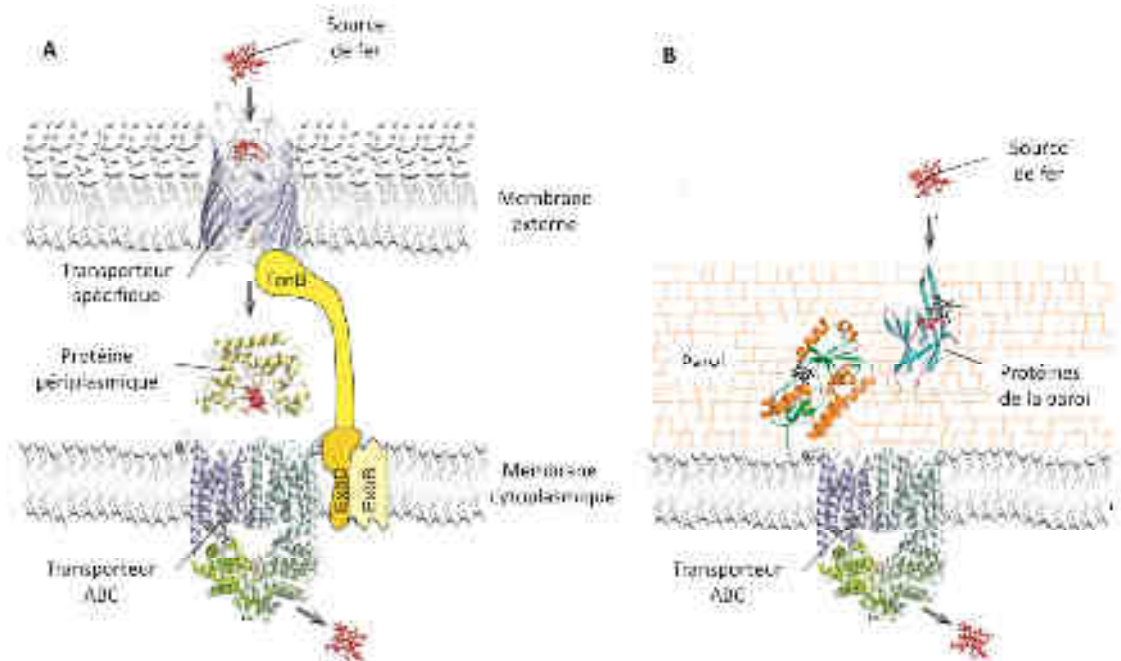
**Figure 17** : Fonctionnement schématique du système Feo permettant le transport du fer(II) à travers les membranes des bactéries à Gram négatif.

Le transport du fer ferreux par le système Feo est relativement répandu chez les bactéries qui colonisent l'appareil gastro-intestinal (pH acide, anaérobiose) comme *Helicobacter pylori*.<sup>98</sup> Cependant, ce système n'est pas utilisable dans la vaste majorité des cas, le fer ferreux s'oxydant rapidement en fer ferrique en milieu aérobie et à pH physiologique. Au cours de leur évolution, les bactéries ont donc développé des systèmes d'acquisition du fer(III) adaptés aux conditions de vie à pH physiologique.

## B. Transport du fer ferrique

La faible biodisponibilité du fer(III) en milieu aérobie et le stockage du fer dans des protéines de l'hôte ont conduit les bactéries à développer des stratégies d'extraction ou de solubilisation de ce métal. Chez les bactéries à Gram négatif, les membranes externes sont faiblement perméables afin de protéger les bactéries des toxines, des enzymes de dégradations et des xénobiotiques (y compris les antibiotiques). La présence de porines, protéines canal enchâssées dans la membrane externe de la bactérie, permet la diffusion passive de petits solutés hydrophiles d'un poids moléculaire généralement inférieur à 600 Da.<sup>63,99</sup>

Les différentes sources de fer(III) disponibles chez un hôte eucaryote ont un poids moléculaire trop élevé pour passer au travers des porines.<sup>100</sup> Au cours de l'évolution, les bactéries ont donc dû développer des systèmes permettant de transporter le fer(III) du milieu extracellulaire jusqu'au cytoplasme. Tous ces mécanismes de transport impliquent un transporteur de membrane externe (TME) spécifique, une protéine périplasmique (PBP pour *Periplasmic Binding Protein*) faisant la "navette" entre les deux membranes, et un transporteur de type ABC (*ATP Binding Cassette*) permettant de transférer le fer vers le cytoplasme.<sup>90</sup> Ce transport est dit actif car le transport à travers la membrane externe nécessite un apport d'énergie. Cette énergie provient de la force proton motrice de la membrane interne, et est fournie par un complexe de trois protéines, TonB, ExbB et ExbD, appelé machinerie TonB.<sup>101</sup> Les bactéries à Gram positif, qui ne possèdent pas de membrane externe, utilisent simplement un transporteur ABC, analogue à celui des bactéries à Gram négatif, pour transporter les sources de fer du milieu extérieur à leur cytoplasme, et n'ont donc pas besoin de la machinerie TonB (Figure 18).<sup>90</sup>



**Figure 18** : Schéma général des mécanismes d'assimilation du fer (A) chez les bactéries à Gram négatif et (B) chez les bactéries à Gram positif. Adaptée de Schauer *et al.* et Braun *et al.*<sup>90, 102</sup>

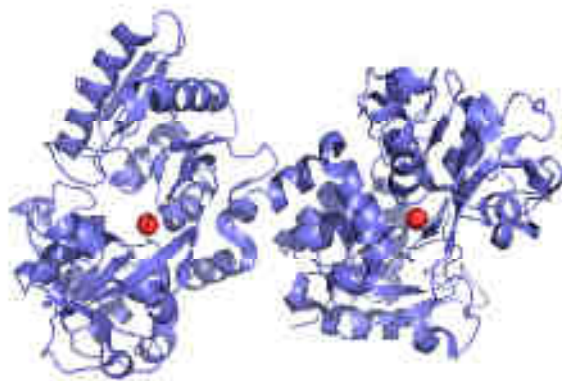
Les différents acteurs du transport TonB-dépendant ainsi que les sources de fer transportées grâce à ce système par les bactéries à Gram négatif sont décrits plus précisément dans la suite de ce chapitre.

## 1. Les différentes sources de fer et leur assimilation

Le corps humain contient des quantités importantes de fer, de l'ordre de 4 g pour un homme de 80 kg. Il est réparti entre les sites d'utilisation (essentiellement la moelle osseuse et les hématies), et les sites de stockage (essentiellement les macrophages et le foie). Le fer circule entre les sites de stockage et les sites d'utilisation en fonction des besoins métaboliques. L'hémoglobine contient environ 60 % du fer total, la myoglobine, la transferrine, les cytochromes et les autres enzymes à fer en intègrent 10 %, et le reste est stocké dans la ferritine (30 %). Ces protéines constituent donc une source de fer de choix pour les microorganismes pathogènes colonisant l'être humain.<sup>103</sup>

a) La transferrine et la lactoferrine

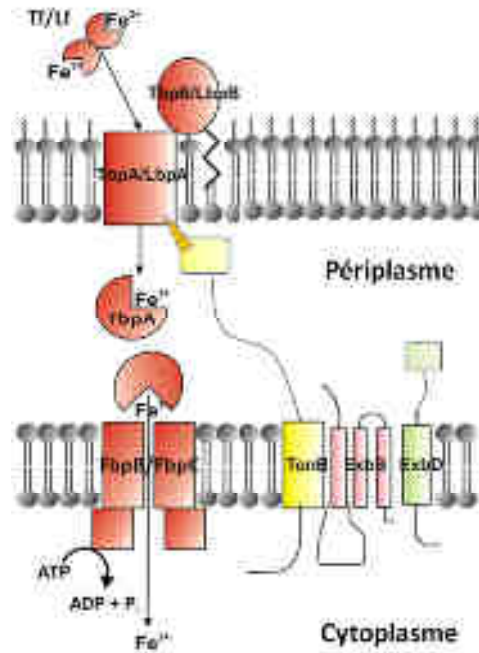
Chez l'être humain et les autres vertébrés, le fer provenant des aliments est assimilé par l'intestin grêle et passe à travers le flot sanguin où il est transporté par des glycoprotéines. Il en existe deux classes majeures : la transferrine Tf présente dans le sérum, et la lactoferrine (ou lactotransferrine) Lf, qui circule dans les fluides extracellulaires.<sup>103</sup> Ces molécules sont constituées d'une seule chaîne de glycoprotéines d'un poids moléculaire d'environ 80 kDa et possèdent deux sites de liaison pour le fer très similaires (Figure 19). Ces sites de liaison possèdent une très grande affinité pour le Fe(III) ( $K_a \sim 10^{20} \text{ M}^{-1}$ ), et une affinité moindre pour le Fe(II) ( $K_a \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>100</sup>



**Figure 19** : Structure de la transferrine (PDB ID : 1H76) avec les deux domaines globulaires (en bleu) et les deux sites de liaison du fer (en rouge).<sup>104</sup> Image réalisée avec PyMol.<sup>105</sup>

De nombreux microorganismes ont développé des stratégies permettant de se procurer le fer à partir de la Tf et de la Lf.<sup>106</sup> Ces protéines ayant un poids moléculaire trop élevé pour traverser la membrane externe de la bactérie, une étape additionnelle à la surface de la bactérie est nécessaire pour en extraire le fer, grâce à l'intervention des protéines TbpB/TbpA (système transferrine) et LbpB/LbpA (système lactoferrine).<sup>107, 108</sup> TbpB et LbpB sont des protéines attachées à la surface de la membrane externe par leurs extensions N-terminales constituant une ancre lipidique. TbpB, par exemple, agit comme un site de liaison initial pour la transferrine ferrique, facilitant ainsi ses liaisons ultérieures avec TbpA.<sup>109, 110</sup> TbpA et LbpA sont des protéines qui possèdent de larges boucles capables de lier respectivement la transferrine et la lactoferrine pour forcer la libération du fer de son site de liaison.<sup>106, 111</sup> Une fois le fer(III) transféré de manière active dans le périplasme, il est pris en

charge et transporté par la protéine périplasmique FbpA jusqu'à la membrane interne où il est importé dans le cytoplasme grâce aux transporteurs de la membrane cytoplasmique FbpB/FbpC (Figure 20).<sup>112, 113</sup>

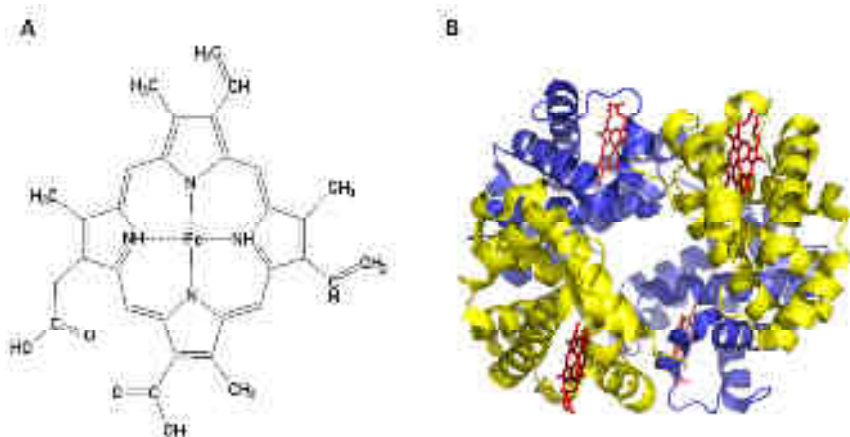


**Figure 20 :** Schéma du système d'acquisition du fer(III) via la transferrine Tf ou la lactoferrine Lf. Modifié d'après Krewulak *et al.*<sup>113</sup>

Les bactéries sont donc capables d'extraire le fer lié aux protéines de transport de l'hôte. Nous allons voir qu'elles sont aussi capables d'exploiter les protéines de stockage, notamment les hémoprotéines.

### b) Les hémoprotéines

Dans le corps, le fer est stocké dans la ferritine et dans les hémoprotéines (hémoglobine, hémopexine, etc.).<sup>103</sup> Au sein de ces dernières, le fer(II) ou le fer(III) est inclus dans une molécule dérivée des protoporphyrines de type IV, qui complexe le métal grâce aux quatre azotes du macrocycle porphyrine ; cet ensemble est appelé hème. Des résidus de l'hémoprotéine participent aussi à la sphère de coordination du métal, permettant ainsi l'ancrage de l'hème dans la protéine hôte (Figure 21).

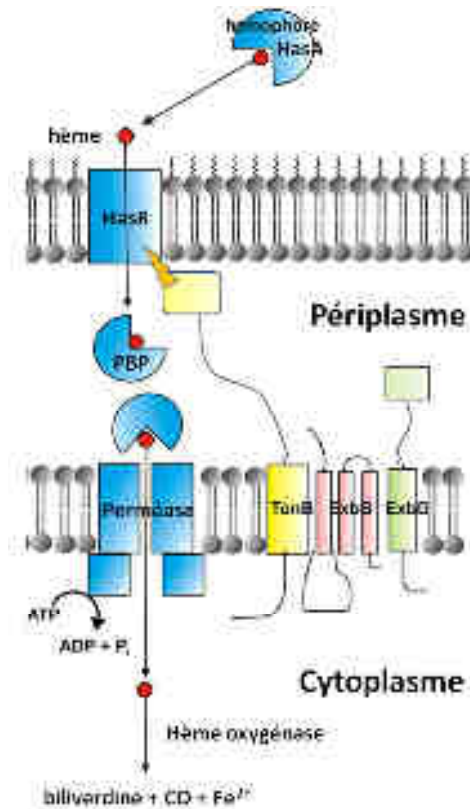


**Figure 21 :** A. Structure de l'hème liant le Fe(III). B. Structure tridimensionnelle de l'hémoglobine (PDB ID : 1HGA) séquestrant les molécules d'hème représentées en rouge.<sup>114</sup> Image réalisée avec PyMol.<sup>105</sup>

Pour accéder au fer héminique, certaines bactéries possèdent des TME qui lient directement les hémoprotéines, puis en extraient l'hème pour le transporter au cœur des cellules. C'est le cas des systèmes Hem de *S. marcescens* et Phu de *P. aeruginosa*.<sup>115, 116</sup> Cependant, dans la majorité des cas, les cellules de l'hôte sont lysées par des enzymes telles que les hémolysines, les cytolysines et les protéases sécrétées par les bactéries.<sup>117, 118</sup> Elles synthétisent et excrètent également des protéines spécifiques, appelées hémophores, qui chélatent l'hème libéré dans le milieu extracellulaire ou l'extraient des hémoprotéines, pour l'adresser ensuite à un TME spécifique.<sup>100</sup> Le fer héminique est alors assimilé par la bactérie grâce à un mécanisme de transport lui aussi spécifique.<sup>119, 120</sup> Deux systèmes utilisant des hémophores ont été décrits : le système Hxu identifié chez *Haemophilus influenzae* et le système Has identifié chez plusieurs microorganismes dont *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolita* et *Yersinia pestis*.<sup>90, 116, 121-123</sup> Nous focaliserons notre propos sur ce dernier système Has, beaucoup plus répandu. L'hémophore HasA est une protéine globulaire de 19 kDa sécrétée dans le milieu extracellulaire par un transporteur ABC. HasA chélate l'hème avec une stœchiométrie de 1 ( $K_D \sim 10^{-11}$  M).<sup>100, 124, 125</sup> Le complexe HasA-hème est reconnu par le transporteur spécifique de la membrane externe HasR,<sup>126, 127</sup> mais seul l'hème est transporté grâce à l'énergie fournie par la machinerie TonB.<sup>119</sup> Dans le cas de *S. marcescens*, l'énergie est fournie par HasB, une protéine homologue à TonB spécifiquement dédiée au transport de l'hème chez cette bactérie.<sup>128</sup> Une protéine périplasmique prend ensuite l'hème en charge jusqu'à un transporteur ABC pour son entrée dans le cytoplasme. Dans le



cytoplasme, l'hème est transféré à une oxygénase spécifique qui catabolise l'hème en biliverdine, monoxyde de carbone et fer ferreux par ouverture oxydante du macrocycle porphyrinique (Figure 22).<sup>90, 115, 129</sup>



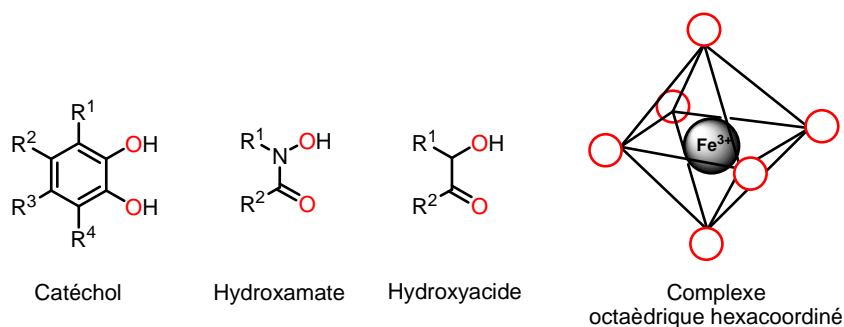
**Figure 22** : Schéma du système d'acquisition du fer hémique. Modifié d'après Krewulak *et al.*<sup>113</sup>

Les bactéries pathogènes sont donc capables d'absorber le fer présent au sein des protéines de transport et de stockage de l'hôte lors d'une infection. La dernière stratégie développée par les bactéries pour acquérir ce nutriment essentiel consiste à mobiliser le fer chélatable ou relargué par les protéines soumises à l'action des enzymes lytiques du pathogène. Cette stratégie indirecte permet à la bactérie d'exploiter toutes les sources de fer disponibles, indépendamment de leur nature. Ce mécanisme, qui est le plus répandu chez les bactéries, est fondé sur la synthèse et l'excrétion par les microorganismes de molécules chélatrices appelées sidérophores.



c) Acquisition du fer par les sidérophores

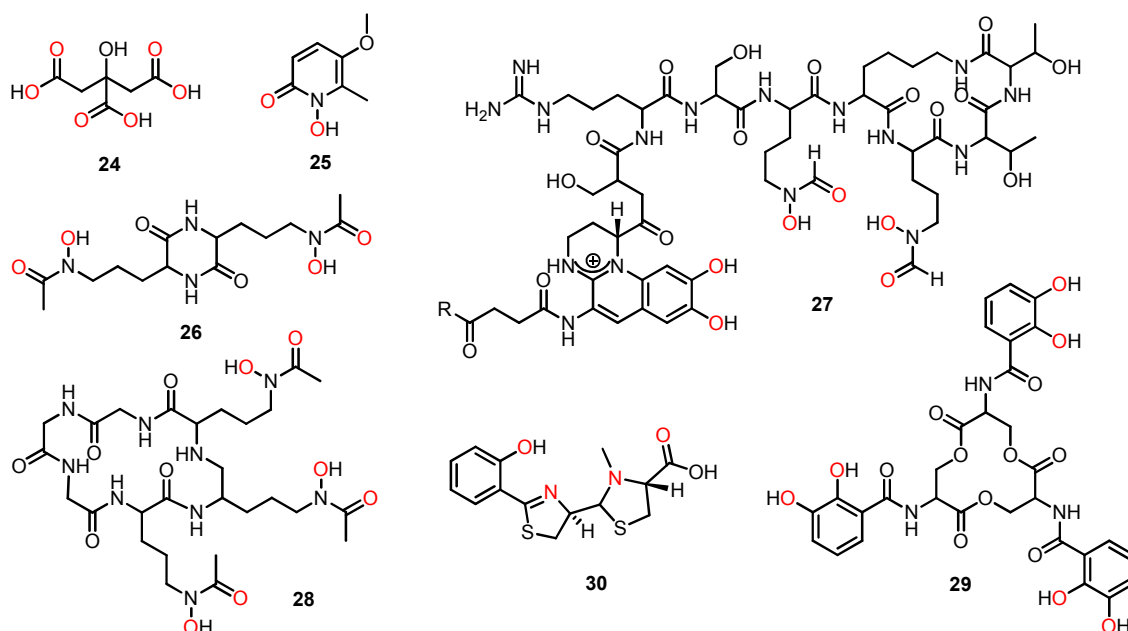
Les sidérophores sont des composés de faible poids moléculaire (de 200 à 2000 Da) synthétisés et excrétés par les bactéries en réponse à une carence en fer, et sont considérés comme des facteurs de virulence majeurs.<sup>76, 77, 79, 80</sup> Les sidérophores sont caractérisés par leur spécificité et leur affinité pour l'ion ferrique.<sup>130, 131</sup> Ils forment généralement des complexes octaédriques au sein desquels les ions ferriques sont hexacoordinés par des fonctions bidentates comme les catécholates, les hydroxamates et les hydroxyacides carboxyliques. Il faut donc trois fonctions bidentates pour satisfaire aux règles de coordination de l'ion Fe(III). Ces fonctions bidentates sont associées à un squelette carboné, parfois de nature peptidique, qui permet d'asservir les motifs chélatants en termes d'angle et/ou de distance pour une complexation optimale de l'ion métallique (Figure 23).



**Figure 23 :** Structure et organisation des groupes bidentates autour de l'ion Fe(III). Les hétéroatomes impliqués dans la complexation de l'ion ferrique sont colorés en rouge.

Les quelques 500 sidérophores recensés jusqu'ici présentent une très grande diversité structurale. Ainsi, certains sidérophores ont des structures extrêmement simples comme le citrate **24**, la cépabactine **25** (*Burkholderia cepacia*) ou l'acide rhodotorulique **26** (*Rhodotorula pilimanae*), alors que d'autres présentent des architectures moléculaires nettement plus complexes comme la pyoverdine **27** (*Pseudomonas aeruginosa*). Les sidérophores peuvent être classés en cinq groupes selon la nature de leurs groupements chélatants : les hydroxamates, dont fait partie le ferrichrome **28** (*Ustilago sphaerogena*) ; les catécholates, comme l'entérobactine **29** (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) ; les carboxylates, tels le citrate **24** ; les composés hétérocycliques, comme la pyochéline **30** (*Pseudomonas aeruginosa*) ; et les sidérophores mixtes, c'est-à-dire pourvus de groupes

bidentates de nature différente comme la pyoverdine **27** (*Pseudomonas aeruginosa*), qui contient un motif catéchol et deux groupes hydroxamates (Figure 24).

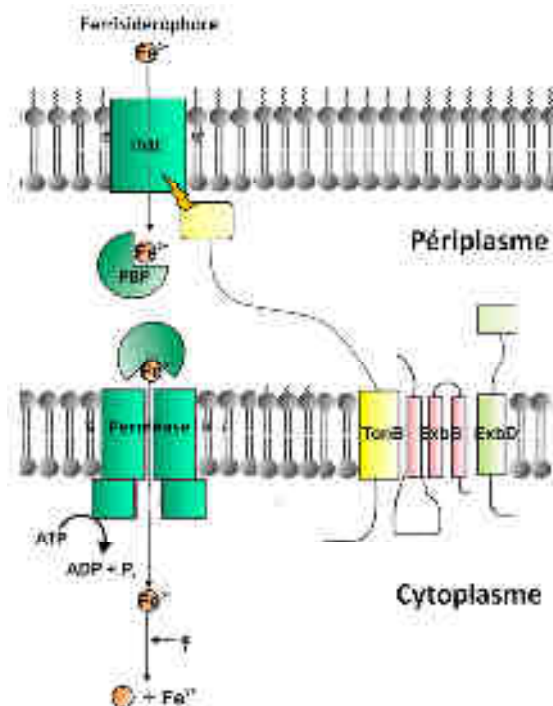


**Figure 24** : Structures de quelques sidérophores bactériens représentatifs. Les hétéroatomes impliqués dans la complexation de l'ion ferrique sont colorés en rouge.

Cette diversité structurale est à l'origine d'une large palette de stœchiométries de complexation ligand/Fe(III). Ainsi, des sidérophores comme la pyoverdine **27**, l'entérobactine **29** ou le ferrichrome **28**, qui possèdent trois groupes bidentates, sont capables de lier l'ion ferrique avec une stœchiométrie 1:1. Il faut par contre trois cépabactines **25** pour complexer un ion Fe(III). L'acide rhodotorulique **26** et la pyochéline **30** sont des cas plus complexes : dans le premier cas, trois ligands doivent s'associer pour complexer deux ions Fe(III) ; dans le second, deux ligands sont nécessaires pour complexer un ion Fe(III).<sup>132, 133</sup>

Comme le montrent ces exemples, l'évolution a fait apparaître une multitude de sidérophores de structures différentes, qui ont pourtant une fonction commune : solubiliser et chélater le fer pour former des complexes souvent très stables ( $pFe = 35,5$  pour l'entérobactine **29**).<sup>131</sup> Le complexe sidérophore-Fe(III) ou ferrisidérophore, une fois formé, doit entrer à l'intérieur du microorganisme. La diversité structurale qui prévaut parmi les sidérophores implique que les mécanismes d'incorporation peuvent sensiblement différer d'une espèce bactérienne et/ou d'un sidérophore à l'autre.<sup>115</sup> Néanmoins, des aspects

communs permettent de proposer un schéma de fonctionnement général. Les sidérophores sont synthétisés dans le cytoplasme et dans le périplasma<sup>134, 135</sup> puis sont exportés vers le milieu extracellulaire, grâce à des pompes à efflux.<sup>136</sup> Les sidérophores complexent le fer disponible dans le milieu extracellulaire ou peuvent entrer en compétition avec les protéines de stockage de l'hôte. Le ferrisidérophore ainsi formé est reconnu par un transporteur spécifique enchâssé dans la membrane externe de la bactérie,<sup>137-139</sup> avant d'entrer dans la cellule par un mécanisme de transport TonB-dépendant.<sup>90</sup> La dissociation des complexes sidérophore-fer a généralement lieu dans le cytoplasme (Figure 25), bien que des exceptions existent, comme dans le cas de la pyoverdine **27** qui est dissociée du fer dans le périplasma.<sup>115, 140</sup> La dissociation du fer de son sidérophore se fait soit par dégradation enzymatique du sidérophore, soit par réduction du Fe(III) en Fe(II), ce dernier ayant une affinité moindre pour le chélateur.<sup>131</sup> Une hydrolyse de sidérophore a été mise en évidence dans le cas de l'entérobactine **29**,<sup>141, 142</sup> et une réduction du fer ferrique dans le cas du ferrichrome **28**.<sup>143, 144</sup> Lorsque le fer est dissocié du sidérophore par réduction, le ligand intact peut être recyclé en étant réexcrété par la bactérie, comme dans le cas de la pyoverdine **27**,<sup>145, 146</sup> ou du ferrichrome **28**.<sup>147</sup>



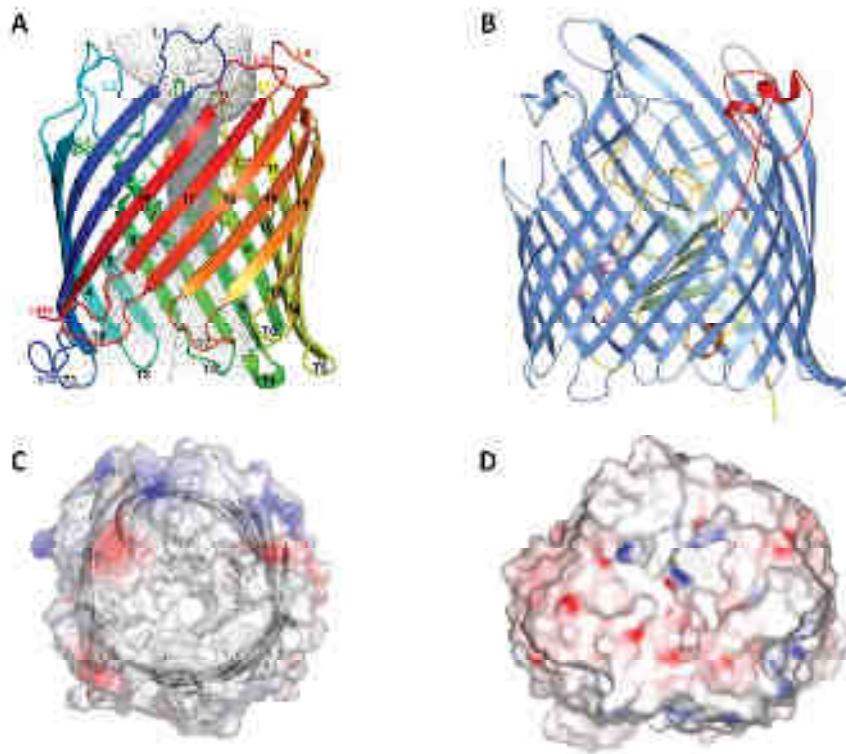
**Figure 25** : Schéma général du système d'acquisition du fer(III) par les sidérophores. Modifié d'après Krewulak *et al.*<sup>113</sup>

Les bactéries sont donc capables de subvenir à leurs besoins en fer en déployant des stratégies variées, et cela quel que soit l'environnement colonisé. Toutefois, le fer ferrique est toujours transporté de manière active dans les bactéries, selon un mécanisme commun : le transport TonB-dépendant, dont nous allons présenter ici les principaux acteurs moléculaires et les principales étapes.

## 2. Mécanisme général du transport TonB-dépendant

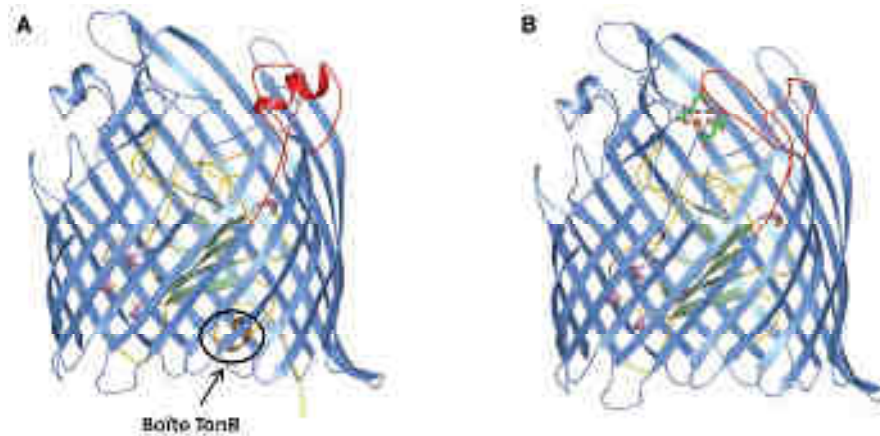
### a) Reconnaissance de la source du fer par les transporteurs de membrane externe

L'incorporation du fer dans la cellule commence par la reconnaissance de la source de fer(III) par un transporteur spécifique enchâssé dans la membrane externe de la bactérie. Les TME des ferriprotéines, de l'hème ou des sidérophores, présentent de faibles homologies de séquences (~ 20 %) mais partagent des caractéristiques communes tant au niveau de leur structure tridimensionnelle que de leur mode de fonctionnement.<sup>100</sup> Les structures cristallographiques des transporteurs spécifiques de l'entérobactine **29** FepA,<sup>148</sup> du ferrichrome **28** FhuA,<sup>149, 150</sup> du citrate **24** FecA<sup>151</sup> d'*Escherichia coli*, de l'hème HasR de *Serratia marcescens*<sup>119</sup> et de la pesticine FyuA de *Yersinia Pestis*<sup>152</sup> ont été décrites dans la littérature. Les structures des transporteurs de l'hème ShuA de *Shigella dysenteriae*, de l'alcaginine FauA de *Bordetella pertussis*, de la pyoverdine **27** FpvA et de la pyochéline **30** FptA, les deux sidérophores de *Pseudomonas aeruginosa*, ont été résolues par notre équipe.<sup>153-157</sup> Bien que les structures tridimensionnelles de ces transporteurs montrent qu'ils sont constitués d'un tonneau de 22 brins  $\beta$  antiparallèles reliés par des boucles, ce ne sont pas de simples porines. En effet, le tonneau est complètement obstrué par un domaine globulaire N-terminal appelé bouchon (Figure 26).<sup>113, 119, 148, 149, 151, 153, 154, 158</sup> Ce domaine bouchon interagit avec le tonneau  $\beta$  grâce à de nombreuses liaisons hydrogène et des ponts salins, et est indispensable au fonctionnement du transporteur. En effet, le tonneau sans bouchon est incapable de transporter des substrats dans la cellule.<sup>159</sup>



**Figure 26** : Structures cristallographiques : **(A)** de la porine PfBenF de *Pseudomonas fluorescens*. Les brins  $\beta$  du tonneau sont colorés en arc-en-ciel, le pore est représenté en pointillés ; **(B)** du transporteur de membrane externe FecA d'*Escherichia coli*. Le tonneau  $\beta$  est représenté en bleu et le bouchon est multicolore. Représentations surfaciques depuis la face extracellulaire : **(C)** de PfBenF. Le canal est bien visible ; **(D)** de FecA. Le bouchon empêche l'entrée de tout substrat par diffusion passive. Les surfaces sont colorées selon leur potentiel électrostatique (positif en rouge, négatif en bleu). Modifiée d'après Sampathkumar *et al.* et Ferguson *et al.*<sup>151, 160</sup>

Certains TME ont été co-cristallisés avec leur ligand, mettant en évidence une poche de liaison spécifique localisée du côté extracellulaire et se composant de résidus appartenant au bouchon et au tonneau (Figure 27).<sup>119, 138, 150, 151, 161</sup> Lorsque le ligand est reconnu par son transporteur, de longues boucles extracellulaires du tonneau se referment, empêchant d'une part le relargage du substrat dans le milieu extracellulaire, et d'autre part l'entrée d'autres substrats dans la bactérie. La fermeture des boucles extracellulaires entraîne une série de changements conformationnels au sein du bouchon, permettant à une séquence de la partie N-terminale du bouchon, appelée boîte TonB, de devenir flexible et d'interagir avec la partie périplasmique de la protéine TonB.<sup>151, 155</sup>



**Figure 27** : Structure cristallographique du transporteur FecA (A) sans ligand, et (B) avec ligand : le citrate, coloré en vert clair, chélate deux ions ferriques (sphères oranges). Le tonneau  $\beta$  est représenté en bleu. Les boucles extracellulaires qui subissent des changements conformationnels majeurs lors de la liaison du ligand sont colorées en rouge. Les feuillettes  $\beta$  du bouchon sont présentés en vert foncé, les hélices en violet et les boucles en jaune. La boîte TonB est visible sous forme d'hélice lorsque le transporteur est sous forme apo ; sous forme holo, cette partie devient flexible et n'apparaît plus sur la structure cristallographique. D'après Ferguson *et al.*<sup>151</sup>

L'interaction entre TonB et le TME permet le transfert d'énergie nécessaire à la formation d'un canal au centre du transporteur, entraînant l'entrée du ligand dans l'espace périplasmique.<sup>101, 158, 162, 163</sup> Cette interaction protéine-protéine est donc cruciale. En effet, il n'y a pas de source d'énergie disponible au niveau de la membrane externe et dans le périplasme. L'énergie requise pour le transport actif à travers la membrane externe réside au niveau de la membrane interne : il s'agit de la force proton motrice. Celle-ci est couplée aux transporteurs de membrane externe grâce à la machinerie TonB, dont nous allons à présent détailler la structure et la fonction.

#### b) La machinerie TonB : caractéristiques structurales et fonctionnelles

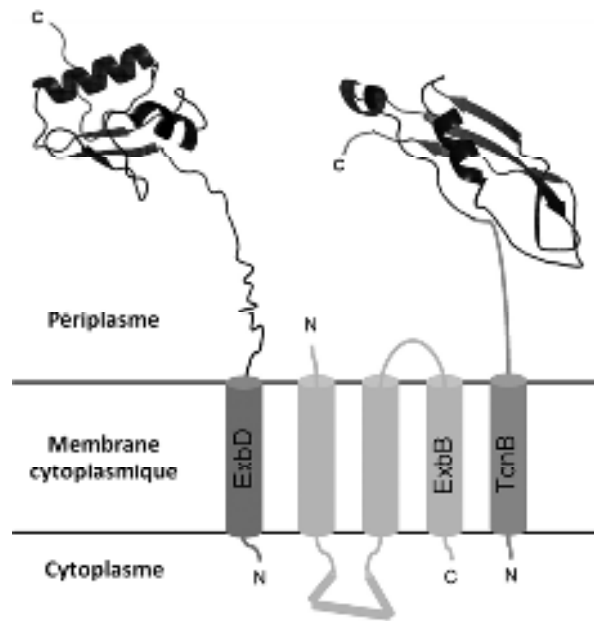
La machinerie TonB peut être considérée comme la clef-de-voûte du système de transport actif des nutriments dans les bactéries à Gram négatif. En effet, cette machinerie est non seulement impliquée dans les systèmes d'acquisition du fer, mais aussi dans le transport d'autres nutriments essentiels, tels que la vitamine B12, le cuivre, et même certains sucres chez *Xanthomonas campestris* ou *Caulobacter crescentus*.<sup>102, 164-166</sup> Ainsi, des mutations dans les boîtes TonB des TME conduisent à des transporteurs inactifs, de même que la délétion de la protéine TonB génère des souches bactériennes incapables de

proliférer.<sup>167, 168</sup> Ces processus sont également totalement inhibés lorsque les cellules sont traitées avec des protonophores qui annulent la force proton motrice.<sup>169</sup>

L'expression de cette machinerie moléculaire complexe est induite dans des conditions de carence en fer. La machinerie TonB active est constituée d'un complexe multimérique de trois protéines de membrane interne, TonB, ExbB, et ExbD, dont la stœchiométrie dans la cellule est de 1:7:2.<sup>170</sup> Au sein de cette machinerie, la protéine qui, structurellement, est la moins bien connue est ExbB. Il s'agit d'une protéine de membrane interne de 26 kDa qui possède trois segments transmembranaires, reliés par des boucles principalement localisées dans le cytoplasme (Figure 28).<sup>171</sup> *In vitro*, ExbB peut former des oligomères de quatre à six protéines, mais l'existence *in vivo* de ces "plateformes" dans lesquelles viendraient s'ancrer TonB et ExbD n'a pas encore été démontrée.<sup>172, 173</sup>

ExbD, quant à elle, est une protéine de 17 kDa qui possède une seule hélice transmembranaire en position N-terminal (résidus 23-43), un court fragment localisé dans le cytoplasme (résidus 1-22), et un domaine globulaire en C-terminal (résidus 44-141) situé dans le périplasme (Figure 28). La structure de ce domaine (résidus 63-133), résolue par RMN, montre que ExbD forme deux hélices  $\alpha$  localisées sur une des faces d'un feuillet  $\beta$  composé de 5 brins  $\beta$ .<sup>174, 175</sup>

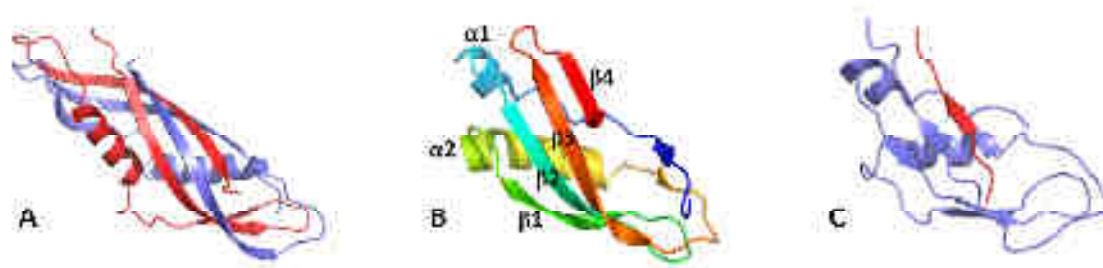
Enfin, l'élément central de la machinerie, TonB, est une protéine de 26 kDa constituée de trois domaines possédant chacun des motifs hautement conservés. Le domaine N-terminal (résidus 1-65) est une hélice transmembranaire qui permet l'ancrage de la protéine dans la membrane interne.<sup>176</sup> Une région particulièrement riche en proline (résidus 66-102), appelée bras poly-Pro, possède une structure très ordonnée et très rigide et s'étend dans le périplasme sur 15 nm environ, permettant à TonB d'atteindre les transporteurs de membrane externe.<sup>177, 178</sup> Un domaine globulaire périplasmique se trouve à la suite du bras poly-Pro (Figure 28).



**Figure 28 :** Topologie transmembranaire des protéines formant la machinerie TonB d'*E. coli*.<sup>173</sup>

Bien qu'il n'existe pas de structure pour la protéine TonB entière, la structure tridimensionnelle du domaine globulaire a été résolue pour la première fois par rayons X en 2001.<sup>179</sup> Le domaine C-terminal de TonB (résidus 164–239) se présente sous la forme d'un dimère de forme cylindrique (Figure 29.A). Chaque monomère est constitué de trois brins  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$ . Les deux monomères interagissent *via* les trois brins  $\beta$ , formant un large feuillet  $\beta$ . La structure du domaine C-terminal de TonB réalisée à partir d'une construction plus longue (résidus 103-239) a été résolue par RMN en 2005 (Figure 29.B).<sup>180</sup> La protéine, cette fois sous forme monomérique, révèle deux domaines distincts : un domaine N-terminal non structuré et un domaine bien défini en C-terminal (résidus 152-239). Ce domaine est replié en quatre brins  $\beta$  antiparallèles formant un feuillet entouré de deux hélices  $\alpha$ . Dans le même temps, les rayons X ont permis de résoudre la structure de la partie périplasmique (résidus 158-235) de TonB co-cristallisée avec deux transporteurs TonB-dépendants d'*E. coli*, le transporteur du ferrichrome FhuA et celui de la cobalamine BtuB (Figure 29.C).<sup>181, 182</sup> La protéine est repliée en trois brins  $\beta$  entourés de deux hélices  $\alpha$ . L'interaction avec le transporteur passe par la formation d'un feuillet  $\beta$  entre TonB et la boîte TonB des TME.

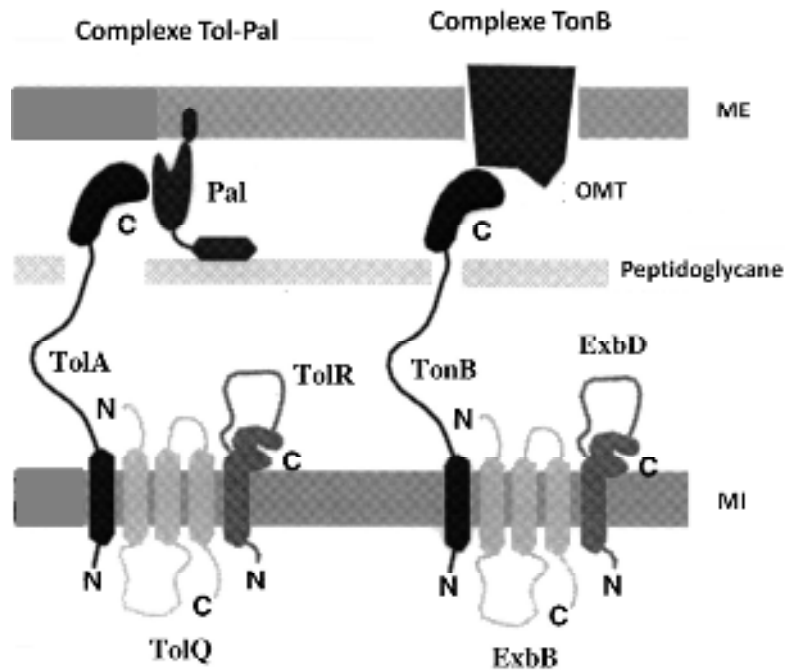




**Figure 29** : La protéine TonB. **A.** Représentation de la structure cristallographique du dimère de TonB (PDB ID : 1IHR). Chaque monomère est représenté par une couleur différente.<sup>179</sup> **B.** Structure tridimensionnelle du domaine C-terminal de TonB résolue par RMN (PDB ID : 1XX3). Coloration partant du bleu pour la partie N-terminale, au rouge pour la partie C-terminale.<sup>183</sup> **C.** Structure cristallographique de la partie périplasmique de TonB (en bleu) en complexe avec FhuA, dont seule la boîte TonB est représentée en rouge (PDB ID : 2GRX).<sup>181</sup> Images réalisées avec PyMol.<sup>105</sup>

Il semblerait que la protéine TonB reste associée à la membrane externe même lorsque la protéine n'interagit pas avec les TME. Il a été montré par pontage chimique *in vivo* que TonB interagit avec les lipoprotéines Lpp associées au peptidoglycane et avec OpmA.<sup>184, 185</sup> TonB pourrait donc être associée à la membrane externe *via* ces protéines avant ou après le processus de transduction d'énergie.

Le fonctionnement de la machinerie TonB, et plus particulièrement son énergisation, reste encore mal connu. Des hypothèses sur le fonctionnement de cette machinerie moléculaire complexe ont été formulées en faisant des analogies avec des systèmes homologues, comme le complexe Tol-Pal par exemple. Cette dernière machinerie participe au maintien de l'intégrité de la membrane externe grâce à l'interaction de TolA avec la lipoprotéine Pal, permet l'import de macromolécules et joue un rôle dans la division cellulaire (Figure 30).<sup>186-190</sup> Cette machinerie est également exploitée par les colicines et les bactériophages pour entrer dans les cellules bactériennes.<sup>191-194</sup> Bien que TonB et TolA présentent des séquences très différentes, des homologies structurales apparaissent entre leurs domaines périplasmiques et leurs domaines transmembranaires.<sup>195</sup> Ainsi, des protéines chimériques entre la partie périplasmique de TonB et le domaine N-terminal de TolA sont partiellement fonctionnelles. Les protéines ExbB et ExbD sont, quant à elles, orthogonales à TolQ et TolR.<sup>187, 196, 197</sup> Ainsi, TonB est capable de transmettre l'énergie aux TME dans un mutant de délétion *exbB-* ou *exbD-* en présence de TolQ ou TolQR respectivement.<sup>198, 199</sup>



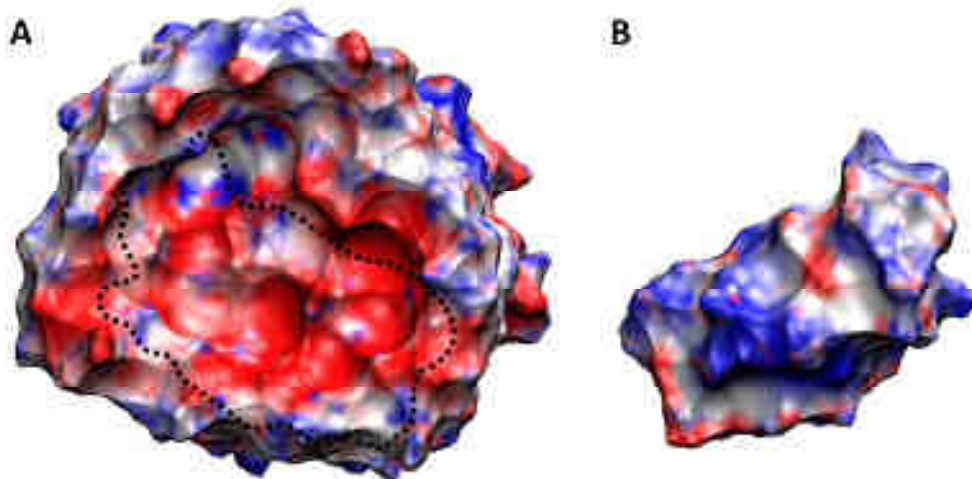
**Figure 30** : Représentation schématique des complexes Tol-Pal et TonB montrant les homologues entre les deux systèmes. Adaptée de Cascales *et al.*<sup>187</sup>

Le regroupement des connaissances des systèmes Tol-Pal et TonB a aidé la communauté scientifique à formuler des hypothèses quant au fonctionnement de ces deux machineries. Alors que l'activité de TolA dépend du complexe TolQR et de la force proton motrice (pmf),<sup>187, 200</sup> l'activité de TonB dépend également de la pmf et de ExbBD.<sup>169, 198, 201, 202</sup> Les protéines du complexe TonB doivent interagir par leurs segments transmembranaires pour permettre un transport actif,<sup>176, 202-205</sup> tout comme les trois protéines TolAQR.<sup>187, 206, 207</sup> Les interactions entre les protéines TonB et ExbBD au sein de la membrane interne ont été montrées principalement par des approches biochimiques. L'interaction directe entre les deux protéines TonB et ExbB a été obtenue par pontage chimique *in vivo*.<sup>176, 208-210</sup> Les interactions entre les protéines ExbB et ExbD d'une part, et ExbB et TonB d'autre part, ont été montrées *in vitro* à l'aide d'une protéine ExbB fusionnée à une étiquette 6-histidine,<sup>211</sup> et *in vivo* par pontage chimique.<sup>205</sup> L'interaction entre TonB et ExbD aurait également lieu *via* l'ancre transmembranaire de TonB, cette interaction dépendant de l'énergisation de la membrane interne.<sup>204, 212</sup> Les interactions transmembranaires entre TonB et ExbBD servent à la fois à stabiliser, mais aussi à énergiser la protéine TonB.<sup>213, 214</sup> En effet, toujours par analogie avec le système Tol-Pal, un canal ionique se formerait à l'interface des segments transmembranaires d'ExbBD.<sup>207</sup> Alors que le complexe TolQR convertit la force proton

motrice en énergie mécanique nécessaire au changement conformationnel de TolA et à son interaction avec Pal, le flux de protons traversant ExbB et ExbD pourrait générer un changement de conformation de TonB préalable à son interaction avec les TME.<sup>201, 214, 215</sup> Cette hypothèse est en accord avec le fonctionnement de MotA et MotB, qui constituent le moteur du flagelle bactérien et qui présentent également de fortes homologies avec les protéines ExbB et ExbD.<sup>187</sup> Les protéines MotA et MotB se situent à la base du flagelle et constituent le stator du moteur flagellaire.<sup>216</sup> Il semblerait que les protons traversant un pore formé par MotA et MotB engendrent une rotation d'une protéine associée, et donc un mouvement du flagelle. On peut donc supposer que le flux de protons traversant ExbB et ExbD peut générer l'énergisation par rotation ou changement conformationnel de la protéine TonB.<sup>205, 210, 212, 217</sup> L'énergie emmagasinée par TonB va ensuite être transférée aux TME par un mécanisme encore mal connu et sujet à de nombreuses hypothèses et controverses.<sup>185, 218-221</sup>

### c) Interaction TonB-transporteur

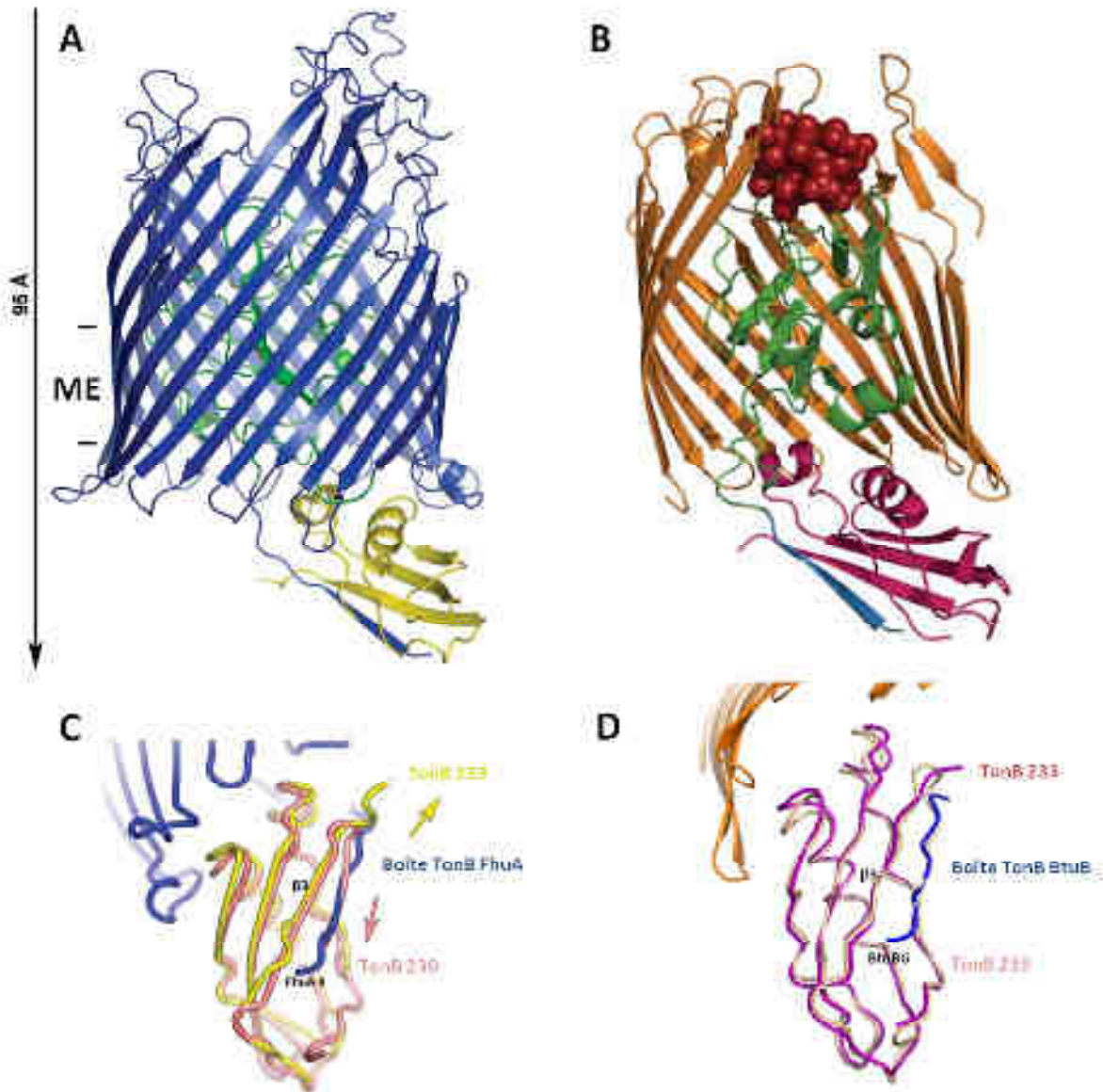
La liaison d'un substrat sur la face externe du transporteur induit des changements conformationnels à l'intérieur de celui-ci. Ces mouvements entraînent non seulement l'exposition de la boîte TonB dans le périplasme,<sup>222, 223</sup> mais aussi une modification du potentiel électrostatique de la zone située près de la boîte TonB. La liaison de la cobalamine au transporteur BtuB induit ainsi une augmentation du potentiel négatif de la zone d'interaction avec TonB, alors que TonB est chargée positivement (Figure 31).<sup>158</sup> Des interactions électrostatiques de longue distance permettraient donc à TonB de se rapprocher du TME, puis de s'associer à sa boîte TonB.<sup>224</sup>



**Figure 31 :** Représentation surfacique du potentiel électrostatique de TonB et du transporteur BtuB. Surfaces complémentaires de (A) la face périplasmique de BtuB, et (B) de la face de TonB orientée vers BtuB. Le potentiel électrostatique de la surface est coloré de -5 kT/e (en rouge) à +5 kT/e (en bleu). Les pointillés indiquent la position de TonB sur BtuB dans le complexe.<sup>224</sup>

De nombreuses preuves génétiques et biochimiques indiquent que le domaine C-terminal de la protéine TonB interagit avec les transporteurs de membrane externe par l'intermédiaire de leur boîte TonB. Cette interaction a été mise en évidence *in vivo* par mutagénèse dirigée et par pontage chimique entre le domaine C-terminal de la protéine TonB et les transporteurs BtuB, FepA et FhuA.<sup>208, 225-227</sup> Elle a également été caractérisée *in vitro* par copurification de TonB avec 6His-FhuA,<sup>228</sup> par formation de ponts disulfures entre TonB et les transporteurs BtuB et FecA préalablement modifiés,<sup>229, 230</sup> par résonance plasmonique de surface (SPR) pour caractériser l'interaction entre TonB et FpvA,<sup>231</sup> et par gels d'acrylamide non dénaturants.<sup>232</sup> Une série de mutants de délétion du domaine C-terminal de la protéine TonB a révélée que les 48 derniers résidus de la protéine TonB sont essentiels à l'interaction avec le transporteur FepA.<sup>233</sup> Cette interaction a été également caractérisée par RMN. Des expériences HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N ont montré que le domaine C-terminal (103-239) de la protéine TonB interagit avec des décapeptides mimant les boîtes TonB des transporteurs FhuA, FepA et BtuB d'*E. coli*, par l'intermédiaire du brin  $\beta$ 3 de son domaine C-terminal.<sup>180</sup> Cette hypothèse a ensuite été confirmée par la résolution des structures cristallographiques des complexes TonB-FhuA et TonB-BtuB.<sup>181, 182</sup> En comparant les structures de TonB dans la structure cristallographique des complexes et dans la structure RMN, il apparaît que le

brin  $\beta 4$  de TonB est échangé avec la boîte TonB du transporteur dans le complexe TonB-TME (Figure 32).



**Figure 32 :** Structures cristallographiques (A) du complexe TonB-FhuA sous sa forme apo (PDB ID : 2GRX). Le bouchon du transporteur est représenté en vert, le tonneau en bleu, de même que la boîte TonB, qui interagit avec TonB représentée en jaune. (B) du complexe TonB-BtuB sous sa forme holo (PDB ID : 2GSK). La cobalamine est représentée par des sphères rouges. Le tonneau du transporteur (en coupe) est représenté en orange, le bouchon en vert, et la boîte TonB en bleu. Elle interagit avec TonB représentée en violet.<sup>181, 182</sup> Superposition de la structure de TonB résolue par RMN (PDB ID : 1XX3) (en rose) avec (C) TonB (en jaune) en complexe avec FhuA. (D) TonB (en violet) en complexe avec BtuB.

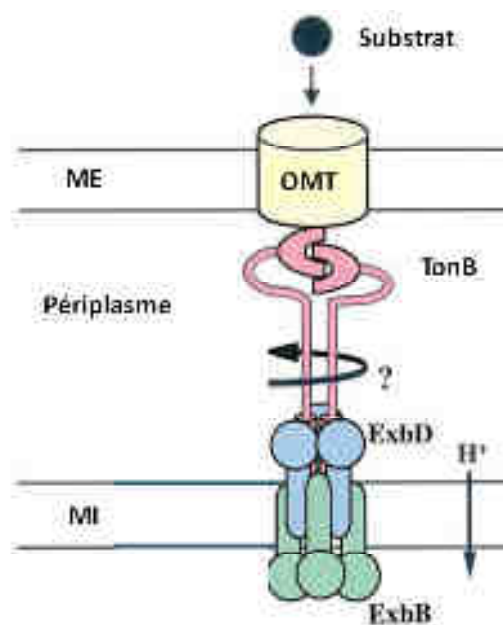
Cette interaction TonB-TME est à l'origine du transfert d'énergie nécessaire à l'ouverture du pore, et à l'entrée de nutriments dans la cellule.

d) Transfert d'énergie entre TonB et le transporteur

L'énergie d'activation permettant le transport à travers la membrane externe a récemment été évaluée à 33-35 kcal/mol.<sup>234</sup> Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le transfert d'énergie de TonB aux transporteurs de membrane externe.<sup>185, 218-221</sup>

Le premier mécanisme, appelé "navette", propose une désassociation de TonB de la membrane interne lui permettant d'interagir avec les TME, puis un retour à son état initial, ancré dans la membrane.<sup>220, 235, 236</sup> Ce modèle est basé sur le résultat d'un fractionnement cellulaire ayant permis de localiser 60 % de la protéine TonB au niveau de la membrane interne et 40 % au niveau de la membrane externe,<sup>221</sup> ainsi que sur l'accessibilité périplasmique d'un résidu situé à l'extrémité du domaine N-terminal de TonB, normalement situé dans le cytoplasme.<sup>220</sup> Cependant, ce mécanisme qui implique une extraction totale de TonB de la membrane interne semble difficilement envisageable pour des raisons énergétiques, et a été abandonné depuis peu.<sup>218</sup>

La seconde hypothèse suggère que l'énergisation de TonB permettrait à la protéine de s'étendre dans le périplasme et d'interagir avec les TME.<sup>178, 224, 231, 235</sup> Ce modèle, appelé "rotation", est fondé sur les études cristallographiques du domaine C-terminal de TonB le décrivant sous la forme d'un dimère.<sup>179</sup> La protéine TonB reste associée à la membrane cytoplasmique en complexe avec ExbB/D. Grâce à la force proton motrice de la membrane cytoplasmique, la partie C-terminale de la protéine TonB subirait un mouvement de rotation initié par les deux protéines ExbB et ExbD, ce qui serait en adéquation avec le fonctionnement du système analogue MotA/MotB. Ce mouvement de torsion serait transmis *via* le domaine C-terminal de TonB au transporteur de membrane externe (Figure 33). Ce transfert d'énergie conformationnelle entraînerait alors un déplacement total ou partiel du bouchon dans le périplasme et l'entrée des nutriments dans la cellule.<sup>163, 237</sup>



**Figure 33** : Transduction d'énergie au récepteur *via* le complexe TonB par le modèle "rotation". La partie C-terminale de la protéine TonB, grâce à la pmf, va subir un mouvement de rotation initié par les deux protéines ExbB et ExbD. Grâce à son bras poly-Pro, TonB va interagir avec le récepteur au niveau de la membrane externe et va lui transmettre l'énergie nécessaire au transport, son domaine N-terminal restant associé à la membrane interne. Schéma adapté de Chang *et al.*<sup>179</sup>

Ce modèle, basé sur la résolution de la structure cristallographique de TonB, puis alimenté par d'autres études, suppose que cette protéine se présente et fonctionne sous forme dimérique *in vivo*.<sup>179, 238, 239</sup> Cependant, plusieurs faits expérimentaux remettent en cause cette hypothèse. D'une part, la protéine TonB est une protéine peu abondante au sein des cellules bactériennes.<sup>170</sup> Un fonctionnement sous forme dimérique la rendrait donc encore plus rare et limiterait d'autant les possibilités d'interaction avec les TME. D'autre part, la structure cristallographique du dimère de TonB montre que les brins  $\beta 3$  du feuillet sont engagés dans l'interaction entre les deux monomères. Ces brins ne sont donc pas disponibles pour interagir avec la boîte TonB des TME, alors qu'il a été clairement montré par RMN et rayons X que l'interaction TonB-TME est liée à l'association du brin  $\beta 3$  de TonB avec la boîte TonB du transporteur.<sup>180-182, 240</sup> Par ailleurs, la résolution par RMN de la structure d'un fragment périplasmique de TonB plus long montre que la protéine se présente sous forme monomérique en solution.<sup>180</sup> Cette forme, plus flexible, autorise davantage les changements de conformation que la structure dimérique, beaucoup plus

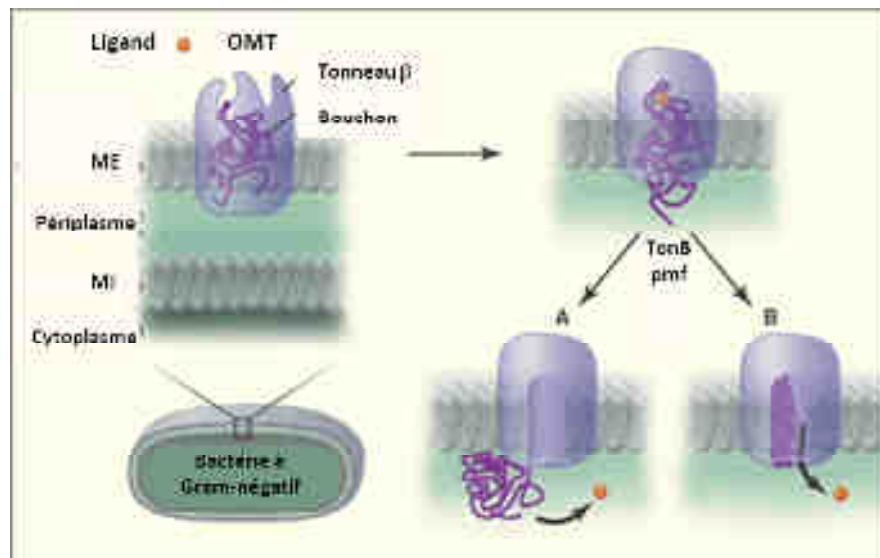


rigide.<sup>241, 242</sup> De plus, les résultats d'une étude de l'interaction entre la partie périplasmique de TonB fusionnée à une étiquette GST et le transporteur FpvA par SPR sont en faveur d'une interaction 1:1.<sup>231</sup> Enfin, la formation de dimères de TonB *in vivo* a récemment été réfutée grâce à l'absence de formation de ponts disulfures entre des protéines TonB modifiées à cet effet.<sup>243</sup>

Aucune théorie n'est donc capable, à ce jour, de proposer un mécanisme de transfert d'énergie conformationnelle entre TonB et les transporteurs de membrane externe qui soit en accord avec les données expérimentales à disposition.

#### e) Entrée du substrat dans le périplasma

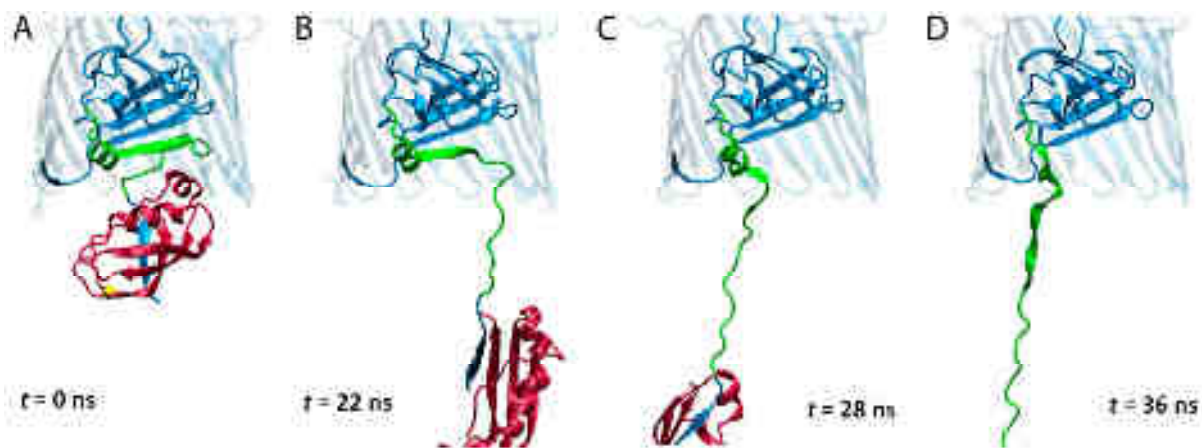
L'énergie fournie par l'association de TonB avec les transporteurs de membrane externe permet l'ouverture d'un canal au sein du TME. La création de ce passage est fondamentale car elle permet l'entrée des nutriments dans la cellule. La formation du pore au sein du tonneau peut se faire de deux manières : le bouchon peut sortir entièrement dans le périplasma, ou bien subir des changements conformationnels importants (Figure 34).<sup>162, 163</sup>



**Figure 34** : Au départ, le TME est dans une conformation qui lui permet de lier son ligand. Une fois lié, les boucles extracellulaires se referment sur le ligand. Dans le même temps, des changements conformationnels se propagent jusqu'à la face périplasmique du transporteur. L'interaction avec une forme énergisée de TonB permet l'ouverture d'un pore, soit (A) par déplacement total du bouchon dans le périplasma, soit (B) par réarrangement conformationnel du bouchon créant un passage par lequel le ligand peut entrer dans la cellule. Modifiée d'après Postle *et al.*<sup>163</sup>

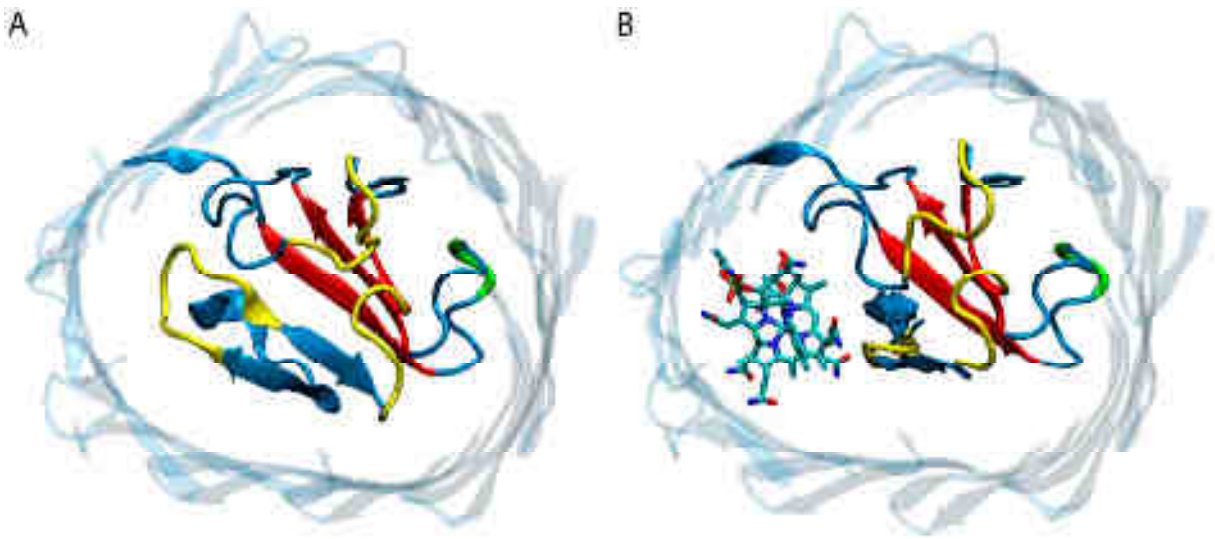


Une sortie complète du bouchon dans l'espace périplasmique paraît peu probable, car l'énergie nécessaire à la rupture des liaisons hydrogène entre le tonneau et le bouchon serait considérable.<sup>158, 224</sup> Il est plus facilement envisageable que le bouchon subisse à la fois un réarrangement conformationnel et une sortie partielle dans le périplasma pour libérer un passage au substrat. Une étude de modélisation moléculaire a été réalisée pour évaluer la solidité de cette hypothèse. D'après le modèle "traction", TonB pourrait tirer sur le bouchon afin d'en entraîner une partie dans le périplasma. Une simulation moléculaire dynamique a été réalisée en partant de la structure cristallographique du complexe TonB-BtuB, afin de vérifier si un canal pourrait se former par ce mécanisme.<sup>224</sup> Les résultats indiquent une forte interaction entre TonB et la boîte TonB de BtuB, qui persiste lorsque la protéine TonB est tirée dans le périplasma à une vitesse de 2,5 à 5 Å/ns. Ce mouvement de traction induit une sortie partielle du bouchon de BtuB dans le périplasma (Figure 35).



**Figure 35** : Sortie partielle du domaine globulaire de BtuB dans le périplasma. L'atome N-terminal du domaine périplasmique de TonB (en rouge) tiré lors de la simulation est représenté par une sphère jaune. La boîte TonB de BtuB est représentée en bleu. La partie du bouchon dépliée dans le périplasma est représentée en vert, le reste en bleu. Dépliement de (A) 0 Å, (B) 55 Å, (C) 70 Å, et (D) 90 Å à 2,5 Å/ns.<sup>224</sup>

La simulation montre qu'un dépliement d'environ 200 Å serait suffisant à la création d'un passage par lequel la cobalamine serait capable de transiter jusqu'au périplasma (Figure 36).

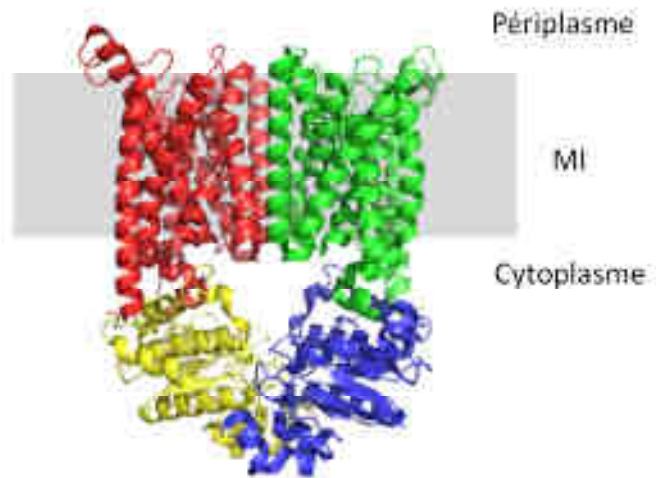


**Figure 36** : Visualisation de la face périplasmique de BtuB lors de la simulation : (A) après une traction de 150 Å, et (B) après une traction de 215 Å. La cobalamine a été rajoutée dans l'espace libéré par la sortie partielle du bouchon.<sup>244</sup>

Cette modélisation expose donc des résultats intéressants allant dans le sens du modèle "traction". Une autre étude, plus récente, réalisée par résonance paramagnétique électronique, a montré que la dénaturation du domaine globulaire de BtuB pouvait effectivement créer un canal au sein du tonneau. Le dépliement du bouchon semble se faire par étapes, *via* des changements conformationnels localisés, et serait réversible.<sup>244</sup> A ce jour, nous pouvons donc supposer que la formation du pore au sein du transporteur de membrane externe pourrait être le fruit d'un transfert d'énergie à la fois mécanique (traction d'une partie du bouchon dans le périplasma) et conformationnelle (réarrangement du bouchon) entre TonB et les transporteurs de membrane externe.

#### f) Le passage dans le périplasma et l'entrée dans le cytoplasme

Une fois dans le périplasma, le substrat est pris en charge par une protéine périplasmique spécifique jusqu'à un transporteur membranaire cytoplasmique spécifique de type ABC.<sup>245, 246</sup> Un transporteur ABC typique est constitué de quatre domaines structuraux : deux domaines transmembranaires qui forment un canal permettant le passage du ligand ferrique, et deux domaines de liaison nucléotidique qui lient et hydrolysent l'ATP, procurant ainsi l'énergie nécessaire au passage du substrat à travers la perméase (Figure 37).<sup>247-250</sup>



**Figure 37** : Structure tridimensionnelle du transporteur BtuCD (PDB ID: 1L7V) de la vitamine B12 de *E. coli*. En rouge et vert, les deux domaines transmembranaires, en jaune et bleu les deux domaines de liaison nucléotidique. Image réalisée avec PyMol.<sup>105</sup>

Les bactéries à Gram négatif peuvent déployer un ou plusieurs systèmes d'assimilation du fer ferrique en fonction des sources de fer disponibles dans leur environnement. Elles peuvent ainsi extraire le fer contenu dans les ferriprotéines de transport ou de stockage de l'hôte, récupérer le fer hémique, ou synthétiser et excréter dans le milieu extracellulaire des sidérophores capables de solubiliser le fer. Tous ces systèmes, bien que différents, sont basés sur un mécanisme de transport TonB-dépendant extrêmement performant. Ils permettent aux bactéries de subvenir efficacement à leurs besoins en fer, même si elles sont en compétition avec l'hôte ou d'autres microorganismes. Ce constat nous amène à penser que cibler les systèmes d'assimilation du fer dans un contexte thérapeutique devrait affaiblir fortement les bactéries. Cette approche est d'ailleurs reconnue comme étant l'une des voies de recherche les plus prometteuses pour la validation de nouvelles cibles biologiques et le développement de stratégies antibiotiques innovantes.<sup>251</sup>

Dans ce contexte, et par son rôle central dans les mécanismes d'assimilation du fer, la machinerie TonB est une cible particulièrement prometteuse.

**La machinerie TonB en tant  
que cible biologique : état  
de l'art**



# I. TonB, une cible biologique prometteuse

L'ensemble des protéines impliquées dans les systèmes bactériens d'acquisition du fer sont des cibles potentielles intéressantes mais peu exploitées dans le cadre du développement de nouvelles antibiothérapies.<sup>251</sup> Dans ce contexte, la machinerie TonB, véritable clef-de-voûte des systèmes d'acquisition du fer, est une cible particulièrement prometteuse pour la mise au point d'antibiothérapies à large spectre contre les bactéries à Gram négatif.<sup>252</sup> Cette affirmation repose sur les quatre caractéristiques biologiques suivantes.

## A. TonB : une protéine cruciale pour la prolifération bactérienne

Cette machinerie moléculaire complexe joue un rôle crucial non seulement dans les mécanismes d'acquisition du fer, mais aussi dans ceux d'autres nutriments essentiels qui transitent également par des transporteurs TonB-dépendants.<sup>102, 165, 166</sup> Il s'avère que les mutants de délétion *tonB*- sont incapables de transporter le fer et la vitamine B12, et sont incapables de proliférer en milieu carencé en fer,<sup>79, 253</sup> conditions rencontrées chez un hôte eucaryote au cours d'une infection. Ces souches sont également plus sensibles aux antibiotiques, et beaucoup moins virulentes.<sup>79, 254-257</sup> Les processus TonB-dépendants sont également totalement inhibés lorsque les cellules sont traitées avec des protonophores qui annulent la force proton motrice, et donc empêchent le fonctionnement de la machinerie TonB.<sup>169</sup> Par contre, les mutants *exbBD*- n'ont pas de phénotype aussi affirmé. En effet, des systèmes analogues sont capables de prendre partiellement le relais, tel que le système TolQ/TolR qui permet de maintenir 10 % de l'activité de TonB lorsque les protéines ExbB/ExbD ne sont pas exprimées.<sup>196, 198, 217, 258</sup> En outre, le peu de données disponibles quant à la structure et au fonctionnement des protéines ExbBD nous a incité à cibler préférentiellement la protéine TonB pour inhiber l'ensemble de cette machinerie.

## B. TonB : une protéine très conservée

Cette protéine est commune à un grand nombre d'espèces bactériennes : environ 70 % des bactéries à Gram négatif, dont *P. aeruginosa*, *Y. pestis*, *B. mallei* et *B. pseudomallei*, expriment au moins un variant de la protéine TonB.<sup>259</sup> Certaines espèces comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ou *Vibrio anguillarum* peuvent en effet posséder plusieurs copies de cette protéine cruciale.<sup>168, 260, 261</sup> Selon les espèces, la protéine TonB est de longueur variable : de 170 résidus pour *Bacteroides fragilis* à 700 résidus pour *Colwellia psycherythraea*.<sup>259</sup> Cependant cette protéine possède une zone très conservée au niveau de son domaine C-terminal, qui correspond au domaine d'interaction avec les transporteurs de membrane externe.<sup>259</sup> Il a ainsi été montré que les protéines TonB sont interchangeable d'une espèce bactérienne à l'autre. La partie périplasmique de TonB de *P. aeruginosa* peut interagir avec FhuA et FecA, les TME respectifs du ferrichrome **28** et du citrate **24** chez *E. coli* ; et inversement, le domaine globulaire de TonB d'*E. coli* peut interagir avec FpvA, le transporteur de la pyoverdine **27** chez *P. aeruginosa*.<sup>232</sup> De même, les boîtes TonB sont très conservées et sont interchangeables d'un transporteur à l'autre. Ainsi, un transporteur chimérique entre le transporteur FepA et la boîte TonB de BtuB est capable de transporter normalement l'entérobactine **29**.<sup>262</sup> La substitution de la boîte TonB du transporteur FecA par celle de FepA ou de FhuA résulte également en des protéines hybrides actives.<sup>230</sup> La remarquable conservation de la boîte TonB des TME et du domaine périplasmique de TonB permet à ce dernier d'interagir avec une grande variété de TME au sein des bactéries : la protéine TonB de *Caulobacter crescentus*, par exemple, est en charge du transport des nutriments gérés par 65 TME différents.<sup>263</sup>

## C. TonB : une protéine rare dans les cellules bactériennes

TonB, bien qu'indispensable à la survie des microorganismes, est une protéine relativement peu abondante au sein des bactéries. En effet, il y a quantitativement moins de TonB que de transporteurs dans une cellule. Il y a ainsi 35 fois plus de transporteurs FepA que de protéines TonB chez *E. coli*.<sup>170</sup> De plus, TonB interagit avec un grand nombre de

transporteurs TonB-dépendants différents.<sup>263</sup> Les TME sont donc en compétition pour se lier à TonB. Ainsi, le transport du ferrichrome **28** *via* FhuA inhibe partiellement le transport de la vitamine B12 *via* BtuB, et une surexpression de BtuB entraîne une inhibition du transport du ferrichrome **28** en présence de vitamine B12. Cet effet peut être compensé par une surexpression de TonB.<sup>100</sup>

## D. TonB : une protéine exclusivement bactérienne

Le rôle de la machinerie TonB est très particulier : elle permet un transfert d'énergie de la membrane cytoplasmique aux protéines enchâssées dans la membrane externe. Cette fonction est propre aux organismes qui possèdent une telle enveloppe, c'est-à-dire aux bactéries à Gram négatif.<sup>259</sup> Les cellules eucaryotes qui n'expriment pas cette machinerie, ni de protéine homologue, ne devraient donc pas être sensibles à des antibiotiques dirigés contre la protéine TonB.

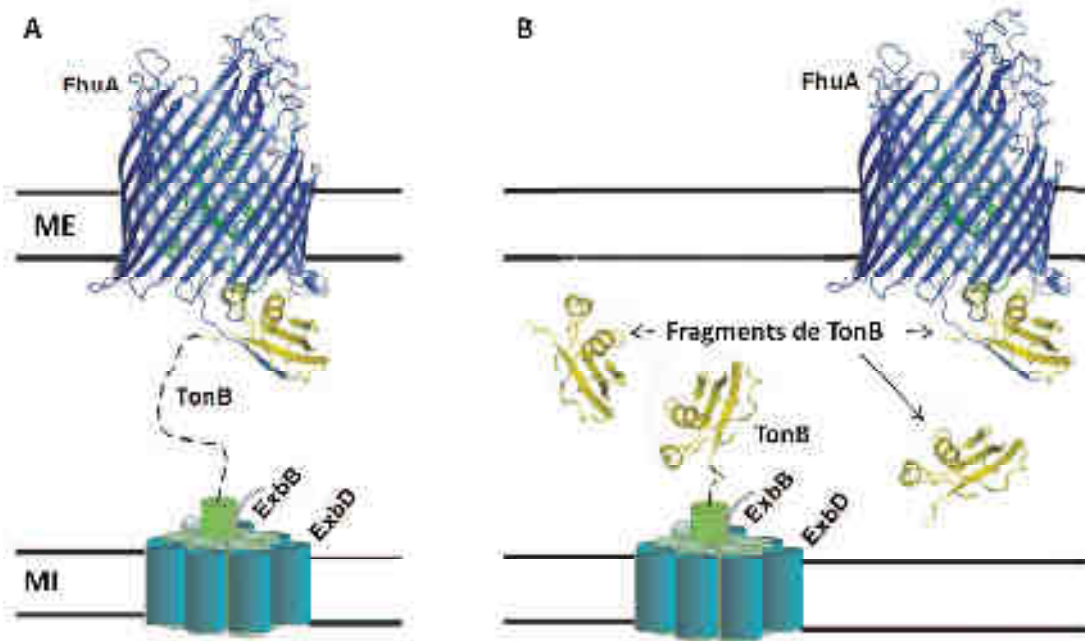
Dans le cadre de la recherche de nouvelles antibiothérapies, la protéine TonB apparaît donc comme une cible biologique idéale. En effet, c'est un maillon essentiel au transport d'un nutriment vital, le fer. Neutraliser cette protéine devrait donc avoir un effet dramatique sur la prolifération bactérienne et diminuer fortement la virulence des souches pathogènes.<sup>180</sup> Cette protéine est très conservée et très répandue chez les bactéries à Gram négatif, dont un grand nombre sont pathogènes pour l'être humain. Comme cette protéine est rare au sein des cellules, une quantité réduite d'antibiotiques devrait suffire pour affecter un grand nombre de transports TonB-dépendants. Enfin, les cellules eucaryotes n'exprimant pas la protéine TonB, ni de protéine homologue,<sup>259</sup> les antibiotiques dirigés contre TonB ne devraient pas, *a priori*, avoir d'effets indésirables pour l'hôte. De manière étonnante, la littérature ne mentionne que de rares travaux sur l'inhibition de cette protéine, sans doute à cause de la complexité du système et du fonctionnement de cette machinerie qui reste l'objet de nombreuses hypothèses. À ce jour, seules deux approches ont été proposées. Elles sont toutes deux basées sur une compétition entre la protéine native et la présence de fragments de protéines capables de perturber l'interaction TonB-TME.



## II. Inhibition de TonB : données préliminaires

### A. Inhibition par surexpression de protéines dans le périplasma

La première approche décrite utilise des souches d'*E. coli* capables de surexprimer dans le périplasma le domaine C-terminal de TonB, pour déterminer si ces fragments de TonB interfèrent avec les systèmes de transport TonB-dépendants.<sup>264</sup> Ces fragments ne contiennent pas l'ancre cytoplasmique, et sont donc incapables de répondre à la force proton motrice et de promouvoir un quelconque transport. Les cellules produisant ces fragments se sont montrées incapables de proliférer en milieu carencé en fer, même en milieu complémenté en ferrichrome ou citrate ferrique (sidérophores respectivement transportés dans *E. coli* par FhuA et FecA). La surexpression de ces fragments de TonB dans le périplasma rend également les bactéries résistantes à l'action des bactériophages  $\Phi 80$  et des colicines M, qui utilisent le transporteur FhuA pour pénétrer dans les cellules. L'inhibition des processus TonB-dépendants est en fait liée à une compétition entre les machineries TonB natives et les fragments de TonB surexprimés dans le périplasma (Figure 38).



**Figure 38** : A. Schéma de l'interaction TonB-FhuA favorable au transport actif du fer. B. Surexpression du domaine globulaire de TonB dans le périplasme qui sature le transporteur avec une protéine inactive, empêchant ainsi le transport du fer. Schéma modifié d'après Braun *et al.*<sup>162</sup>

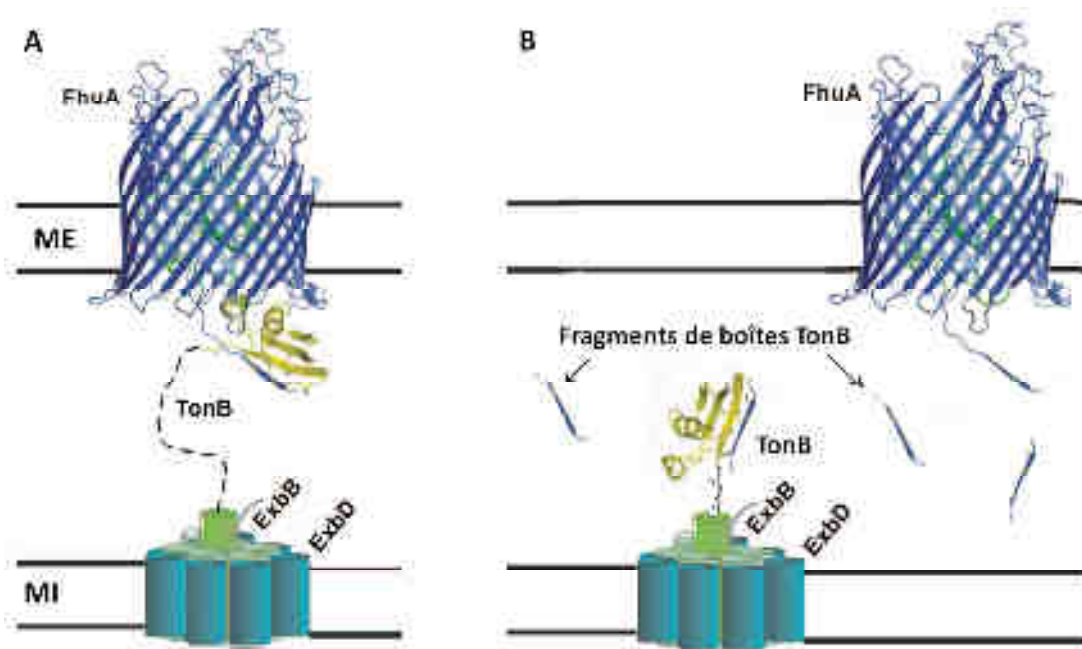
La seconde approche, développée au sein de notre équipe, utilise cette fois des souches de *P. aeruginosa* capables de surexprimer dans le périplasme le domaine N-terminal de FpvA, comportant le bouchon, la boîte TonB, et le domaine de signalisation du transporteur de membrane externe.<sup>159</sup> Des expériences de transport de <sup>55</sup>Fe ont montré non seulement que ces souches incorporent moins de fer, mais aussi qu'elles l'incorporent plus lentement. Les souches ne surexprimant que le domaine bouchon (sans la boîte TonB) transportent le fer normalement. Nous avons donc suggéré que le ralentissement du transport du fer était dû à la séquestration de TonB dans le périplasme par le domaine N-terminal de FpvA. Cette hypothèse a été confirmée par co-immunoprécipitation de TonB avec le domaine N-terminal de FpvA lorsque celui-ci comporte la boîte TonB du transporteur.<sup>159</sup>

Ces études montrent qu'une inhibition du système de transport actif du fer(III) est possible, et que les conséquences pour les bactéries sont importantes. Cependant, ils ne sont pas exploitables dans le cadre du développement de nouvelles antibiothérapies. Il est en effet difficile de faire entrer efficacement des protéines de cette taille dans les bactéries à Gram négatif, qui sont peu perméables. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement

aux résultats d'autres expériences, qui utilisent des fragments peptidiques de transporteur comme agent compétiteur.

## B. Inhibition de l'interaction TonB-TME par des peptides

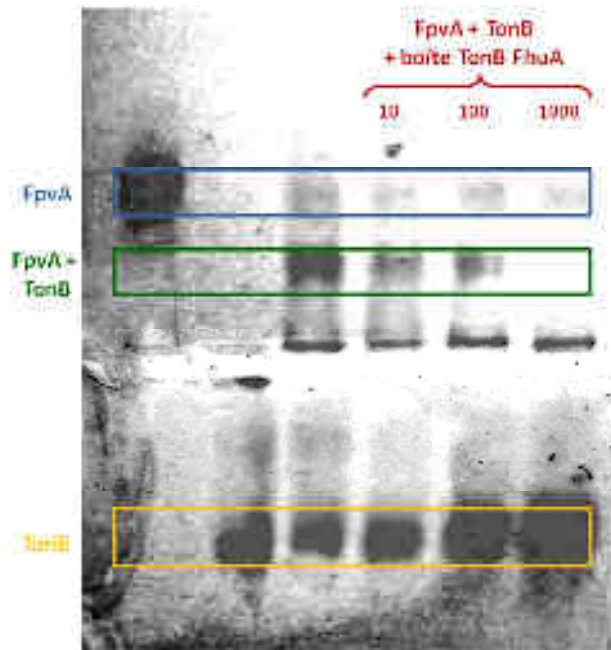
Cette étude a montré les effets du peptide Glu-Thr-Val-Ile-Val, issu de la séquence de la boîte TonB du transporteur FhuA d'*E. coli*, sur le transport TonB-dépendant.<sup>265</sup> L'addition de ce pentapeptide à des cultures d'*E. coli* ralentit considérablement la croissance bactérienne en milieu carencé en fer. Elle préserve également les microorganismes de l'effet bactéricide des colicines B et Ia, ainsi que l'infection au phage  $\Phi 80$ , qui utilisent les transporteurs FepA et FhuA pour infecter les cellules. L'inhibition est cette fois liée à une compétition entre les boîtes TonB des TME et les peptides "leurant" les protéines TonB. Celles-ci, saturées par les peptides, ne sont plus en mesure d'énergiser les TME, ce qui inhibe les transports de nutriments TonB-dépendants (Figure 39).



**Figure 39 :** A. Schéma de l'interaction TonB-FhuA favorable au transport actif du fer. B. Séquestration de TonB dans le périplasm par des fragments de boîtes TonB, empêchant l'énergisation du transporteur et donc le transport du fer. Schéma modifié d'après Braun *et al.*<sup>162</sup>

Afin de vérifier que l'effet antibiotique du peptide est bien lié à une inhibition de l'interaction TonB-TME, et non à la perturbation d'un autre système, un test d'évaluation biologique en deux temps a été développé.<sup>252</sup> Ce test a été conçu dans l'optique de réaliser un futur criblage de molécules inhibant spécifiquement TonB. Comme l'évaluation de l'inhibition de la croissance d'*E. coli* en milieu carencé en fer n'est pas adaptée au criblage à haut débit d'inhibiteurs potentiels, un pré-criblage est réalisé afin de réduire le nombre de molécules devant être testées en milieu minimum. Lors de ce test, les composés qui permettent aux bactéries de résister aux colicines B et Ia sont sélectionnés. Cela signifie en effet que ces molécules sont capables d'inactiver les systèmes de transport TonB-dépendant utilisés par les colicines pour infecter les bactéries. La capacité d'inhibition de croissance des composés retenus après ce premier criblage est ensuite évaluée en milieu minimum. En effet, l'expression de TonB étant induite dans des conditions de carence en fer, les composés inhibant TonB devraient se montrer particulièrement efficaces en milieu minimum. Le pentapeptide ETVIV, connu pour interférer avec les processus TonB-dépendants,<sup>265</sup> s'est révélé actif par ce test. Il est donc possible d'inhiber spécifiquement l'interaction TonB-transporteur avec un petit peptide.

L'inhibition de l'interaction TonB-TME par des peptides a également pu être observée *in vitro*. En effet, il est possible de visualiser par électrophorèse sur gels de polyacrylamide non dénaturants la formation de complexes entre la partie périplasmique de TonB étiquetée avec 6 histidines, et divers transporteurs de membrane externe purifiés tels que FpvA, FptA, FecA et FhuA.<sup>232</sup> Les TME et TonB migrent dans des directions opposées et forment des complexes qui migrent à des distances intermédiaires. Nous avons montré que ces complexes peuvent être destabilisés par l'addition croissante de fragments de TME comportant les boîtes TonB des transporteurs FptA, FepA, FhuA, FecA et FpvA (résultats non publiés) (Figure 40).



**Figure 40** : Visualisation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant de la dissociation du complexe TonB-FpvA par la boîte TonB du transporteur FhuA (EDTITVTA). 54 pmol de protéines TonB et FpvA sont déposées dans chaque puits, puis le peptide est ajouté en quantités 10, 100 puis 1000 fois plus importantes.

L'ensemble de ces travaux met en évidence que la protéine TonB est une cible particulièrement intéressante pour le développement d'une nouvelle classe d'antibiotiques spécifique aux bactéries à Gram négatif. Grâce à une approche pluridisciplinaire, nous avons voulu explorer deux types de stratégie d'inhibition de TonB. La première stratégie repose sur l'élaboration d'inhibiteurs non compétitifs de l'interaction TonB-TME. Cette approche, totalement novatrice et très exploratoire, consiste à rechercher des sites de liaisons dans TonB pouvant accueillir des molécules dont les structures seraient déterminées par criblage *in silico*. De tels ligands pourraient perturber l'énergisation de TonB et/ou le transfert d'énergie de TonB aux TME, ce qui, *in fine*, devrait provoquer un ralentissement, voire l'arrêt, de la prolifération bactérienne. Notre seconde stratégie s'appuie davantage sur les travaux réalisés antérieurement. Nous souhaitons en effet concevoir et synthétiser des inhibiteurs dont la structure s'inspire des boîtes TonB des TME. Ces molécules viendraient entrer en compétition avec les boîtes TonB des transporteurs de membrane externe, empêchant ainsi le transfert d'énergie entre TonB et les TME. Les avancées réalisées sur ces deux stratégies d'inhibition de TonB, ainsi que la synthèse des inhibiteurs potentiels vont être présentées successivement.

**Conception et synthèse  
d'inhibiteurs potentiels de la  
protéine TonB**



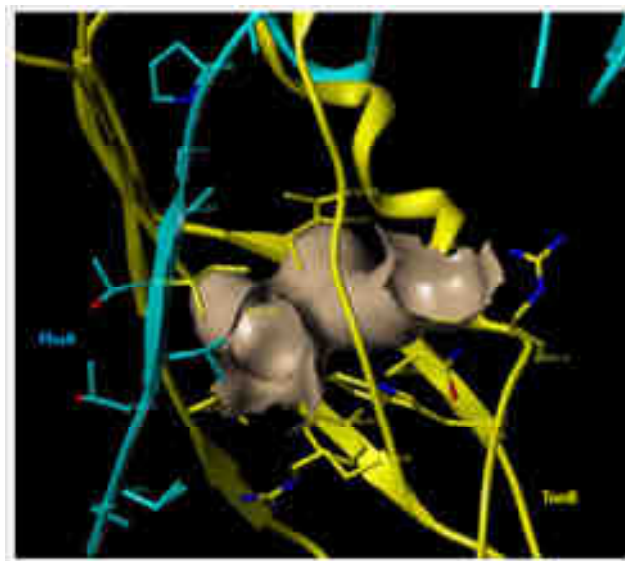
# I. Inhibiteurs non compétitifs de TonB

## A. A la recherche d'un site de liaison potentiel chez *E. coli*

Le domaine C-terminal de TonB s'avère être un domaine dynamique et flexible capable d'interagir avec différents ligands.<sup>242</sup> Cette flexibilité est mise à contribution lors de l'énergisation de TonB par ExbBD et/ou lors du transfert d'énergie aux transporteurs de membrane externe, *via* des changements conformationnels de la protéine.<sup>241</sup> Nous pourrions donc bloquer la protéine dans une conformation donnée grâce à un ligand qui viendrait s'insérer au cœur de la protéine. De tels ligands pourraient soit empêcher l'énergisation de TonB et/ou le transfert d'énergie de TonB aux TME en entravant les changements conformationnels de la protéine, soit modifier l'affinité de TonB pour les transporteurs de membrane externe. La diminution d'affinité de TonB pour les TME ralentirait fatalement les processus d'assimilation du fer. Toutefois, une augmentation d'affinité de TonB pour les TME pourrait empêcher la dissociation de TonB des TME une fois le transfert d'énergie réalisé, et par conséquent prévenir l'énergisation d'autres transporteurs. Dans tous les cas, les molécules capables de s'insérer et d'interagir fortement avec TonB devraient perturber les processus d'assimilation du fer, et par conséquent endiguer la prolifération bactérienne.

Nous avons donc recherché des sites potentiels de liaisons dans TonB qui pourraient être criblés *in silico* pour définir la structure de leurs ligands potentiels. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Didier Rognan (Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie de Strasbourg). L'exploration de la structure de la protéine TonB d'*E. coli* co-cristallisée avec le transporteur de membrane externe du ferrichrome FhuA a permis d'identifier une poche intéressante au cœur de TonB (Figure 41).





**Figure 41** : Représentation surfacique (en gris) de la poche identifiée dans TonB (en jaune) en complexe avec FhuA (en bleu). Les résidus composant la poche sont R158, N159, P161, V178, F180, I193, V206, M210, R212, W213, V226. Image obtenue avec PyMol.<sup>105</sup>

Cette poche, située à proximité du site d'interaction TonB-FhuA, est composée des résidus Arg158, Asn159, Pro161, Val178, Phe180, Ile193, Val206, Met210, Arg212, Tyr213 et Val226. Ces résidus seraient susceptibles de générer des interactions (liaisons hydrogène ou hydrophobes, ponts salins) avec des ligands de synthèse conçus à cet effet. Par conséquent, des molécules judicieusement conçues et capables de s'arrimer dans cette cavité pourraient conduire à une modification de l'affinité de TonB pour les transporteurs de membrane externe. Ce site semblait donc être un candidat de choix pour faire l'objet d'un criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles dans le but d'établir les structures d'inhibiteurs ou de modulateurs potentiels.

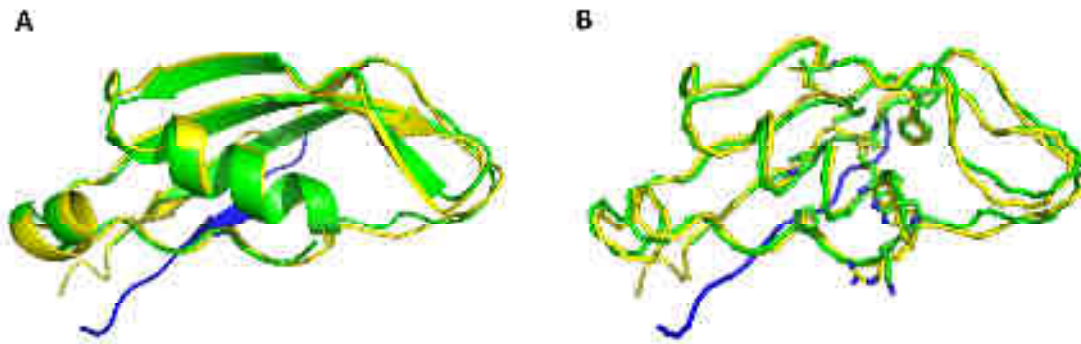
Les données structurales sur lesquelles se basent cette étude sont celles obtenues sur la protéine TonB d'*E. coli*, une bactérie modèle généralement commensale, à l'exception des souches entéropathogènes et entérohémorragiques.<sup>266</sup> Nous avons voulu extrapoler ces données à d'autres microorganismes, dont *P. aeruginosa* et *S. enterica*, organismes multirésistants aux antibiothérapies actuelles, et *Y. pestis*, organisme potentiellement utilisables par les bioterroristes. Nous avons donc voulu voir si la cavité observée sur la protéine TonB d'*E. coli* se retrouve chez d'autres bactéries, et si les acides aminés constituant cette poche sont conservés. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Annick Dejaegere (Modélisation Moléculaire, IGBMC).

## B. Une cavité conservée

Nous avons dans un premier temps aligné les séquences des domaines C-terminaux de protéines TonB appartenant à d'autres microorganismes ([Annexe 1](#)). Les séquences ont été retrouvées par BLAST, en prenant la séquence de la protéine TonB d'*E. coli* comme référence (UniprotKB ID : P02929).<sup>267</sup> 37 séquences de protéines TonB d'espèces bactériennes représentatives ([Annexe 2](#)) ont été sélectionnées puis alignées avec MUSCLE.<sup>268</sup> Les alignements des domaines C-terminaux ont été affinés avec Rascal, puis retravaillés avec Jalview.<sup>269</sup> Ces alignements de séquences ont mis en évidence que, hormis Asn159, tous les acides aminés constituant la poche hydrophobe localisée dans la protéine TonB d'*E. coli* sont conservés.

Après avoir vérifié la conservation des résidus de la cavité en étudiant la structure primaire de TonB, nous avons voulu vérifier dans un second temps que les structures tridimensionnelles étaient également conservées. Comme nous l'avons suggéré précédemment, seule la structure tridimensionnelle de la partie périplasmique de TonB d'*E. coli* a été résolue. Nous avons donc reconstruit la structure tridimensionnelle de la partie périplasmique de TonB de *P. aeruginosa* (Swiss-Prot ID : Q51368) par homologie à celle d'*E. coli* (PDB ID : 2GSK).

Le modèle a été réalisé avec Modeller, puis contrôlé par le serveur en ligne Verify3D.<sup>270, 271</sup> Les structures tridimensionnelles de la protéine TonB d'*E. coli* et du modèle de la protéine TonB de *P. aeruginosa* visualisées avec PyMOL se superposent presque parfaitement (RMSD = 0,89 Å) (Figure 42.A), ainsi que les chaînes latérales des résidus de la poche hydrophobe représentés en bâtonnets (Figure 42.B).<sup>105</sup> Ceci corrobore les données expérimentales qui montrent que la partie périplasmique de TonB de *P. aeruginosa* est capable d'interagir avec le transporteur FhuA d'*E. coli*.<sup>232</sup> Les études bioinformatiques réalisées sur les protéines d'*E. coli* devraient donc être extrapolables à *P. aeruginosa*, et inversement, ainsi qu'à d'autres microorganismes.

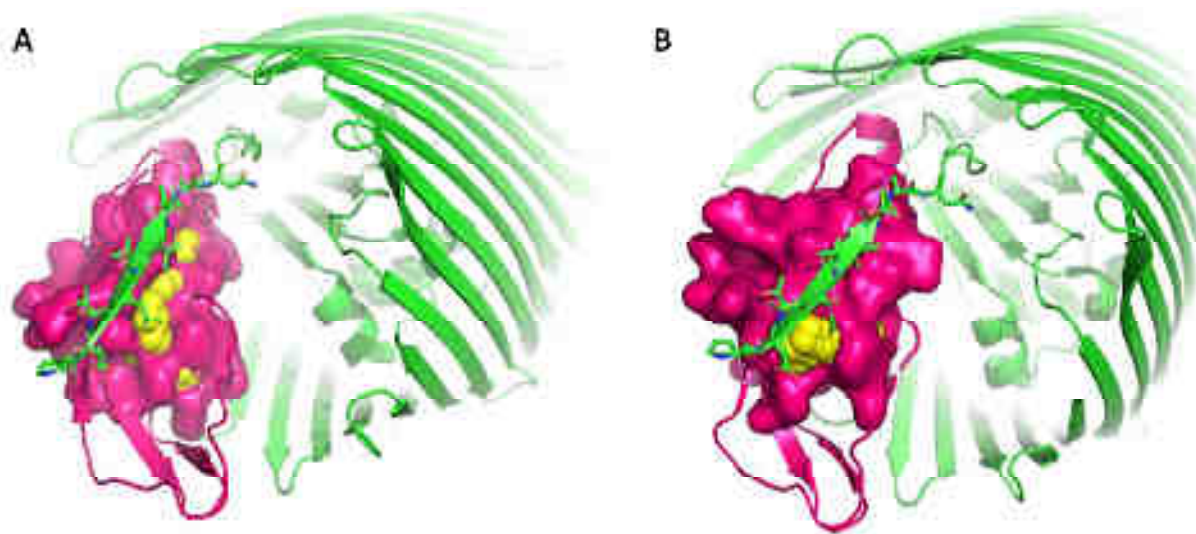


**Figure 42 :** Structures tridimensionnelles de TonB de *P. aeruginosa* (en vert) alignée sur TonB d'*E. coli* (en jaune), elle-même en complexe avec la boîte TonB de FhuA (en bleu). Superposition (A) des structures secondaires, (B) des squelettes protéiques. Les chaînes latérales des résidus formant la poche sont représentés en bâtonnets. Images réalisées avec PyMol.<sup>105</sup>

Une fois ces vérifications réalisées, nous avons voulu étudier davantage la poche hydrophobe identifiée précédemment. La protéine TonB étant une protéine flexible et à même de subir des changements conformationnels, nous avons voulu savoir quel pouvait être l'évolution du volume de cette cavité lors de la complexation de TonB avec FhuA en réalisant des simulations moléculaires dynamiques.

### C. Etude dynamique de la cavité

Avant de lancer les simulations, les extrémités N- et C-terminales de la protéine TonB de *P. aeruginosa* ont été respectivement masquées par des groupements acétyle et *N*-méthylamide. Afin de vérifier la présence et l'évolution de la taille de la poche dans la structure de la protéine lors de la complexation avec FhuA, deux simulations moléculaires dynamiques ont été lancées. Les logiciels AMBER8 et VMD ont été utilisés pour réaliser la modélisation moléculaire et l'analyse des trajectoires.<sup>272, 273</sup> Les paramètres physiques et les mesures de RMSD (*root-mean-square deviation*, ou déviation standard) ont été vérifiés après chaque simulation. La durée de la dynamique a été fixée à 1 ns, et les coordonnées structurales et l'énergie ont été enregistrées toute les 10 ps, ce qui a généré près de 100 images par trajectoire. Pour chaque image, la cavité a été détectée et son volume calculé. D'après les résultats, les structures peuvent être réparties en deux catégories : les cavités en forme de tunnel, très enfouies dans TonB (Figure 43.A), et celles qui restent plus accessible par le haut ou le bas de la protéine (Figure 43.B).



**Figure 43** : Images extraites des analyses de trajectoires. Le transporteur FhuA d'*E. coli* (en vert, PDB ID : 2GSK) est complexé avec la protéine TonB de *P. aeruginosa* (en rose), avec une représentation surfacique des résidus formant la poche. La cavité présumée est marquée par des sphères jaunes. **A.** Image 1 de la trajectoire, cavité de 87 Å<sup>3</sup>. **B.** Image 79 de la trajectoire, cavité de 76 Å<sup>3</sup>.

Cependant, il s'est avéré que la cavité se rétrécissait invariablement au cours de la simulation moléculaire dynamique. L'analyse des trajectoires n'a donc révélé que de petites cavités, peu accessibles : leurs volumes variaient entre 5 et 87 Å<sup>3</sup> au maximum, et le diamètre de leurs ouvertures variaient entre 3 et 9 Å. Cette cavité, juste suffisante pour accueillir une molécule organique de la taille d'un noyau imidazole, n'était donc pas une cible exploitable, que ce soit par criblage *in silico* ou par une autre méthode.

Confrontés à ce résultat, nous avons abandonné cette stratégie pour nous focaliser sur notre seconde approche, qui vise à synthétiser des inhibiteurs compétitifs capables de se lier à TonB au niveau du site d'interaction avec la boîte TonB du transporteur. La séquestration de la protéine TonB devrait ainsi conduire à l'arrêt du transport du fer, stoppant ainsi la prolifération bactérienne.

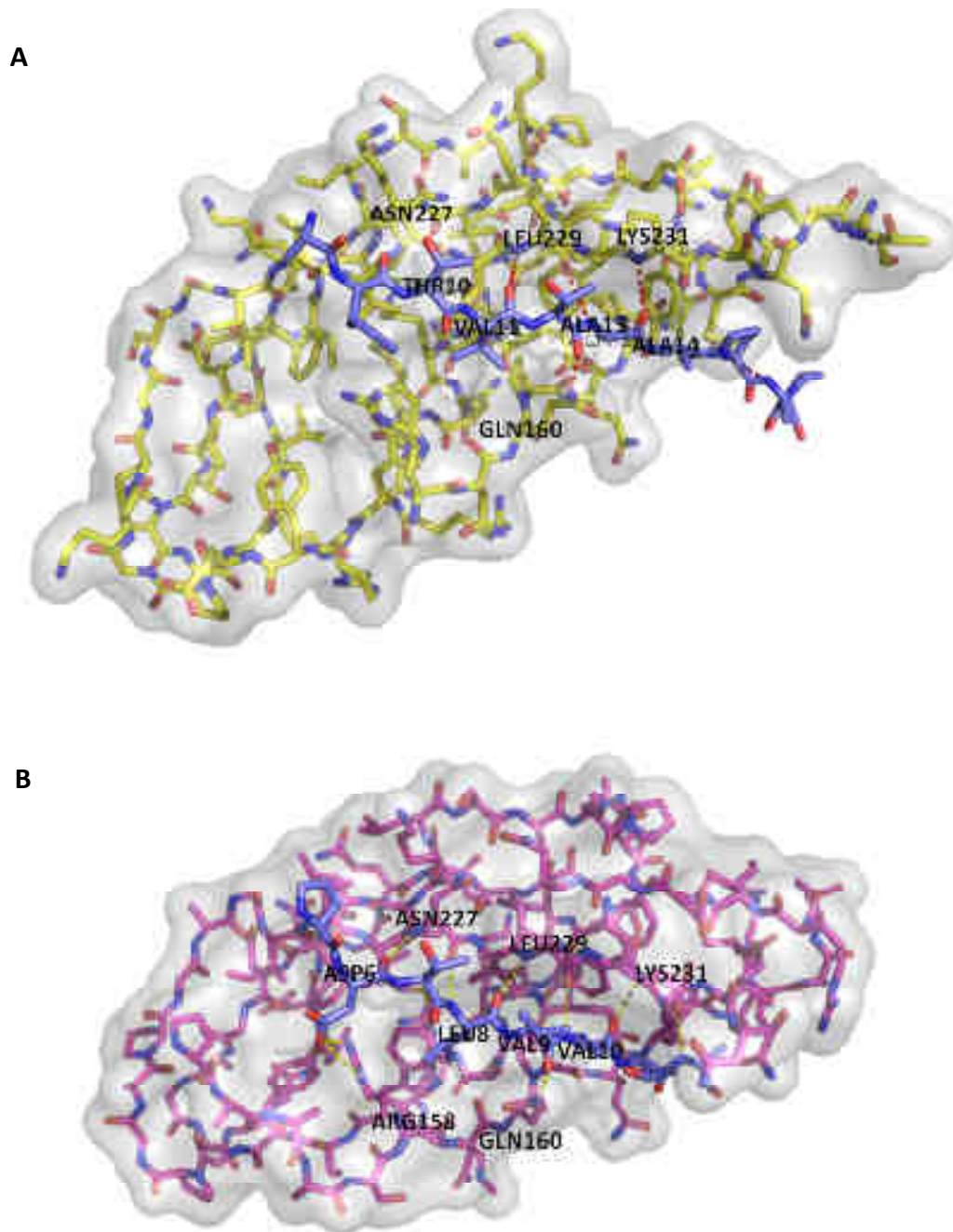
## II. Inhibiteurs compétitifs de TonB

Le développement d'inhibiteurs compétitifs de TonB est l'approche qui semble la plus intuitive : la conception de telles molécules s'inspire des ligands naturels de la protéine cible, c'est-à-dire des boîtes TonB des transporteurs de membrane externe. Très tôt la communauté scientifique a compris que l'interaction entre TonB et la boîte TonB des transporteurs de membrane externe était cruciale dans les processus d'assimilation du fer.<sup>253, 262, 274</sup> Des essais d'inhibition de l'interaction TonB-TME avec des fragments naturels de boîtes TonB ont d'ailleurs été réalisés précédemment, mettant en évidence la pertinence de cette approche.<sup>265</sup> Nous avons donc commencé par réaliser une étude plus poussée de l'interaction TonB-TME, afin d'élaborer des peptides modifiés capables d'avoir une meilleure affinité pour TonB que les boîtes TonB des transporteurs de membrane externe.

### A. Conception

#### 1. Etude de l'interaction TonB-boîte TonB des transporteurs de membrane externe

L'interaction entre TonB et le transporteur de membrane externe passe par la formation d'un feuillet  $\beta$  entre le brin  $\beta 3$  de TonB et la boîte TonB des TME. L'étude de l'interaction entre la partie périplasmique de TonB (TonB<sub>pp</sub>) et la boîte TonB du transporteur FhuA montre que le feuillet formé est maintenu par trois liaisons hydrogène entre les chaînes principales des résidus Val11-Leu229, Ala13-Leu229 et Ala14-Lys231, et deux liaisons hydrogènes impliquant les chaînes latérales des résidus Thr10-Asn227 et Ala13-Gln160 des deux protéines (Figure 44.A). L'interaction de TonB<sub>pp</sub> avec la boîte TonB du transporteur BtuB repose quant à elle sur cinq liaisons hydrogène entre les chaînes principales des résidus Asp6-Asn227, Leu8-Asn227, Leu8-Leu229, Val10-Leu229 et Val10-Lys231, et deux liaisons hydrogènes impliquant les chaînes latérales des résidus Asp6-Arg158 et Val9-Gln160 (Figure 44.B). Il a été montré que la liaison hydrogène avec Gln160 est indispensable à l'interaction protéine-protéine.<sup>233, 275</sup>



**Figure 44** : Représentation surfacique (en transparence) de **(A)** TonB<sub>pp</sub> de *E.coli* (en jaune) en complexe avec la boîte TonB de FhuA (en bleu). Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés rouges et les résidus impliqués dans l'interaction sont indiqués (PDB ID : 2GRX). **(B)** TonB<sub>pp</sub> de *E.coli* (en violet) en complexe avec la boîte TonB de BtuB (en bleu). Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés jaunes et les résidus impliqués dans l'interaction sont indiqués (PDB ID : 2GSK).

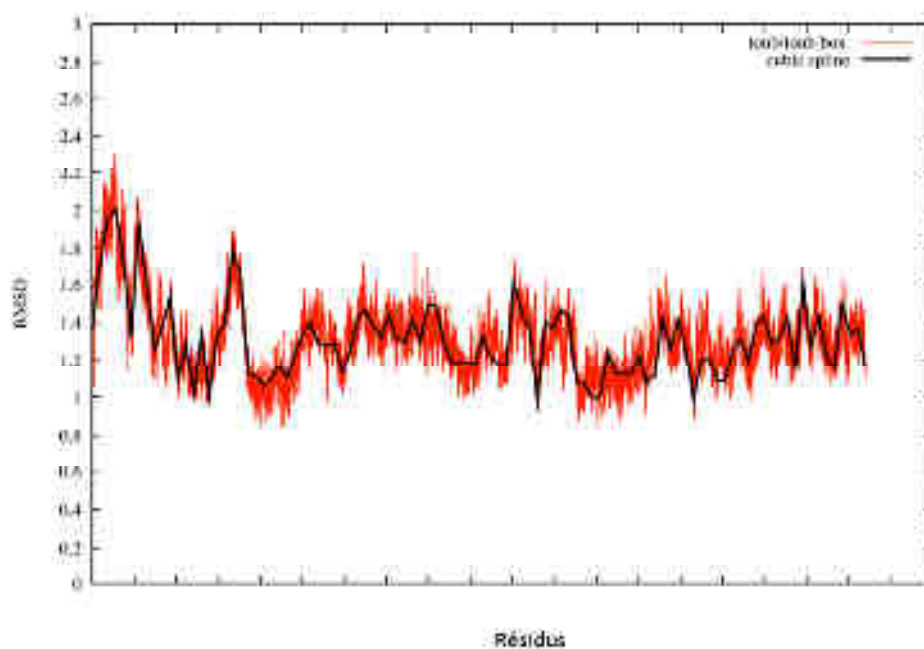
Il est étonnant de remarquer que, dans ces deux cas, les chaînes latérales des acides aminés constituant la boîte TonB participent peu à l'interaction TonB-transporteur. Le rôle individuel des acides aminés de la boîte TonB de BtuB (*E. coli*) dans leur interaction avec TonB a été étudié en réalisant plus de 30 substitutions des résidus 6 à 13 de BtuB par mutagenèse

dirigée.<sup>262</sup> Un certain nombre de mutations n'affectent pas le transport de la vitamine B12. Le transport TonB-dépendant est donc remarquablement tolérant aux mutations de la boîte TonB. Par contre, certaines substitutions affectant la structure secondaire de la boîte TonB (Leu8 → Pro et Val10 → Gly ou Pro) entraînent l'arrêt total du transport de la cobalamine.<sup>167, 262</sup> Des observations similaires ont été faites lors de la substitution des résidus de la boîte TonB de FecA par mutagenèse dirigée.<sup>230</sup> Ceci suggère que l'interaction entre TonB et la boîte TonB n'est pas uniquement assujettie aux interactions des chaînes latérales, mais est plutôt guidée par une reconnaissance structurale locale.

Nous avons voulu aller plus loin dans l'étude de l'interaction TonB-TME en réalisant une étude dynamique de l'interaction TonB-FhuA en collaboration avec l'équipe d'Annick Dejaegere. Ce travail devrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes qui gouvernent l'interaction TonB-boîte TonB. Nous avons pour cela identifié les points chauds de l'interaction protéine-protéine, c'est-à-dire les résidus situés à l'interface qui contribuent le plus fortement à la stabilisation du complexe TonB-TME.<sup>276</sup> En effet, les études de mutations montrent que seulement quelques résidus, une fois mutés en alanine, conduisent à une chute significative de l'affinité de liaison.<sup>277, 278</sup> Ces résidus sont donc cruciaux pour l'interaction. Des méthodes computationnelles ont été développées pour identifier ces points chauds, afin de mieux comprendre la formation de complexes protéiques d'un point de vue énergétique.<sup>279-283</sup> Connues sous le nom de *Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM/PBSA) ou *Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*,<sup>284</sup> ces méthodes sont basées sur des fonctions empiriques de l'énergie libre et sur l'utilisation de représentations implicites du solvant pour réduire les temps de calculs.<sup>280, 281</sup> En complément des données expérimentales, ces modèles physiques permettent de déterminer les conséquences structurales et énergétiques des mutations, et donnent des informations sur les interactions intermoléculaires qui régissent la liaison. Dans notre cas, nous avons utilisé la méthode MM/PBSA pour rechercher les facteurs qui régissent la formation du complexe TonB-boîte TonB. Le protocole utilisé permet de décomposer l'énergie libre de liaison en contribution individuelle de chaque acide aminé afin de cartographier les interactions ayant un rôle prédominant dans la formation du complexe.<sup>283</sup> Ces calculs ont été réalisés à partir des conformations extraites de simulations de dynamique moléculaire lancées sur la protéine TonB d'*E. coli* en complexe avec la boîte TonB du



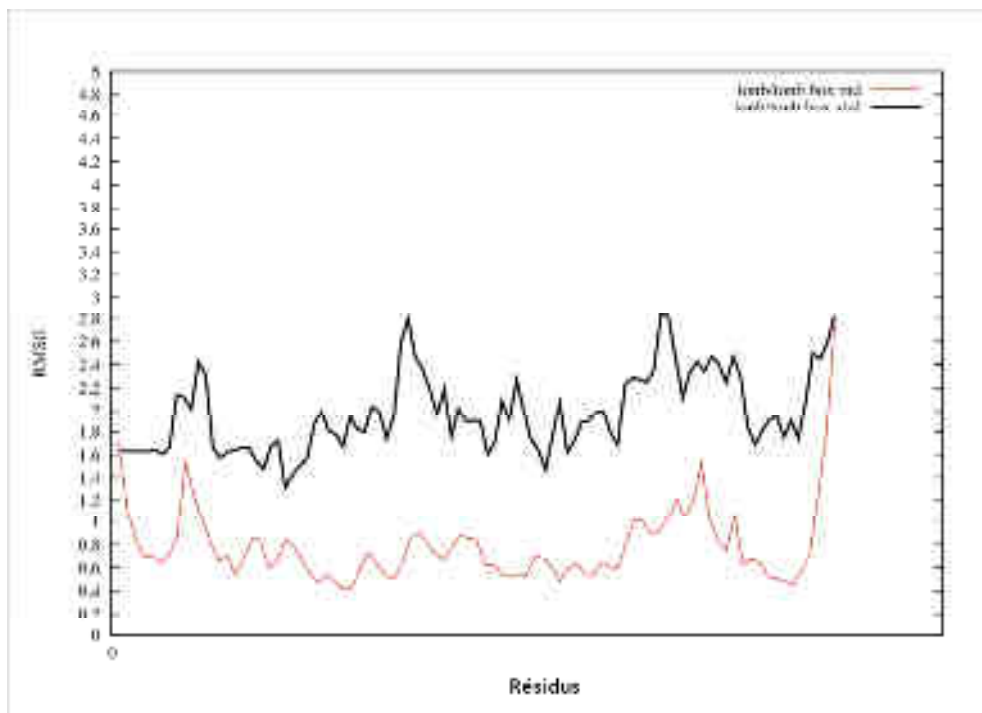
transporteur de membrane externe FhuA. La boîte TonB du transporteur est constituée des résidus 8 à 16 (TITVTAAPA) extraits de la structure cristallographique du complexe TonB-FhuA (PDB ID : 2GRX). Ces simulations montrent que le complexe TonB-boîte TonB est stable avec un RMS qui se stabilise aux alentours de 1,4 Å à la fin des simulations (Figure 45).



**Figure 45** : Calculs du RMS des atomes qui composent le squelette protéique du complexe TonB-boîte TonB réalisés au cours des simulations moléculaires dynamiques.

Les fluctuations théoriques du RMS calculées pour le complexe TonB-boîte TonB donnent une idée de la flexibilité du squelette protéique du complexe. Elles ont été comparées aux fluctuations expérimentales du RMS obtenues à partir de la structure cristallographique du complexe TonB-FhuA (Figure 46). Les fluctuations expérimentales et théoriques ont la même allure, ce qui signifie que la flexibilité atomique est sensiblement la même, que TonB soit complexé au transporteur entier ou uniquement à la boîte TonB. Les dynamiques conformationnelles réalisées avec seulement un fragment de FhuA, sa boîte TonB, sont donc représentatives du complexe protéique entier.





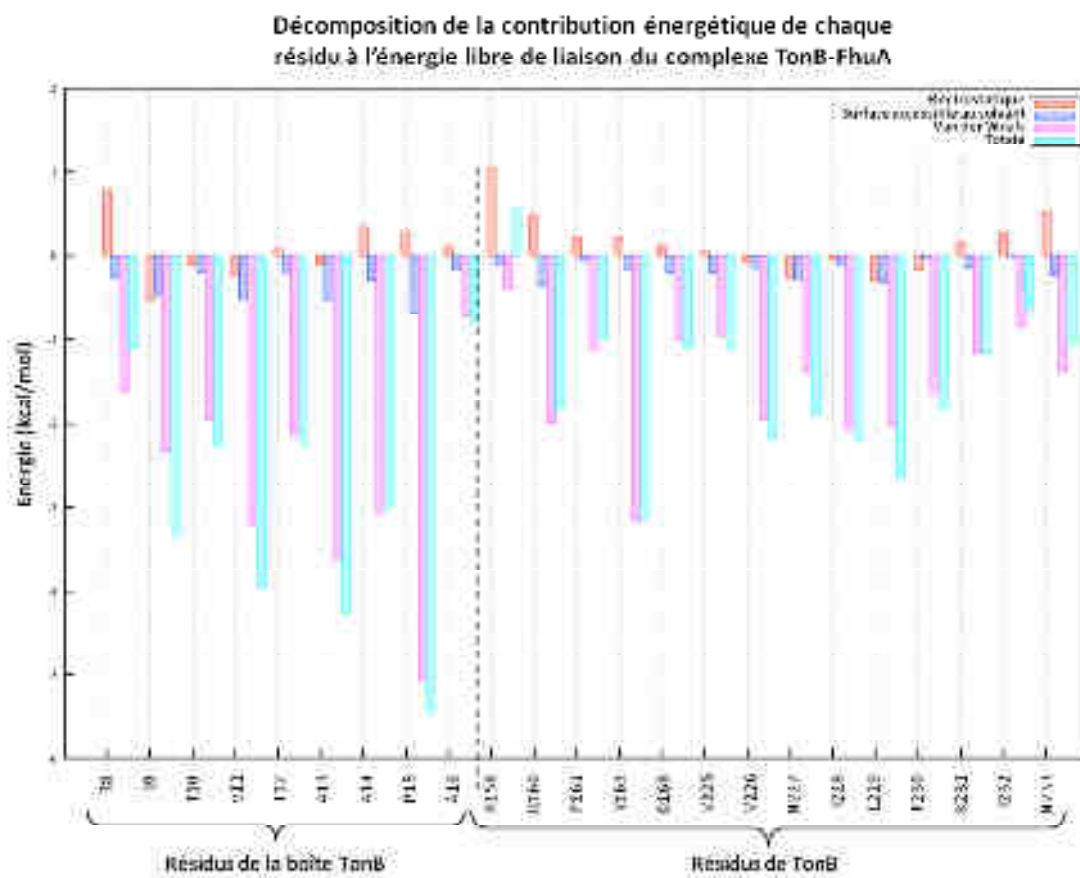
**Figure 46 :** Comparaison des variations du RMS déterminé expérimentalement à partir de la structure cristallographique du complexe TonB-FhuA (en noir) et par les simulations de dynamique moléculaire lancées sur le complexe TonB-boîte TonB de FhuA (en rouge).

Forts de ces résultats, la décomposition de l'énergie libre du complexe protéique formé par TonB et la boîte TonB du transporteur de membrane externe FhuA a pu être réalisée en utilisant la méthode MM/PBSA, afin d'identifier les acides aminés de l'interface qui contribuent le plus significativement à l'énergie libre de liaison du complexe. Nous considérons comme point chaud les résidus qui ont une contribution de  $\pm 1$  kcal/mol à l'énergie libre de liaison (Tableau 1).

Résidu	Energie (kcal/mol)	Résidu	Energie (kcal/mol)
Thr8	-1,1	Arg158	0,6
Ile9	-3,3	Gln160	-2,8
Thr10	-2,3	Pro161	-1,0
Val11	-3,9	Tyr163	-3,1
Thr12	-2,2	Gln166	-1,1
Ala13	+4,3	Val225	-2,1
Ala14	-3,0	Val226	-2,2
Pro15	-5,4	Asn227	-1,9
Ala16	-0,8	Ile228	-2,7
		Leu229	-2,6
		Phe230	-1,8
		Lys231	-1,1
		Ile232	-3,6
		Asn233	-1,1

**Tableau 1** : Contribution énergétique totale à la formation du complexe TonB-boîte TonB des résidus de la boîte TonB de FhuA (en rouge), et des résidus du site de liaison de TonB (en bleu). Seuls les acides aminés ayant une contribution de  $\pm 0,5$  kcal/mol sont représentés dans ces tableaux.

Un protocole précédemment décrit<sup>283</sup> permet de décomposer l'énergie libre de liaison totale de chaque acide aminé en ses différentes composantes issues de l'énergie de solvation, et des interactions de type électrostatique et de van der Waals (Tableau 2).

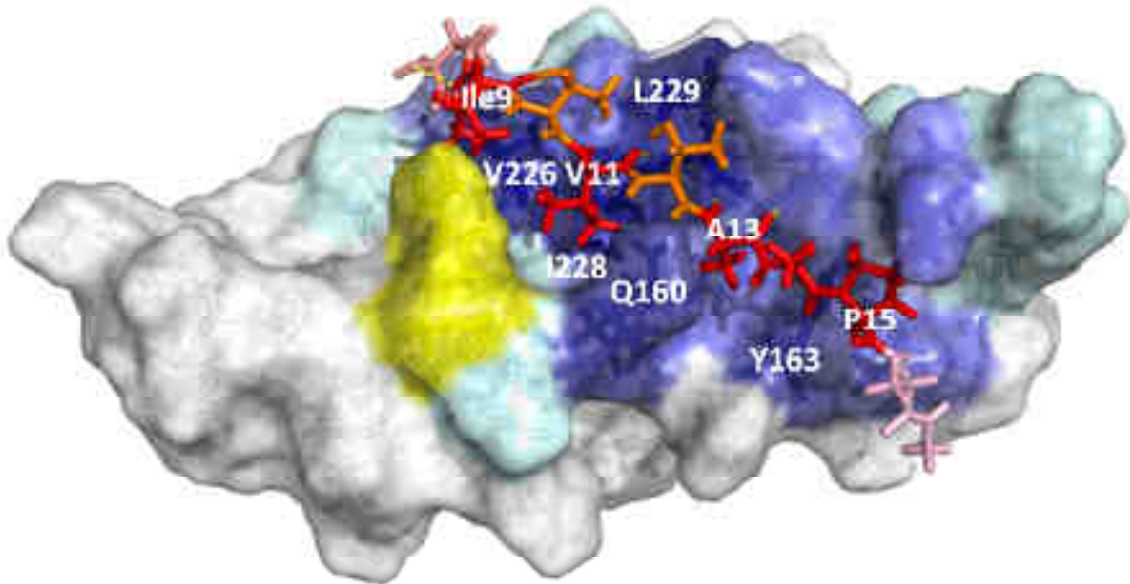


**Tableau 2 :** Histogramme représentant la décomposition de la contribution énergétique de chaque acide aminé à l'énergie libre de liaison du complexe TonB-FhuA.

De manière générale, nous pouvons constater que l'interaction entre TonB et la boîte TonB de FhuA est régie par des interactions de type van der Waals. Les interactions électrostatiques sont même souvent défavorables à l'interaction, notamment pour Arg158.

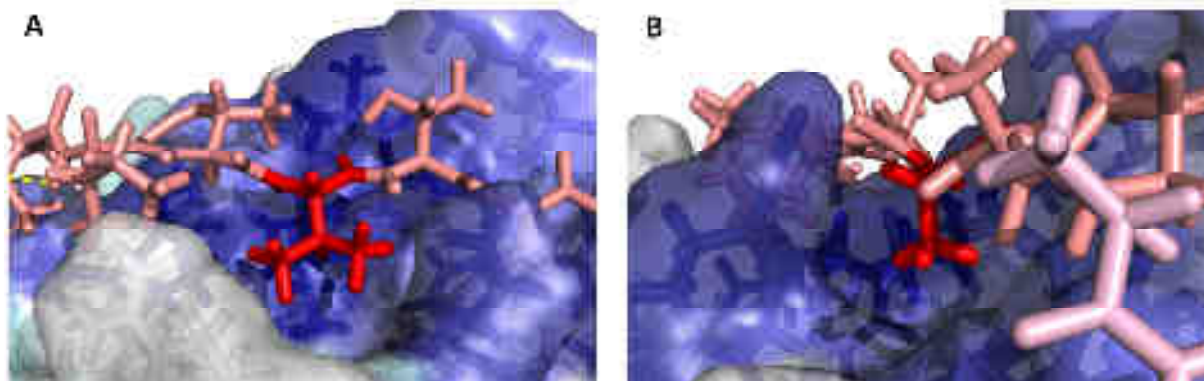
Nous pouvons ensuite remarquer que tous les résidus de la boîte TonB de FhuA, en particulier Ile9, Val11 et Ala13, et même ceux situés au-delà, comme dans le cas de Pro15, sont fortement impliqués dans l'interaction avec TonB. Celle-ci passe en effet par la formation d'un feuillet  $\beta$  entre la boîte TonB et le brin  $\beta_3$  de TonB. Nous pouvons également constater que les acides aminés Val225 à Asn233 du brin  $\beta_3$  de TonB ne sont pas les seuls à contribuer fortement à l'interaction. Les résidus Gln160 à Tyr163, qui appartiennent à une région non organisée de TonB, ainsi que Gln168, qui appartient à l'hélice  $\alpha_1$ , sont aussi fortement impliqués. Seule Arg158 présente une contribution défavorable à l'interaction.

Ces résultats ont permis de cartographier et de visualiser l'interaction TonB-boîte TonB de FhuA (Figure 47).



**Figure 47** : Représentation surfacique de TonB d'*E. coli* en complexe avec la boîte TonB de FhuA. Les acides aminés qui contribuent défavorablement à l'interaction sont en jaune pour TonB, alors que ceux qui y contribuent favorablement sont en bleu foncé pour TonB et en rouge pour la boîte TonB. Image réalisée avec PyMol.<sup>105</sup>

De manière générale, les résidus connus pour être fréquemment impliqués dans les points chauds sont principalement des tryptophanes, des tyrosines et des arginines, localisés près du centre de l'interface protéine-protéine et isolés du solvant.<sup>276, 277</sup> De manière étonnante, très peu de résidus de ce type sont impliqués dans l'interaction TonB-FhuA : seul Tyr163 contribue favorablement à l'interaction, alors que Arg158 a l'effet inverse. En outre, les résidus hydrophobes Val11 et surtout Ala13, connus généralement pour faire chuter l'affinité du ligand pour sa cible,<sup>277</sup> contribuent de manière très favorable à l'interaction. Or notre étude montre que l'interaction TonB-boîte TonB est dominée par des interactions de type van der Waals, et non électrostatiques. Ainsi, Val11 et Ala13 s'insèrent parfaitement dans des poches hydrophobes à la surface de TonB, ce qui explique leur contribution significative à l'énergie libre de liaison (Figure 48).



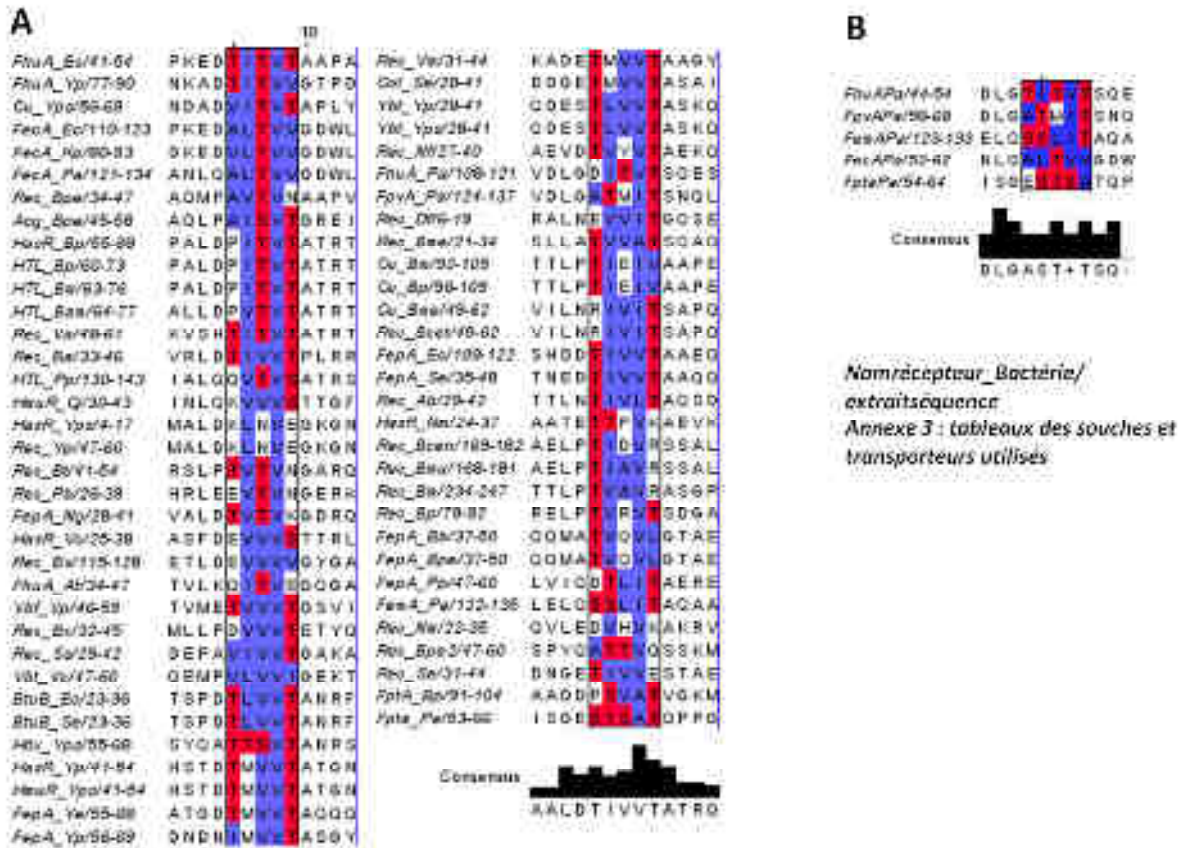
**Figure 48** : Insertion de (A) Val11 et (B) Ala13 (en rouge) de la boîte TonB de FhuA dans des poches hydrophobes de TonB (représentation surfacique en bleu). Images réalisées avec PyMol.<sup>105</sup>

Alors que l'association de TonB avec les TME semble se faire dans un premier temps grâce à des interactions électrostatiques à longue distance,<sup>224</sup> l'interaction de TonB avec la boîte TonB des TME semble gouvernée par des interactions de type van der Waals. Lors de la conception de nos ligands, nous devons donc veiller à conserver des résidus hydrophobes qui pourront s'arrimer dans les cavités que nous avons mises en évidence. La connaissance de ces points chauds nous permettra également par la suite de développer de petites molécules peptidiques ou peptidomimétiques capables d'inhiber la formation du complexe TonB-TME.

## 2. Définition de la séquence de la chaîne peptidique

Notre stratégie d'inhibition de l'interaction TonB-TME repose principalement sur l'effet antibiotique que devrait avoir un peptide mimant les boîtes TonB des transporteurs de membrane externe. L'efficacité de cette approche a été établie en montrant que l'ajout d'un pentapeptide (Gln-Thr-Val-Ile-Val), mimant la boîte TonB du transporteur FhuA, à des cultures d'*E. coli*, inhibe la croissance bactérienne.<sup>265</sup> Dans le cadre du développement d'antibiothérapies à large spectre, nous souhaitons définir la séquence d'un pentapeptide consensus qui pourra agir sur un grand nombre d'espèces bactériennes pathogènes. Plusieurs alignements de séquences de boîtes TonB de divers transporteurs et de différentes espèces ont donc été réalisés afin de définir les séquences de deux peptides consensus. Les séquences de plus de 70 transporteurs TonB-dépendants appartenant à 34 espèces bactériennes différentes, pathogènes ou non, ont été retrouvées par BLAST.<sup>267</sup> Les

alignements des boîtes TonB de ces TME ont été réalisés avec ClustalX, puis ont été retravaillés avec Jalview.<sup>269, 285</sup> Ces alignements nous ont permis d’obtenir la séquence d’un peptide consensus (Figure 49.A). En outre, dans le but de développer des antibiothérapies dirigées contre *P. aeruginosa*, microorganisme modèle du laboratoire, les boîtes TonB des transporteurs TonB-dépendants de ce pathogène ont également été alignées (Figure 49.B).



**Figure 49 :** Alignements des séquences des boîtes TonB (A) des transporteurs TonB-dépendants de 34 espèces bactériennes différentes (Annexe 3), (B) des transporteurs TonB-dépendants de *P. aeruginosa*. Les résidus comportant des groupes hydroxyles sur leur chaîne latérale (Thr, Ser) sont colorés en rouge, ceux comportant des chaînes latérales hydrophobes (Ala, Val, Leu, Ile) sont colorés en bleu. Les séquences consensus ont été déterminées avec Jalview.

L’observation globale de ces alignements montre que les boîtes TonB sont généralement constituées de deux thréonines encadrant deux à trois acides aminés hydrophobes, ce qui corrobore les résultats de l’étude moléculaire dynamique de l’interaction TonB-FhuA. L’alignement des séquences des boîtes TonB de transporteurs variés a abouti au peptide consensus : Thr-Ile-Val-Val-Thr. Nous avons décidé de remplacer dans un premier temps l’isoleucine par une valine afin d’éliminer un centre asymétrique, et donc de synthétiser le peptide consensus Thr-Val-Val-Val-Thr.



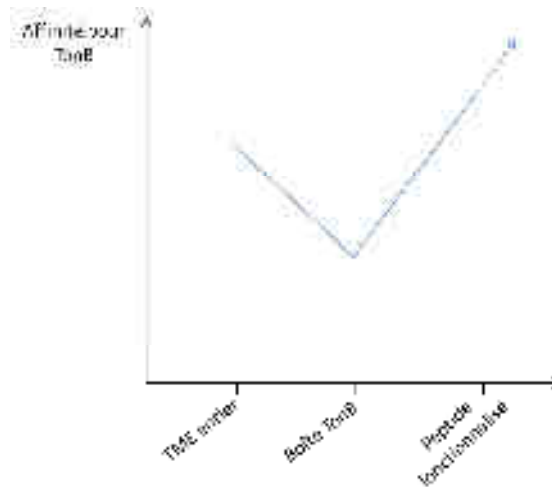
La séquence du second peptide s'inspire plus particulièrement des séquences des boîtes TonB des transporteurs de membrane externe de *P. aeruginosa*. Dans ce cas, la conservation des séquences et la définition d'un peptide consensus est moins évidente sur un alignement regroupant aussi peu de séquences. En s'inspirant davantage des séquences des boîtes TonB de FpvA et FptA, les transporteurs des deux sidérophores majeurs de *P. aeruginosa*, nous avons défini la séquence Thr-Ser-Ala-Thr-Ser, comme peptide consensus potentiel. Il serait en effet intéressant d'étudier les différences d'affinité pour la protéine TonB de *P. aeruginosa* de ce peptide, par rapport au peptide consensus Thr-Val-Val-Val-Thr.

### 3. Fonctionnalisation de la chaîne peptidique avec un hétérocycle

Définir un peptide consensus capable de se lier à TonB avec la même affinité pour TonB que les boîtes TonB des transporteurs de membrane externe ne suffit pas. Nous souhaitons en effet que notre peptide ait une affinité plus grande pour TonB que les ligands naturels.

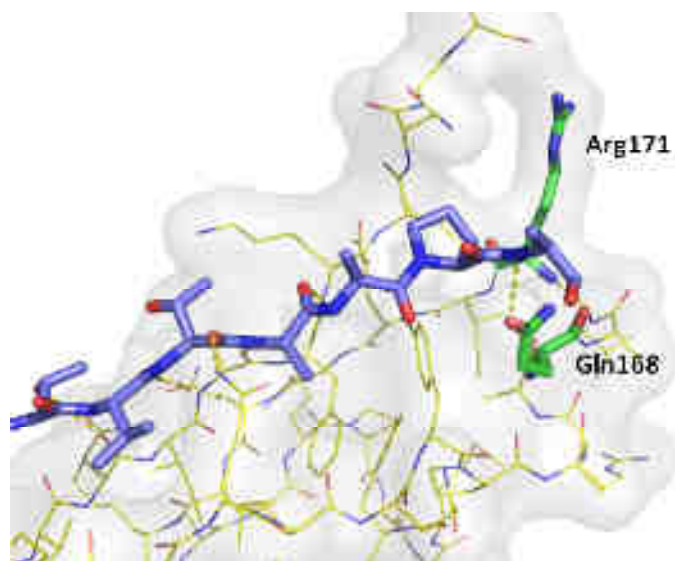
La force de l'interaction TonB-TME a été mesurée pour la première fois par SPR. La constante de dissociation entre la partie périplasmique de TonB fusionnée à une étiquette GST et le transporteur FpvA a été évaluée à  $2,9(\pm 0,8) \mu\text{M}$ .<sup>231</sup> La faiblesse de cette interaction peut paraître surprenante de prime abord, mais peut trouver une explication fonctionnelle. En effet, cette interaction permet l'ouverture d'un canal au centre du tonneau ; il est donc concevable que cette interaction protéine-protéine soit relativement labile pour permettre la dissociation de TonB du TME une fois le substrat entré dans la cellule, afin d'autoriser la protéine à énergiser rapidement un autre transporteur. Dans le cas de l'étude par calorimétrie isotherme à titration (ITC) de l'interaction entre la partie périplasmique de TonB et un décapeptide contenant la boîte TonB de FhuA, la constante de dissociation a été évaluée à  $36(\pm 7) \mu\text{M}$ .<sup>180</sup> L'affinité du fragment du transporteur est donc dix fois plus faible que celle du transporteur entier. En effet, quelques résidus du tonneau et du bouchon participent aussi à l'interaction, bien sûr dans une moindre mesure que la boîte TonB.<sup>181</sup> Nous pouvons alors essayer d'augmenter l'affinité pour TonB de nos ligands peptidiques en leur ajoutant un hétérocycle judicieusement fonctionnalisé qui ciblera des résidus polaires de TonB afin de créer des interactions supplémentaires spécifiques (Figure 50). Cet

hétérocycle jouera également le rôle "d'ancre" moléculaire en orientant correctement le peptide dans le site d'interaction TonB-TME.



**Figure 50** : Evolution qualitative de l'affinité des ligands pour TonB.

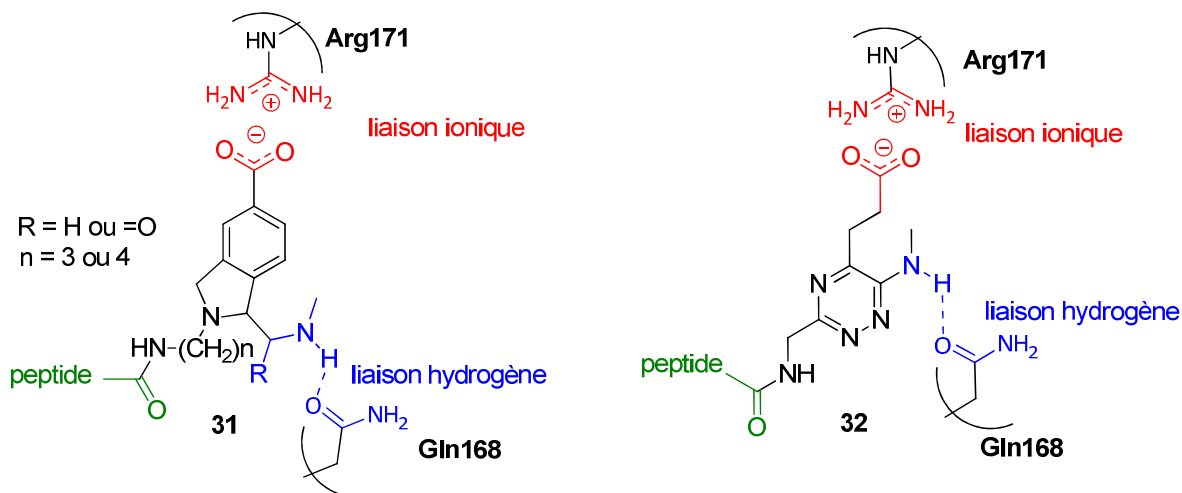
Nous souhaitons fonctionnaliser nos peptides à l'extrémité C-terminale de leurs séquences. L'étude de la contribution énergétique des résidus participant à l'interaction TonB<sub>pp</sub>-boîte TonB de FhuA a montré de manière étonnante que Pro15 participe fortement à l'interaction (Tableau 1). Nous souhaitons remplacer cet acide aminé par un hétérocycle fonctionnalisé capable de cibler des résidus polaires conservés de TonB (Annexe 1), ici Gln168 et Arg171 (Figure 51).



**Figure 51** : Représentation de la boîte TonB de FhuA d'*E. coli* (en bleu) en complexe avec la protéine TonB d'*E. coli* (en jaune). Les résidus ciblés par les ancres moléculaires sont colorés en vert.



Les mesures du site d'interaction nous ont permis d'élaborer les structures de deux types d'ancres moléculaires intéressantes non seulement pour la tâche qui leur incombe mais aussi d'un point de vue synthétique : des noyaux de type isoindole **31** et de type 1,2,4-triazine **32** (Figure 52). Les fonctions acides pourront établir des interactions avec l'arginine, alors que la liaison hydrogène avec la glutamine pourra être maintenue grâce à des fonctions amines ou amides. Les peptides seront liés à ces ancres par une fonction amide.



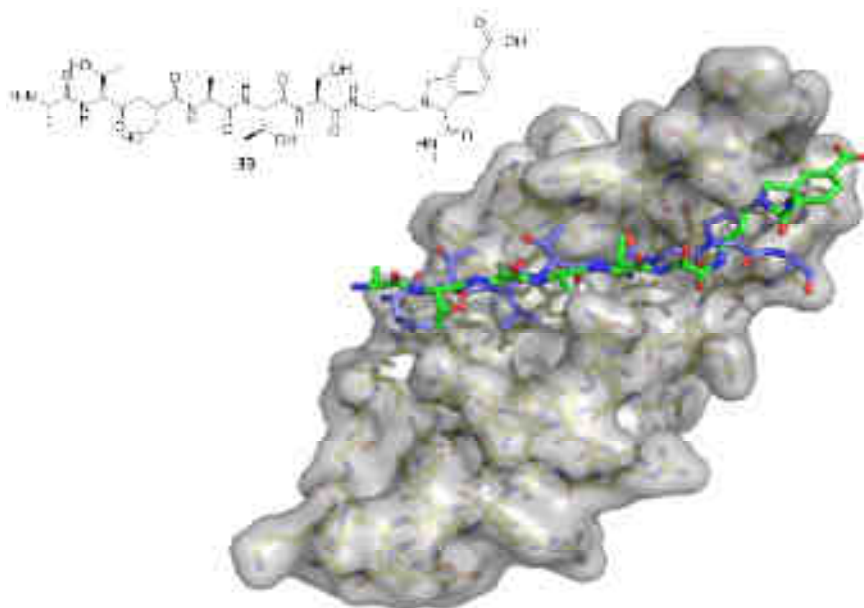
**Figure 52** : Structures des noyaux hétérocycliques de type isoindole **31** ou 1,2,4-triazine **32** utilisés comme ancre moléculaire pour augmenter l'affinité des peptides pour TonB.

Nous avons ensuite entrepris des essais d'amarrage moléculaire au sein de notre équipe afin de vérifier si les structures des molécules conçues se positionnaient convenablement sur TonB.

#### 4. Amarrage préliminaire des molécules conçues

Plusieurs méthodes permettant de rechercher une complémentarité de forme entre un ligand et son récepteur ont été développées. DOCK est l'un des premiers programmes à utiliser cette méthode.<sup>286</sup> Ce logiciel génère un négatif du site d'interaction d'un récepteur en le comblant de sphères. L'algorithme tente ensuite de superposer le ligand à ces sphères. Nous avons, dans un premier temps, utilisé la méthode d'amarrage de structures rigides offerte par DOCK6 pour tenter de faire coïncider l'inhibiteur potentiel **33** comportant le cycle isoindole et un bras espaceur propylique avec le site d'interaction TonB-TME. Le ligand a été préparé avec la suite logicielle AMBER, les calculs ont été lancés avec

DOCK6, analysés avec l'interface graphique Chimera, puis les images ont été retravaillées avec PyMol.<sup>105, 272, 286, 287</sup> La méthode d'amarrage rigide, qui n'autorise aucun mouvement de la part du ligand, présente l'avantage d'être rapide, mais souffre d'un manque de précision. Comme le montre l'image correspondant au résultat de nos calculs, bien que dans une conformation différente, la chaîne peptidique est située dans le même site d'interaction que la boîte TonB de FhuA (Figure 53). L'hétérocycle n'est pas superposé exactement à la proline mais est situé dans la zone polaire que nous avons définie. Toutefois, les résultats obtenus n'ont pas été optimisés. Pour améliorer ces résultats, il aurait fallu générer une bibliothèque de conformères avec CORINA par exemple, puis lancer les calculs d'amarrage sur l'ensemble des conformères.<sup>288</sup> Il aurait également été intéressant de faire varier la longueur du bras aliphatique séparant le peptide de l'ancre hétérocyclique. Or nous avons rapidement été limités par le manque de puissance de nos outils informatiques et ce travail plus approfondi n'a pu être réalisé au sein de l'équipe dans le temps imparti pour cette thèse.

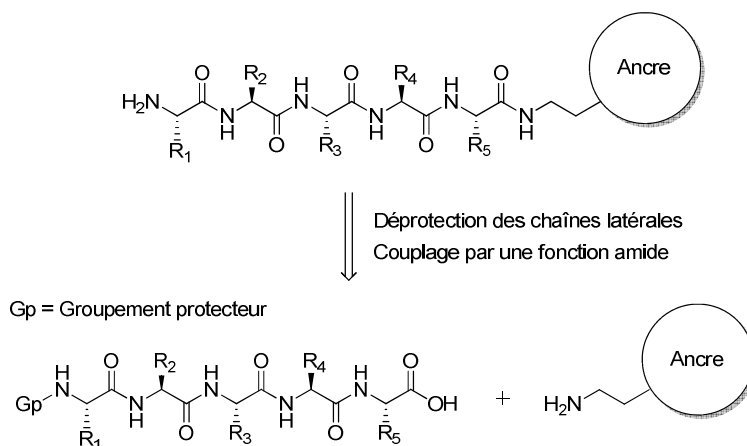


**Figure 53** : Résultat de l'amarrage rigide de l'inhibiteur **33** (en vert) sur la protéine TonB d'*E. coli* (surface grise) réalisé avec DOCK6, en comparaison de la position de la boîte TonB de FhuA (en bleu).

Ce résultat préliminaire nous a toutefois conforté dans notre démarche. Les approches synthétiques de l'ensemble de ces molécules vont donc maintenant pouvoir être présentées.

## B. Synthèse des inhibiteurs potentiels de TonB

Les inhibiteurs potentiels de TonB de type **31** et **32** sont constitués d'une chaîne peptidique reliée à une ancre moléculaire hétérocyclique. Cet assemblage se fera par le biais d'un couplage amide entre une fonction amine de l'ancre hétérocyclique et l'acide carboxylique C-terminal d'un pentapeptide convenablement protégé (Schéma 1).



**Schéma 1** : Analyse rétrosynthétique pour la préparation des inhibiteurs potentiels de TonB.

Nous allons présenter, la synthèse des peptides dans un premier temps, puis celles des ancres moléculaires hétérocycliques dans un second temps.

### 1. Synthèse peptidique

La chaîne peptidique constitue la partie majeure de nos inhibiteurs potentiels de l'interaction TonB-TME. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, cette séquence a pour mission de mimer les boîtes TonB des TME afin de séquestrer la protéine TonB dans le périplasma, et ainsi bloquer les systèmes d'assimilation du fer TonB-dépendants. Les séquences de deux peptides consensus ont été définies sur la base d'une étude moléculaire dynamique de l'interaction TonB-FhuA, ainsi que d'alignements de séquences de boîtes TonB appartenant aux transporteurs de plusieurs espèces bactériennes. Ces pentapeptides sont constitués notamment de deux thréonines encadrant deux à trois acides aminés, en général hydrophobes : Thr-Ser-Ala-Thr-Ser et Thr-Val-Val-Val-Thr.

À ce jour, il existe un grand nombre de méthodes de production de peptides et de protéines. Ces méthodes peuvent être biochimiques ou chimiques en fonction de la taille de la molécule finale désirée.<sup>289</sup> Parmi les méthodes chimiques, la synthèse peptidique sur support solide est la plus couramment employée à ce jour.<sup>290</sup> Cette technique est utilisée par exemple en combinaison avec la synthèse en solution pour produire le Fuzéon, un peptide de 36 résidus qui inhibe l'infection des cellules par le virus du VIH.<sup>291</sup> C'est la manière la plus rapide de produire des peptides de 20 à 30 résidus, mais la production de peptides à grande échelle par cette méthode reste très coûteuse et génère des quantités importantes de déchets.<sup>292</sup> Pour la synthèse de nos courtes séquences qui doivent être préparées à l'échelle du gramme sur l'ensemble de la thèse, nous avons privilégié les méthodes de synthèse en solution. Ces méthodes permettent en effet d'isoler et purifier chaque intermédiaire, et sont très flexibles. En effet, nous disposons d'une large palette de réactifs pour réaliser les couplages et protection/déprotection des fonctions qui le nécessitent, notamment au niveau des chaînes latérales des acides aminés. Nous avons testé deux méthodes de synthèse peptidique en solution : la méthode classique a été utilisée pour synthétiser le peptide TSATS, alors que le peptide TVVVT a été préparé par la méthode de synthèse continue. Nous allons donc aborder ces deux stratégies successivement.

#### a) Synthèse peptidique classique en solution

En synthèse peptidique en solution, les fonctions réactives des acides aminés doivent être protégées afin d'éviter des réactions secondaires indésirables lors des couplages amides. Nous avons choisi d'utiliser la stratégie de protection Fmoc/*t*Bu : les fonctions amines sont protégées sous forme de carbamates par des groupements Fmoc (9-fluorénylméthylcarbonyle) clivables en milieu basique, alors que les fonctions acides carboxyliques sont protégées sous forme d'esters *tert*-butyliques hydrolysables en milieu acide.<sup>293</sup> Lorsque cette stratégie est employée, les fonctions hydroxyles des chaînes latérales des sérines et thréonines sont généralement protégées sous forme d'éthers *tert*-butyliques, et sont donc déprotégées dans les mêmes conditions que la fonction C-terminale du peptide.<sup>293</sup> Dans notre cas, nous souhaitons pouvoir déprotéger indépendamment ces deux types de fonctions afin de pouvoir coupler nos peptides aux ancres hétérocycliques. Nous avons donc choisi de protéger les fonctions hydroxyles sous la forme d'éthers benzyliques, qui pourront être déprotégés ultérieurement par hydrogénation catalytique.

La synthèse du peptide TSATS **46** débute par la préparation de deux réactifs (Schéma 2). Le premier, la *N,N'*-diisopropyl-*O*-*tert*-butylisourée **35**, est préparée par l'addition catalysée au cuivre(I) de *tert*-butanol sur le 1,3-diisopropylcarbodiimide **34**.<sup>294</sup> La réaction permet d'obtenir avec 66 % de rendement le réactif **35**, qui nous permettra de protéger la fonction acide carboxylique des acides aminés. Le second, la *N*-Fmoc-(L)-alanine **37**, est préparée en faisant réagir du chloroformiate de 9-fluorénylméthylcarbonyle avec de la (L)-alanine **36** en milieu basique.<sup>295</sup> L'acide aminé **37** généré avec 98 % de rendement nous servira dans la synthèse peptidique du pentapeptide cible **46**.

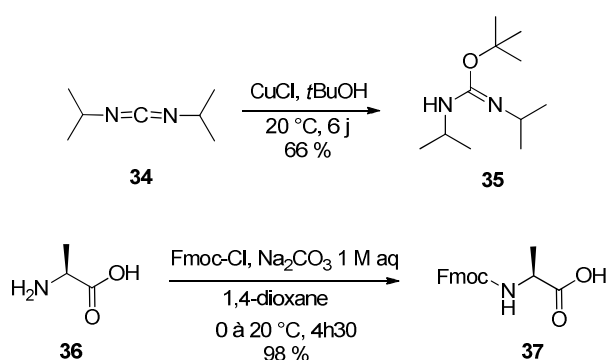
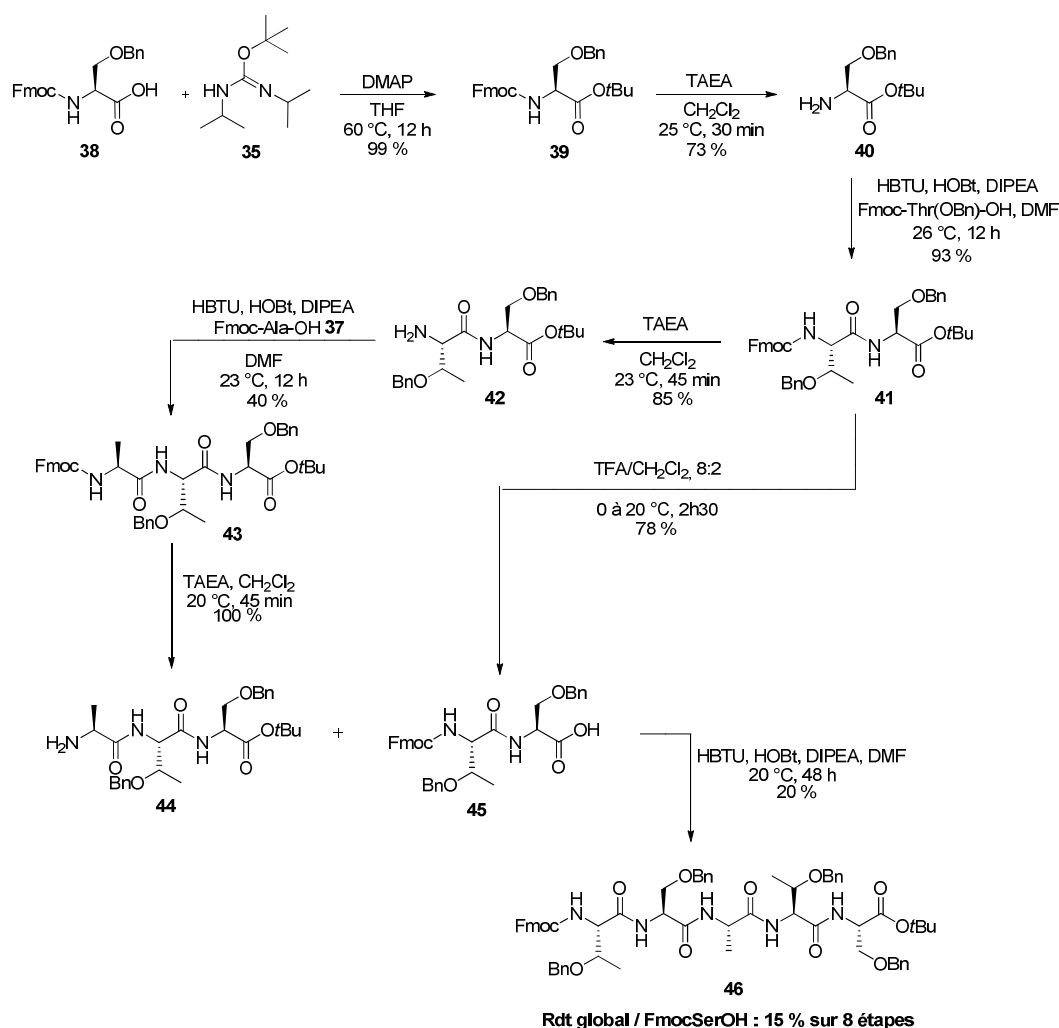


Schéma 2 : Préparation des réactifs **35** et **37**.

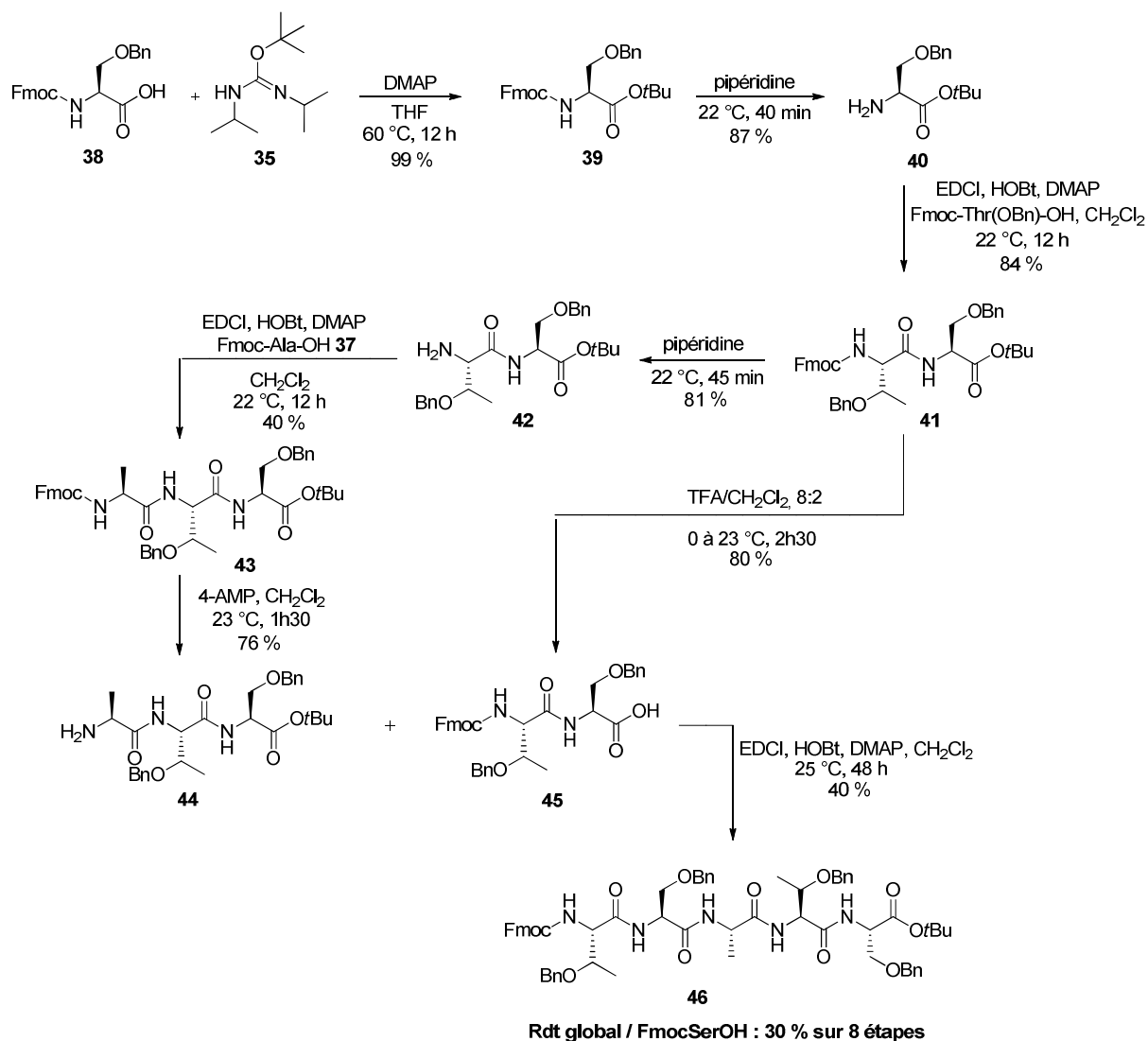
La synthèse du pentapeptide **46** par la méthode de synthèse peptidique classique en solution se poursuit par la protection de la fonction acide de la *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(L)-sérine **38** commerciale en ester *tert*-butylique **39** par réaction avec la *N,N'*-diisopropyl-*O*-*tert*-butylisourée **35** préalablement préparée (Schéma 3).<sup>296</sup> L'acide aminé protégé **39** est obtenu en 12 h avec 99 % de rendement. Le groupement protecteur Fmoc est ensuite clivé en présence de tris(aminoéthyl)amine (TAEA) pour générer l'amine **40** avec 73 % de rendement.<sup>297</sup> La TAEA sert à la fois à déprotéger la fonction amine, et à neutraliser le dibenzofulvène (DBF) libéré dans le milieu réactionnel.<sup>298</sup> Le DBF est, en effet, une espèce très réactive capable de polymériser et de provoquer une gélification du milieu réactionnel.<sup>299</sup> La TAEA rend le DBF soluble en phase aqueuse facilitant ainsi l'isolement du composé **40**. L'amine **40** est ensuite couplée avec la *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(L)-thréonine commerciale en présence de HBTU (hexafluorophosphate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium). Ce réactif est en effet l'un des agents de couplage le plus populaire utilisé en synthèse peptidique en solution et sur support solide.<sup>300</sup> Les sels d'uronium sont connus à la fois pour leur efficacité de couplage et pour limiter le taux

d'épimérisation des acides aminés.<sup>301</sup> Le HBTU peut également être combiné à du HOBT (hydroxybenzotriazole) pour limiter encore le phénomène d'épimérisation. La combinaison de HBTU à du HOBT comme agent de couplage nous a donc permis d'obtenir le dipeptide **41** avec 93 % de rendement. La fonction amine du dipeptide **40** est ensuite déprotégée avec la TAEA, puis l'amine résultante **42** est couplée avec la *N*-Fmoc-(L)-alanine **37** pour conduire au tripeptide ATS avec 40 % de rendement. Le groupement Fmoc du tripeptide **43** est ensuite clivé avec de la TAEA pour générer quantitativement l'amine **44**. En parallèle, l'ester *tert*-butylique du dipeptide **41** est hydrolysé en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) pour générer l'acide **45** avec 78 % de rendement. Un couplage amide final entre l'acide carboxylique **45** et l'amine **44** permet d'obtenir le pentapeptide Fmoc-TSATS-OtBu **46** recherché avec un rendement global de 15 % sur 8 étapes, ce qui correspond à un rendement moyen de 65 % par étape.



**Schéma 3** : Synthèse du pentapeptide TSATS **46** par la méthode de synthèse peptidique classique en solution utilisant le HBTU comme agent de couplage.

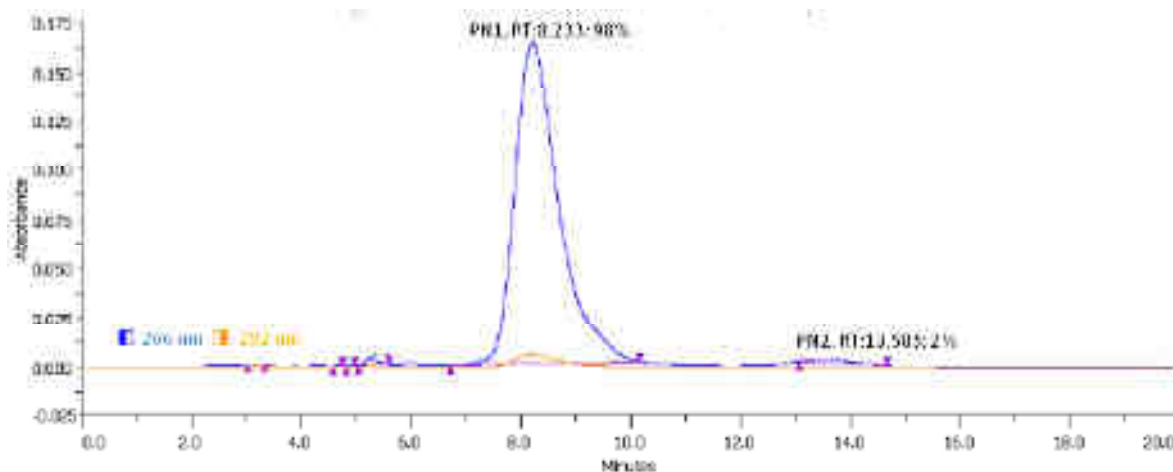
Le faible rendement global de cette synthèse s'explique en partie par la forte chute de rendement observée lors des couplages peptidiques réalisés en présence d'HBTU. Nous avons donc repris cette synthèse en remplaçant cet agent de couplage par de l'EDCI, moins coûteux (Schéma 4). Cet agent de couplage, combiné à du HOBt, n'entraîne pas d'épimérisation et facilite les étapes de purification, d'après la littérature. Bien qu'il n'y ait aucune différence d'efficacité sur les deux premiers couplages peptidiques, l'emploi d'EDCI s'est révélé judicieux pour le dernier couplage peptidique : le rendement passe en effet de 20 % à 40 % sur la synthèse du pentapeptide **46**. Nous avons ensuite essayé d'améliorer des conditions de déprotection des fonctions amine. La pipéridine s'est révélée aussi efficace que la TAEA pour cliver les groupements Fmoc des molécules **39** et **41**, mais s'est révélée difficile à éliminer.<sup>295</sup> Le remplacement de la pipéridine par de la 4-(aminométhyl)pipéridine (4-AMP) nous a permis d'extraire les produits secondaires de la réaction de déprotection plus facilement, mais ne nous a conduits au tripeptide **44** qu'avec 76 % de rendement, à cause de la formation d'émulsions pendant le traitement du milieu réactionnel.<sup>298</sup> L'ensemble des modifications apporté à cette synthèse nous a tout de même permis de doubler le rendement global de la synthèse, ce qui correspond à un rendement moyen de 75 % par étape.



**Schéma 4** : Synthèse du pentapeptide TSATS **46** par la méthode de synthèse peptidique classique en solution utilisant l'EDCI comme agent de couplage.

Le produit final **46** a été analysé par CLHP chirale afin de vérifier le niveau d'épimérisation induit par cette méthode (Figure 54). Le chromatogramme semble montrer que le peptide obtenu ne s'est pas épimérisé au cours de la synthèse.





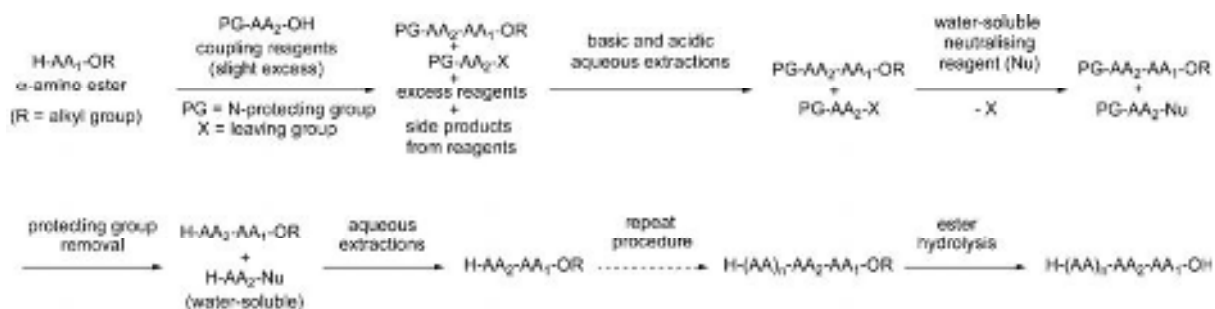
**Figure 54** : Chromatogramme du pentapeptide **46** obtenu par la méthode de synthèse peptidique classique en solution (colonne ChiralCell OD-H 250 x 4,6 mm, n-heptane/isopropanol 1/1).

Ce protocole de synthèse nous a permis d'obtenir le produit désiré avec une excellente pureté, néanmoins en quantités insuffisantes pour continuer la synthèse (54 mg sur les deux synthèses). La synthèse classique en solution, pour être efficace, nécessite l'optimisation de chaque étape de couplage et de chaque purification pour accéder à des quantités suffisantes de peptide final. Nous avons ainsi décidé de tester une autre méthode de synthèse peptidique pour la préparation du second peptide consensus, TVVVT : la synthèse peptidique continue en solution.

#### b) Synthèse peptidique continue en solution

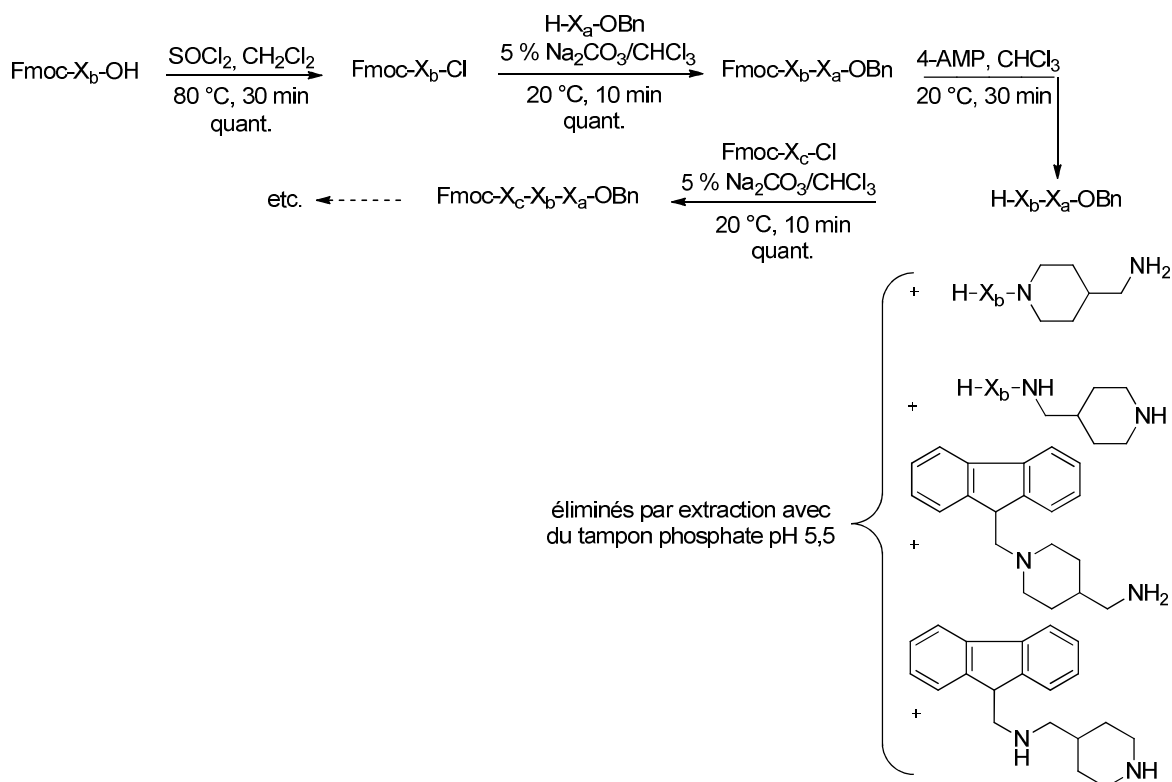
La synthèse peptidique continue en solution consiste à produire des peptides en utilisant une procédure répétitive ne nécessitant pas de purifications intermédiaires. La répétition des mêmes étapes de couplage et d'isolement des produits simplifie grandement la production du peptide. L'efficacité de cette méthode repose sur l'utilisation d'un excès d'acide aminé activé pour déplacer l'équilibre de la réaction de couplage. Cette approche est similaire à celle employée pour la synthèse sur support solide, à la seule différence que l'excès de réactif ne peut pas être éliminé par simple filtration d'une résine. Dans cette stratégie, des réactifs nucléophiles solubles en phase aqueuse sont ajoutés au mélange réactionnel pour neutraliser l'excès d'espèce réactive, puis les sous-produits sont éliminés par extractions acides et basiques (Schéma 5). Le groupement *N*-protecteur est ensuite clivé, puis le peptide est isolé après une série de lavages. Les cycles de

couplage-déprotection sont répétés jusqu'à obtenir la séquence désirée. Par comparaison avec la synthèse peptidique sur support solide, cette procédure utilise moins d'agent de couplage (souvent onéreux) et produit moins de déchets. La synthèse continue en solution convient tout particulièrement à la synthèse de petits peptides à l'échelle multigramme.



**Schéma 5** : Procédure générale de synthèse peptidique continue en solution.<sup>302</sup>

Une des premières méthodes de ce type fut développée par l'équipe de Louis Carpino, peu après la description du groupement Fmoc comme nouveau groupement protecteur.<sup>298, 303</sup> La méthode développée permet l'obtention d'un hexapeptide en quelques heures avec un rendement global de 40 % après une purification finale par chromatographie sur gel de silice, sans racémisation.<sup>299</sup> La synthèse commence par la conversion de l'acide carboxylique d'un acide aminé  $X_b$  en chlorure d'acide en présence de chlorure de thionyle. Le chlorure d'acide en léger excès (10 à 50 %) est ensuite couplé à un second acide aminé  $X_a$  en milieu biphasique pour donner quantitativement le dipeptide Fmoc- $X_b$ - $X_a$ -OBn. Après décantation du milieu réactionnel, la phase organique est traitée avec de la 4-AMP afin de cliver le groupement Fmoc. Ce réactif sert à déprotéger le dipeptide et à piéger le DBF ainsi que l'excès de chlorure d'acyle n'ayant pas réagi pendant le couplage. Tous ces sous-produits sont éliminés par des lavages avec une solution de tampon phosphate à pH 5,5 avant d'engager le dipeptide déprotégé dans une autre réaction de couplage avec un chlorure d'acide  $X_c$  (Schéma 6).

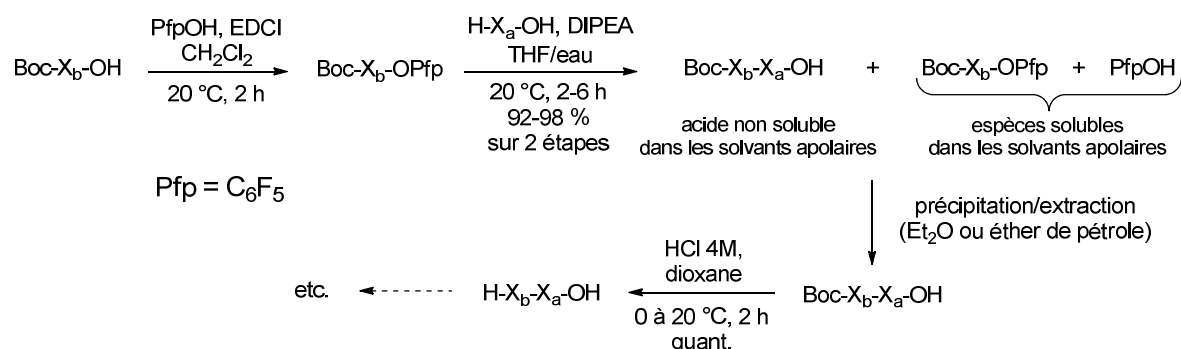


**Schéma 6 :** Procédure de synthèse peptidique continue en solution développée par Carpino *et al.*<sup>299</sup>

Cette méthode efficace présente néanmoins un certain nombre de limitations. D'une part, il arrive que le dipeptide cyclise lors de l'étape de déprotection, ce qui peut conduire à de sévères pertes de produit. D'autre part, la formation d'émulsions complique l'extraction des sous-produits. Enfin, il est difficile d'introduire des acides aminés hydrophiles tels que la glutamine avec cette méthode, car ils sont peu solubles dans le chloroforme.

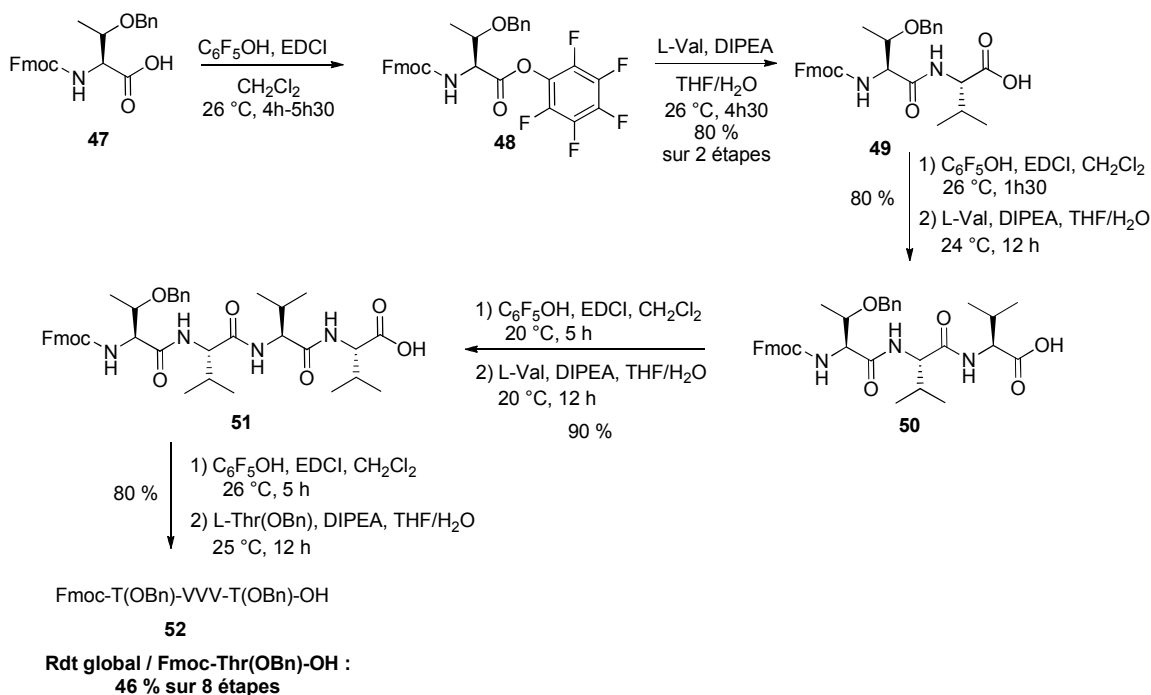
Une procédure récemment développée par l'équipe du Pr. Laurent Trembleau permet de surmonter ces problèmes.<sup>302</sup> Cette synthèse implique le couplage d'acides aminés avec des esters de pentafluorophénol d'acides aminés *N*-Boc dans un mélange THF/eau (Schéma 7). Dans ce mélange de solvant, les temps de réaction sont courts, et l'ester de pentafluorophénol réagit avec l'acide aminé plus vite qu'il ne s'hydrolyse. Grâce à leur faible solubilité, les intermédiaires peptidiques hydrophiles sont isolés avec une bonne pureté par précipitation dans des solvants apolaires. Ces solvants servent à extraire en même temps l'excès d'ester activé et le pentafluorophénol libéré au cours de la réaction. Cette méthode ne nécessite pas de réaction de neutralisation et réduit significativement le nombre d'opérations pour obtenir les intermédiaires peptidiques. Grâce à cette méthode, 2,7 g du

pentapeptide Boc-GRGDS-OH ont été obtenus en 14 étapes avec un rendement global de 67 %, sans épimérisation apparente.



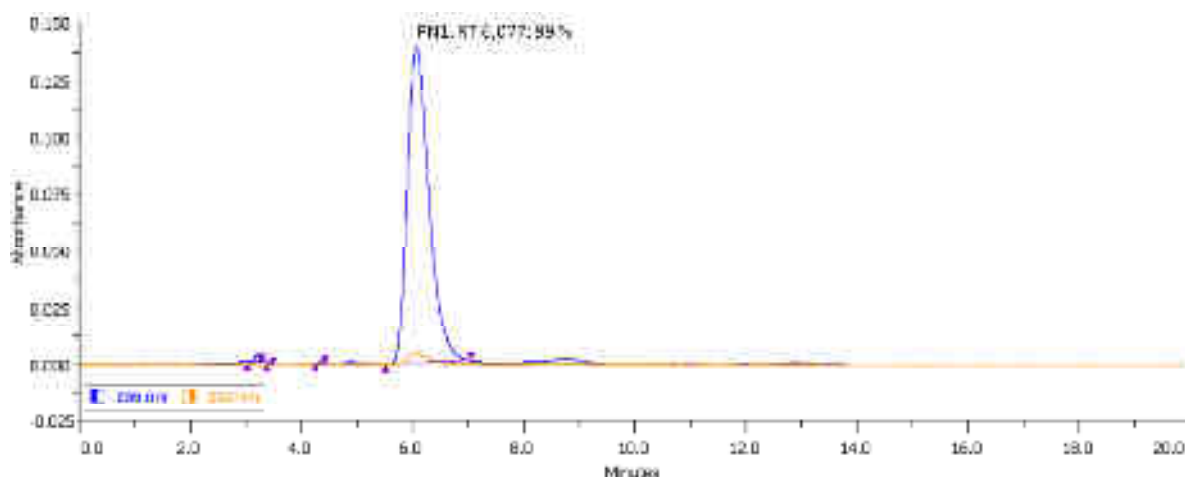
**Schéma 7** : Procédure de synthèse peptidique continue en solution développée par Trembleau *et al.*<sup>302</sup>

Nous avons voulu améliorer cette méthode en éliminant les étapes de déprotection intermédiaires. Dans ce but, la chaîne peptidique est allongée par l'extrémité C-terminale. La synthèse du pentapeptide TVVVT commence donc par l'activation de la fonction acide de la *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(*L*)-thréonine **47** avec du pentafluorophénol, en utilisant de l'EDCI comme agent de couplage. L'ester de pentafluorophénol **48** est ensuite directement couplé avec la (*L*)-valine, dans un mélange THF/eau et en présence de DIPEA. Le dipeptide **49** est ensuite purifié par lavage acide pour éliminer l'EDCI, puis par trituration dans de l'éther diéthylique afin d'éliminer l'excès d'ester activé **48** et le pentafluorophénol libéré dans le milieu réactionnel. Cette procédure a permis d'obtenir le dipeptide **49** avec 80 % de rendement sur deux étapes. Les deux étapes d'activation-couplage sont ensuite répétées pour obtenir successivement le tripeptide **50**, le tétrapeptide **51** et enfin le pentapeptide **52** désiré (Schéma 8).



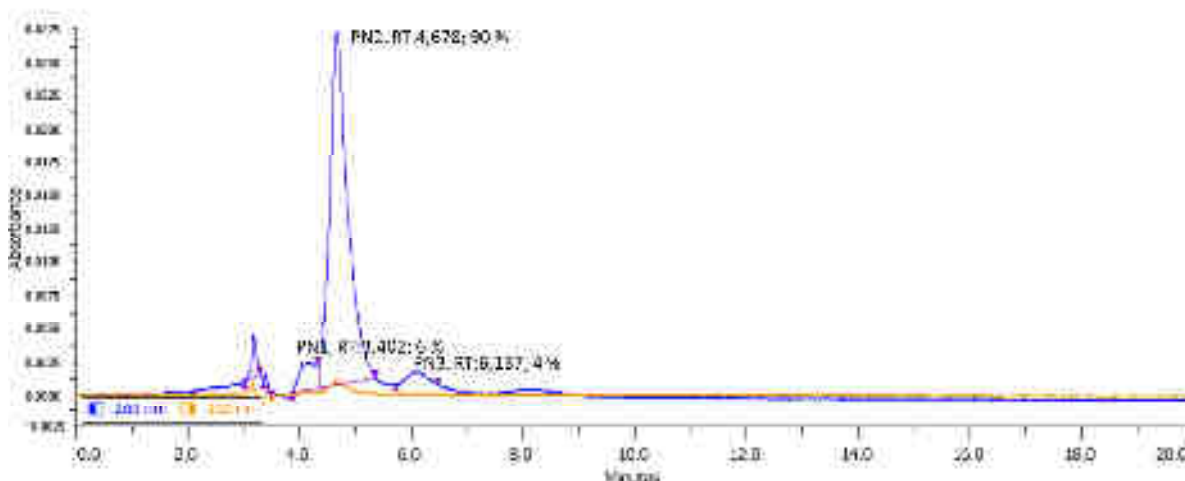
**Schéma 8** : Synthèse du pentapeptide TVVVT **52** par la méthode de synthèse peptidique continue en solution.

Lorsqu'une nouvelle méthode de synthèse peptidique est développée, il est crucial de vérifier l'absence d'épimérisation lors des couplages peptidiques. Ce phénomène est en effet un problème récurrent en synthèse peptidique, et peut être amplifié lorsque la chaîne peptidique est allongée par l'extrémité C-terminale.<sup>304</sup> Toutefois, l'épimérisation n'étant pas visible sur les analyses RMN de nos composés, des analyses par CLHP chirale ont été entreprises pour vérifier ce point primordial. Le chromatogramme du dipeptide **49** confirme qu'il n'y a pas d'épimérisation sur les deux premières étapes, communes avec la méthode de Trembleau et collaborateurs (Figure 55).



**Figure 55** : Chromatogramme du dipeptide **49** obtenu par la méthode de synthèse peptidique continue en solution (colonne ChiralCell OD-H 250 x 4,6 mm, n-heptane/isopropanol 1/1).

En revanche, le chromatogramme du peptide final **52** montre qu'une épimérisation partielle a eu lieu lors des couplages peptidiques suivant (Figure 56). Cette épimérisation reste toutefois limitée et acceptable à l'échelle de la centaine de milligrammes. Ce produit pourra en effet être purifié par CLHP chirale semi-préparative.



**Figure 56** : Chromatogramme du pentapeptide **52** obtenu par la méthode de synthèse peptidique continue en solution (colonne ChiralCell OD-H 250 x 4,6 mm, n-heptane/isopropanol 1/1).

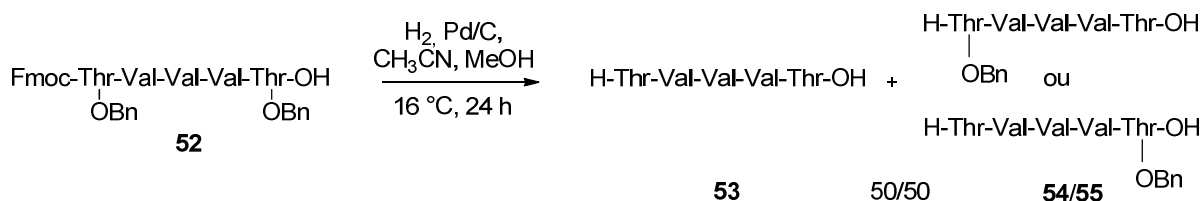
Notre protocole nous a permis d'obtenir 106 mg du pentapeptide Fmoc-TVVVT-OH avec un rendement global de 46 % sur 8 étapes, ce qui constitue une nette amélioration par rapport à la synthèse classique en solution. En outre, les avantages de cette méthode sont nombreux : il n'y a pas d'étapes de protection/déprotection, pas de purifications

intermédiaires par chromatographie sur colonne, les temps de réactions sont relativement courts et l'optimisation des conditions réactionnelles de chaque étape n'est pas nécessaire. Toutefois un effort supplémentaire devra être entrepris pour la purification du produit final **52** par CLHP chirale semi-préparative.

### c) Déprotection des peptides

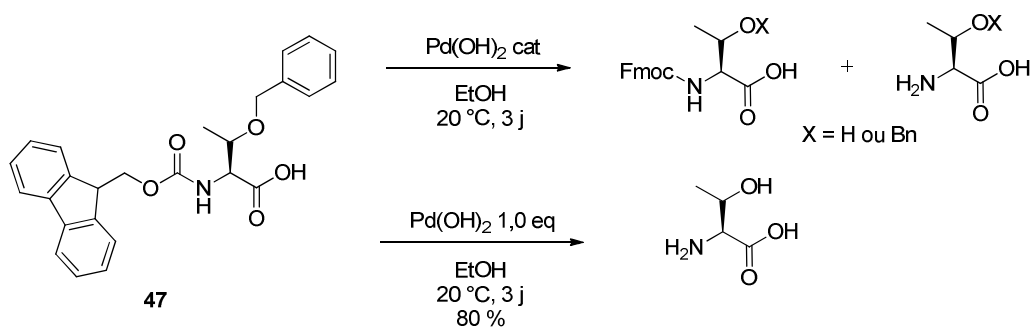
Nous souhaitons déprotéger les peptides afin de servir de contrôle lors de l'évaluation biologique des inhibiteurs potentiels de type **31** et **32** sur des cultures de *P. aeruginosa*. Cela nous permettra d'évaluer notamment la contribution des ancrages hétérocycliques à l'activité biologique.

Les extrémités N-terminales des peptides **46** et **52** sont protégées par des groupements Fmoc, clivables en milieu basique comme nous avons pu le voir précédemment. Les groupements hydroxyles des chaînes latérales sont quant à eux protégés sous forme d'éthers benzyliques et sont généralement déprotégés par hydrogénation catalytique. Nous aimerions déprotéger les fonctions amine et hydroxyle en une seule réaction. Bien que le groupement Fmoc soit reconnu comme résistant à l'hydrogénation, il a été reporté récemment que l'acétonitrile catalyse le clivage du groupement Fmoc dans des conditions classiques d'hydrogénation, selon un mécanisme encore mal connu.<sup>305</sup> En effet, la réduction de l'acétonitrile en éthylamine n'explique pas le clivage du groupement Fmoc dans les conditions d'hydrogénation catalytique. En parallèle, le dibenzofulvène très réactif libéré dans le milieu réactionnel est neutralisé grâce à la réduction de la double liaison par l'hydrogène pour donner du méthylfluorène inerte dans ces conditions. Nous avons donc essayé dans un premier temps une hydrogénation catalytique classique utilisant du palladium(0) sur charbon comme catalyseur, en présence d'acétonitrile, pour déprotéger à la fois les groupements benzyles et Fmoc du peptide **52** (Schéma 9). Ces conditions permettent effectivement de déprotéger la fonction amine. Par contre, la débenzylation n'est pas totale. Nous obtenons un mélange 50/50 entre le produit désiré **53** et les isomères monobenzylés **54/55**.



**Schéma 9** : Déprotection du groupement Fmoc et débenzylation partielle du pentapeptide **52** dans des conditions d'hydrogénation catalytique classique en présence d'acétonitrile.

Les éthers benzyliques protégeant les chaînes latérales des sérines et surtout des thréonines peuvent être difficiles à déprotéger, à cause de leur encombrement stérique important. De plus la présence d'acétonitrile/d'éthylamine peut inhiber la réaction, plus efficace en milieu acide. Nous avons donc mis au point de nouvelles conditions réactionnelles sur de la *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(*L*)-thréonine **47**, utilisée comme modèle de façon à préserver notre stock de peptide **52**. Nous avons voulu tester le catalyseur de Pearlman, connu pour être plus efficace dans ce type de réaction, en milieu neutre (Schéma 10). L'utilisation de ce réactif en quantité catalytique ne permet de déprotéger la fonction amine que partiellement mais une quantité stœchiométrique de catalyseur permet de déprotéger à la fois les fonctions amines et les fonctions hydroxyles.



**Schéma 10** : Mise au point des conditions d'hydrogénation sur de la *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(*L*)-thréonine **47**.

Ces conditions réactionnelles permettent donc de déprotéger la fonction amine et la fonction hydroxyle en une seule étape. Nous pourrions ainsi appliquer ce protocole pour déprotéger les chaînes latérales des pentapeptides **46** et **52**.

En parallèle synthèse des peptides **46** et **52** et de la mise au point de conditions de déprotection, nous avons étudié la synthèse des ancres moléculaires hétérocycliques auxquelles les peptides seront connectés par leur extrémité C-terminale.

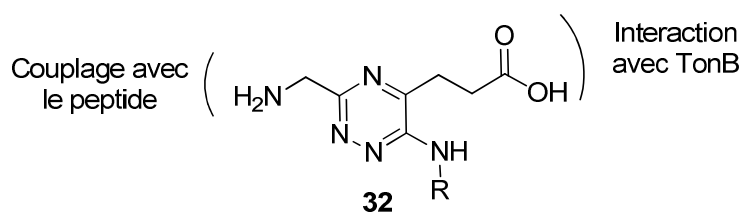


## 2. Synthèse des ancres hétérocycliques

Nous avons élaboré des ancres moléculaires hétérocycliques originalement substituées dans le but de créer des interactions spécifiques supplémentaires avec TonB, et ainsi augmenter l'affinité des peptides pour la protéine. Nous avons vu précédemment que des noyaux de type 1,2,4-triazine et isoindole devraient pouvoir remplir ce rôle. Les approches vers ces deux types d'hétérocycles vont maintenant être présentées successivement.

### a) Synthèse du noyau de type 1,2,4 triazine

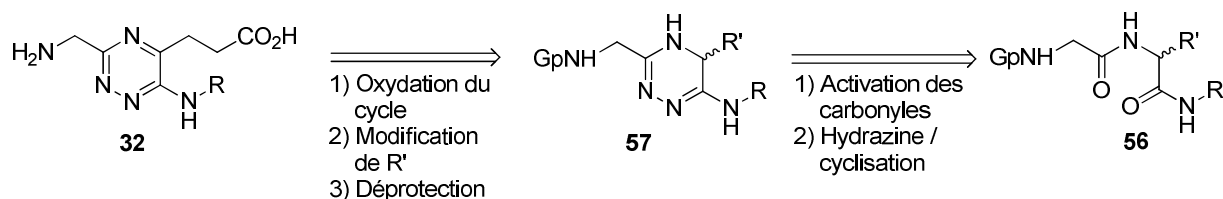
Les hétérocycles de type 1,2,4-triazine sont inclus dans les structures de nombreux médicaments. Les 1,2,4-triazines possèdent en effet des propriétés pharmacologiques remarquables : anticancéreux, antiviraux, antifongiques et antibactériens.<sup>306-310</sup> Nous avons donc voulu ajouter aux peptides un noyau 1,2,4-triazine trisubstitué de type **32** (Figure 57). L'hétérocycle sera fonctionnalisé d'une part par une chaîne aliphatique comportant un acide carboxylique terminal, et d'autre part par une amine secondaire, qui seront capables d'interagir avec des résidus polaires de TonB. L'amine primaire permettra de coupler l'ancre moléculaire à la chaîne peptidique mimant les boîtes TonB des transporteurs de membrane externe.



**Figure 57** : Structure de l'ancre moléculaire de type 1,2,4-triazine **32**.

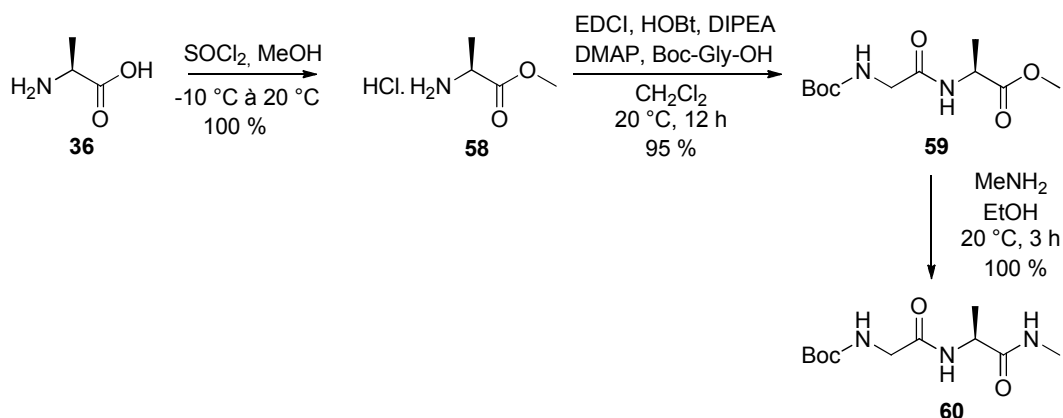
La littérature recèle de nombreuses méthodes de synthèse des 1,2,4-triazines, qui sont principalement basées sur la condensation d'hydrazides ou hydrazones avec des composés mono ou dicarbonylés.<sup>311-317</sup> Cependant ces procédures s'appliquent la plupart du temps uniquement à la synthèse de noyaux substitués par des groupements aromatiques (phényles, benzyles, hétérocycles) ou aliphatiques (méthyles, etc.). Nous avons donc souhaité développer une méthode de synthèse originale permettant d'introduire une plus

grande diversité de substituants sur le cycle, en utilisant des acides aminés comme produits de départ. Une voie de synthèse partant d'un dipeptide de type **56** a donc été imaginée. L'activation des fonctions carbonyles permettra de réaliser une cyclisation avec de l'hydrazine afin d'obtenir le cycle 4,5-dihydro-1*H*-[1,2,4]triazine **57** trisubstitué. L'oxydation du cycle, suivie de modifications fonctionnelles adéquates et de la déprotection finale de l'amine nous permettront de produire l'ancre moléculaire **32** recherchée (Schéma 11).



**Schéma 11** : Rétrosynthèse de l'ancre moléculaire de type 1,2,4-triazine **32**.

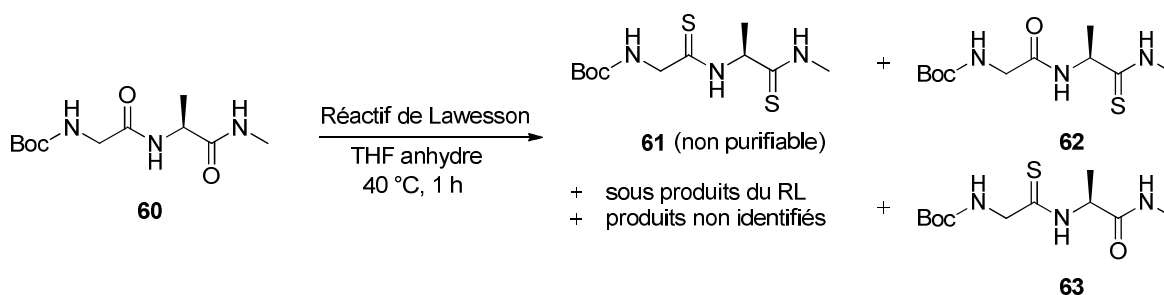
Afin de mettre au point cette synthèse, nous avons préparé le dipeptide de type **56** en partant de l'alanine **36** (Schéma 12). Celle-ci est transformée quantitativement en ester méthylique **58** en présence de chlorure de thionyle dans le méthanol.<sup>318</sup> Le chlorhydrate **58** ainsi obtenu est ensuite couplé avec la *N*-Boc-glycine en utilisant l'EDCI en présence de HOBT et de base de Hunig. Le dipeptide **59** est isolé avec un rendement de 95 %. Enfin, la fonction ester du dipeptide **59** est convertie quantitativement en amide grâce à une solution alcoolique de méthylamine à température ambiante. Le dipeptide amide **60** est donc obtenu en trois étapes avec un rendement global de 95 %.



**Schéma 12** : Synthèse du dipeptide amide Boc-Gly-Ala-NHMe **61**.

L'hydrazine, considérée comme 1,2-dinucléophile, se condense plus facilement sur de bons diélectrophiles très appauvris. La transformation des carbonyles en thiocarbonyles, meilleurs 1,4-diélectrophiles, devrait faciliter la condensation de l'hydrazine et nous permettre d'obtenir le cycle 4,5-dihydro-1*H*-[1,2,4]triazine de type **57**. Nous avons donc voulu activer les fonctions carbonyles des deux amides de l'intermédiaire **60** en les thionant à l'aide du réactif de Lawesson (RL), un agent de thionation très efficace notamment sur les fonctions carbonyles des cétones, des amides et des lactames.<sup>319, 320</sup>

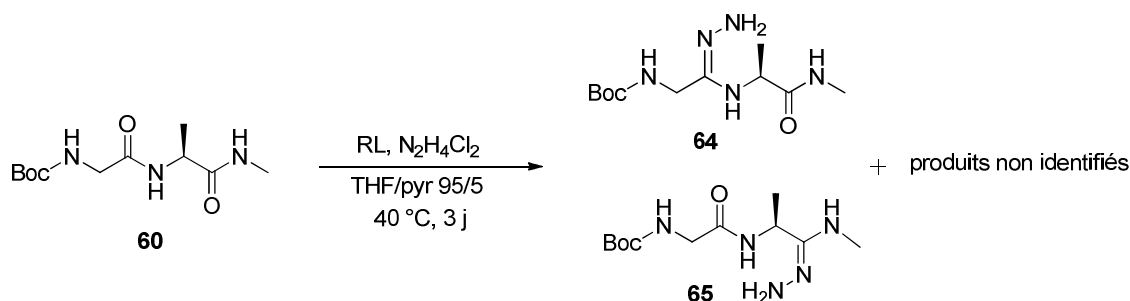
La double thionation d'amides secondaires de peptides réalisée avec un réactif similaire n'a été décrite qu'une seule fois dans la littérature. Cette réaction a été réalisée avec 0,8 eq d'un analogue du réactif de Lawesson à 40 °C afin d'obtenir un tripeptide monothioné, mais 20 % de produit bithioné furent également obtenus par cette méthode.<sup>321</sup> Nous avons donc lancé un premier essai de réaction du dipeptide **60** avec le RL, à 40 °C dans du THF anhydre pendant 1 h (Schéma 13). Une analyse par LC-MS du brut réactionnel a montré que le peptide bithioné **61** recherché s'était formé (20 %), mais au sein d'un brut complexe comprenant de nombreux sous-produits, dont ceux issus du réactif de Lawesson (20 %), des peptides monothionés **62/63** (10 %) et d'autres produits non identifiés. Une chromatographie sur gel de silice démétaillée n'a pas permis d'isoler le produit **61** désiré ; en effet celui-ci reste contaminé par les sous-produits du RL connus pour être difficilement éliminables dans certains cas.<sup>322</sup>



**Schéma 13** : Tentative de double thionation du dipeptide **60** avec le réactif de Lawesson.

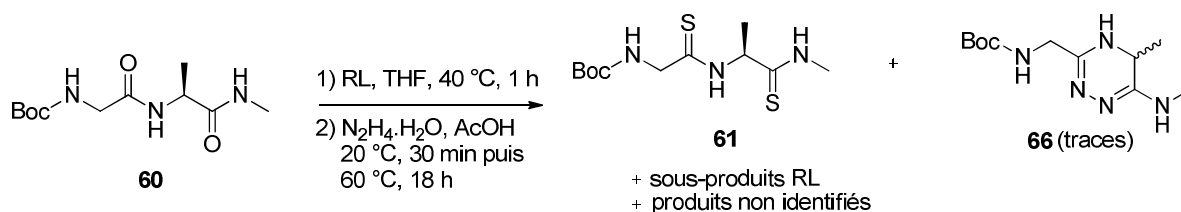
Le peptide bithioné **61** n'étant pas isolable, nous avons essayé de réaliser la thionation et la cyclisation en synthèse monotope. Nous nous sommes pour cela inspirés de conditions développées pour la synthèse de 5-aminopyrazoles.<sup>323</sup> Le peptide **60** a donc été mis en réaction avec le RL et du chlorure d'hydrazine dans un mélange THF/pyridine anhydre (95/5).

Dans ces conditions, le réactif de départ **60** est consommé très lentement. La chromatographie sur couche mince (CCM) du mélange réactionnel indique que le produit bithioné qui se forme petit à petit est consommé tout aussi lentement. Une fois de plus, le produit de la réaction n'a pas été purifiable par chromatographie sur colonne. Une analyse par LC-MS du brut réactionnel a révélé qu'il n'y avait plus de peptide bithioné **61** dans le milieu, mais qu'il restait des traces (3 %) d'un produit pouvant correspondre aux intermédiaires **64/65**. D'autres produits, non identifiés, se sont formés. Ces produits présentent une masse plus élevée que celles attendues, et sont sans doute le fruit de réactions intermoléculaires indésirables (Schéma 14).



**Schéma 14** : Essai de synthèse monotope d'une 1,2,4-triazine fonctionnalisée.

L'hydrazine semblant ralentir la réaction de thionation dans les conditions précédentes, nous avons tenté de réaliser la réaction de manière séquentielle (Schéma 15). Le produit brut issu de la double thionation de **60** par le RL est engagé directement dans la réaction de cyclisation, à chaud en présence d'hydrate d'hydrazine dans l'acide acétique.<sup>324</sup> La présence de produit bithioné **61** résiduel dans le brut réactionnel est révélée par CCM et LC-MS. Cette dernière analyse a également permis de montrer que des traces (7 %) d'un produit pouvant correspondre au produit désiré **66** s'étaient formées pendant la réaction. Cependant des produits ayant une masse bien plus élevée, pouvant correspondre à la formation de dimères par réactions intermoléculaires, sont également présents.



**Schéma 15** : préparation de la 1,2,4-triazine fonctionnalisée **66** par réactions de thionation et de cyclisation séquentielles.

Nous obtenons donc bien le produit bithioné **61** à partir du dipeptide amide **60** grâce au réactif de Lawesson. Le composé **61** est difficile à isoler, ce qui pose apparemment problème pour la réaction suivante, l'addition d'hydrazine puis la cyclisation. Le dernier résultat, bien qu'encourageant grâce à la détection de traces du produit désiré **66**, montre que la réaction avec l'hydrazine n'est pas complète. Nous pourrions chauffer davantage, mais au risque de dégrader le peptide bithioné **61** qui, nous l'avons mentionné, n'est pas une espèce stable. Nous avons donc décidé de modifier légèrement notre stratégie de synthèse des triazines de type **32** en passant par des intermédiaires de type 4,5-dihydro-1,2,4-triazin-6(1*H*)-one **67**, en partant toujours de dipeptides de type **56** (Schéma 16).

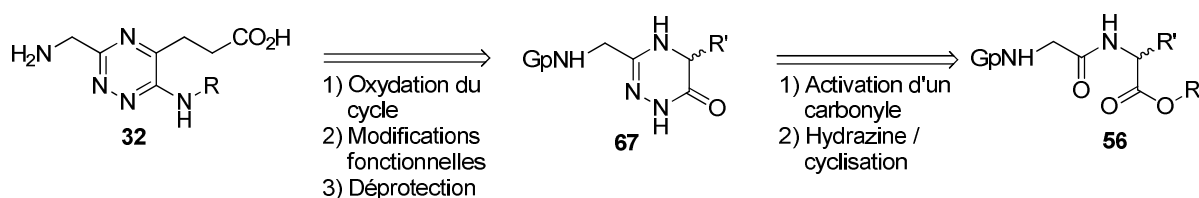
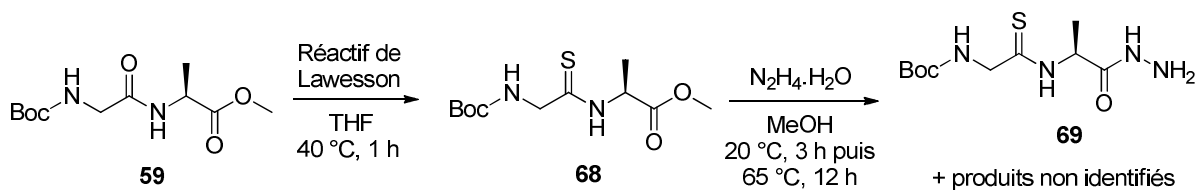


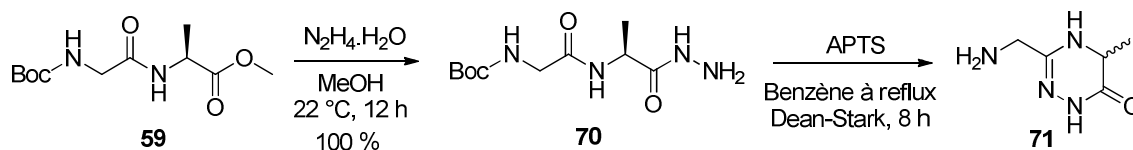
Schéma 16 : Rétrosynthèse de l'ancrage moléculaire de type 1,2,4-triazine **32**.

La préparation de dérivés de type 4,5-dihydrotriazinone est beaucoup plus documentée que celle des 1,2,4-triazines.<sup>325-327</sup> La synthèse que nous envisageons a, par ailleurs, déjà été décrite par Lawesson,<sup>328</sup> mais n'a jamais trouvé d'applications dans la synthèse de composés à visée thérapeutique. Le groupement carbonyle de la fonction amide du dipeptide est thioné sélectivement grâce au réactif de Lawesson, en 1 h à 80 °C. Les esters et lactones réagissent en effet dans des conditions réactionnelles beaucoup plus dures, permettant de réaliser des thionations sélectives des fonctions amides par activation thermique.<sup>329-331</sup> Après purification, l'hydrate d'hydrazine est ajouté, puis le mélange est chauffé à reflux dans de l'éthanol ou du dioxane pendant 1 h. Nous avons donc adapté cette méthode en utilisant les conditions de thionation mise au point précédemment. Toutefois, après purification sur gel de silice démetallée, le thiodipeptide **68** reste contaminé par les sous-produits du réactif de Lawesson. Il a donc dû être utilisé tel quel dans la réaction suivante, la condensation avec l'hydrazine. Nous avons procédé en deux étapes : l'hydrazide **71** est tout d'abord formée à température ambiante, puis le mélange réactionnel est porté à reflux afin d'obtenir la triazinone recherchée. Cependant, aucune trace de ce produit n'a été observée même après une nuit à reflux dans le méthanol. L'hydrazide **69** est le seul produit identifiable par LC-MS au sein d'un brut complexe (Schéma 17).



**Schéma 17** : Monothionation puis addition d'hydrazine sur le peptide **59** en vue d'obtenir un 1,2,4-triazinone.

Confrontés à ce résultat, nous avons à nouveau modifié la séquence réactionnelle. Nous avons cette fois fait réagir l'hydrazine avec le dipeptide **59**, afin de former quantitativement l'hydrazide **70**.<sup>323, 332</sup> La condensation a ensuite été réalisée à reflux dans du benzène. Elle est catalysée de l'acide *p*-toluènesulfonique (APTS), et un appareil de Dean-Stark est utilisé pour éliminer l'eau libérée au cours de la réaction. L'analyse par LC-MS du brut réactionnel a montré que le seul produit formé était la 3-(aminométhyl)-5-méthyl-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-6(1*H*)-one **71** (Schéma 18). Ce produit extrêmement polaire n'a pas pu être extrait du milieu réactionnel.



**Schéma 18** : Synthèse de l'hydrazide **70** et préparation de la triazone **71**.

Ces résultats encourageants nous ont incités à poursuivre dans cette voie. Le groupement Boc ne résistant apparemment pas aux conditions de cyclisation, nous avons dû le remplacer par un groupement résistant à la fois aux conditions acides de la réaction de cyclisation, ainsi qu'à l'hydrazine utilisée dans l'étape précédente. Les groupements protecteurs classiques tels que le Fmoc, le Cbz (carbamate de benzyle), ou l'acétamide résistent aux conditions acides mais ne résistent généralement pas à l'hydrazine.<sup>304</sup> Notre choix s'est donc porté sur le groupement 2-(triphénylsilyl)éthoxycarbone (Tpseoc). Bien que nous travaillions avec ce groupe protecteur depuis plusieurs années au sein de notre équipe, les avantages relatifs à l'utilisation de celui-ci n'ont été décrits que récemment.<sup>333</sup> En effet, le groupement Tpseoc résiste à nos conditions de réaction et présente l'avantage d'être clivable dans des conditions douces, avec du TBAF (fluorure de tétra-*n*-butylammonium). Nous avons donc repris la synthèse en commençant par préparer de la *N*-Tpseoc-glycine. Le groupement protecteur est préparé à partir du 2-triphénylsilyléthanol **72**. Ce composé est mis en réaction

avec du triphosgène dans un mélange THF/pyridine. Le chloroformiate **73** en présence de bicarbonate de sodium dans un mélange THF/eau conduit à la glycine protégée **74** isolée avec un rendement de 91 %. La *N*-Tpseoc-glycine **74** ainsi préparée est couplée avec le chlorhydrate d'alanine **58** en présence d'EDCI, de HOBt et de DIPEA, afin de former le dipeptide **75** de manière quantitative (Schéma 19). L'hydrazide **76** est ensuite formée avec un excellent rendement grâce à la réaction de l'hydrate d'hydrazine sur l'ester **75**. Enfin, la cyclisation, qui a lieu en présence d'APTS en utilisant un montage de Dean-Stark, permet d'obtenir la 4,5-dihydro-1,2,4-triazin-6(1*H*)-one **77** avec un rendement de 40 %. Ce rendement moyen s'explique par la présence de produit de départ résiduel **76** à l'issue de la réaction. Il pourra donc être amélioré dans l'avenir en modifiant les conditions réactionnelles.

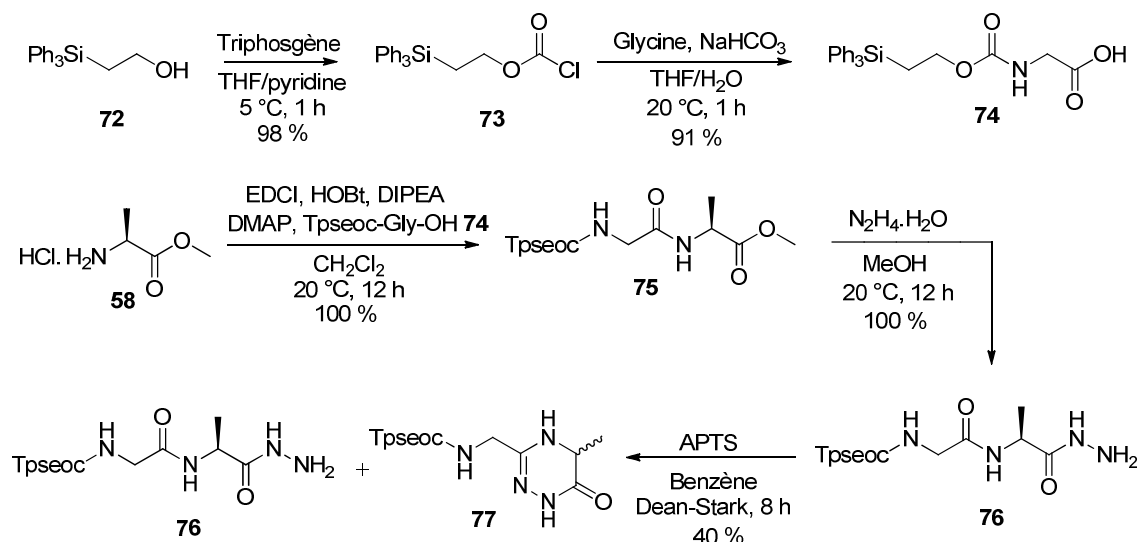
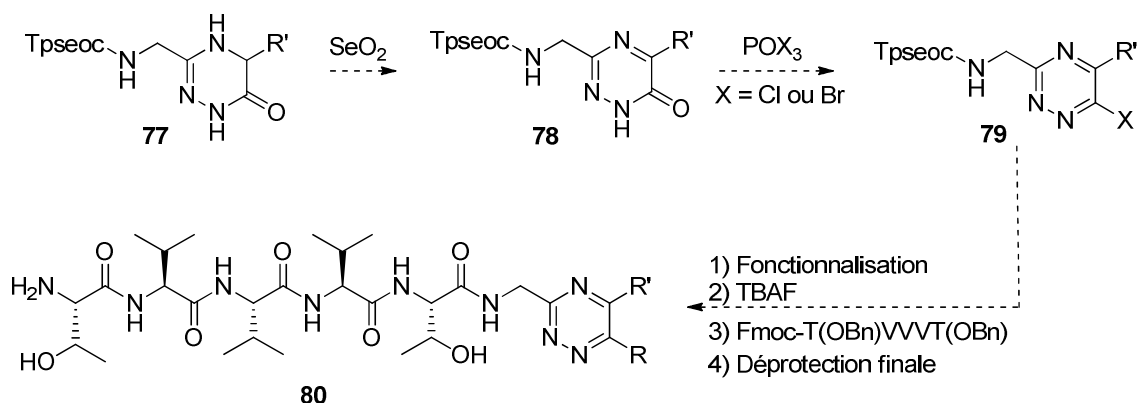


Schéma 19 : Synthèse de l'hétérocycle 4,5-dihydro-1,2,4-triazin-6(1*H*)-one **77**.

Cette synthèse originale devra désormais être étendue en remplaçant l'alanine de départ par les acides aminés, naturels ou non, de notre choix. Cela nous permettra d'introduire une grande variété de substituants  $-R'$ . Le cycle devra ensuite être oxydé, avec du dioxyde de sélénium par exemple, comme cela a été décrit pour la synthèse de pyridazines, pour obtenir un composé de type **78**.<sup>324</sup> Un traitement au  $\text{POCl}_3$  ou au  $\text{POBr}_3$  devrait ensuite nous permettre d'obtenir le dérivé halogéné **79** correspondant,<sup>324</sup> autorisant ainsi l'introduction d'une grande variété de groupements  $-R$ . L'amine sera ensuite déprotégée par du TBAF, afin de permettre le couplage de l'ancre moléculaire aux peptides et la synthèse des inhibiteurs de type **80** (Schéma 20).

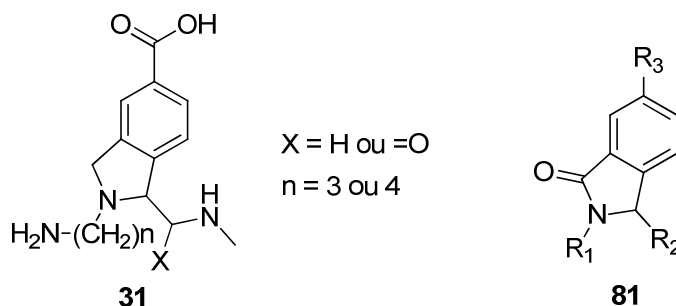


**Schéma 20** : Plan de synthèse de l'inhibiteur potentiel de TonB de type **80**.

En parallèle à la synthèse des ancres de type 1,2,4-triazine, nous avons également développé celle de noyaux de type isoindole.

#### b) Synthèse du noyau de type isoindole

La seconde ancre que nous souhaitons synthétiser est un noyau 2,3-dihydro-1*H*-isoindole de type **31** (Figure 58). Celui-ci sera fonctionnalisé par un acide carboxylique en position 5, ainsi que par un amide ou une amine en position 1 afin de cibler des résidus polaires de TonB. L'azote de l'hétérocycle sera quant à lui substitué par une chaîne aliphatique propylique ou butylique munie d'une fonction amine par laquelle seront greffés les peptides synthétisés précédemment.



**Figure 58** : Structures de l'ancre moléculaire de type isoindole **31** et des noyaux de types isoindolinones **81**.

La synthèse de ce type de molécule n'est pas décrite dans la littérature. Pourtant, les hétérocycles de type isoindole sont des motifs fréquents dans les molécules présentant des propriétés biologiques intéressantes, comme les ligands spécifiques du récepteur de la dopamine D<sub>3</sub> identifiés par les laboratoires GlaxoSmithKline.<sup>334</sup> Il n'existe qu'un nombre



limité de méthodes, bien souvent peu flexibles, pour la synthèse de 2,3-dihydro-1*H*-isoindoles. Elles décrivent généralement la synthèse d'isoindoles non substituées,<sup>335-337</sup> ou substituées en position 1 et/ou en position 3 par des cycles aromatiques.<sup>338-342</sup> Afin de pouvoir varier les substituants du noyau isoindole, nous souhaitons passer par un intermédiaire isoindolinone de type **81** (Figure 58).

Les isoindolinones sont généralement préparées à partir de l'anhydride phtalique, et comportent donc souvent deux fonctions carbonyles en position 1 et 3.<sup>343-346</sup> Cependant, la synthèse d'isoindolinones de type **82** en deux étapes a été décrite.<sup>347</sup> Ces molécules peuvent provenir d'un dérivé tricyclique **83** préparé à partir du composé **84** par une réaction de Diels-Alder IntraMoléculaire du Furane (IMDAF) avec l'alcyne. L'amide intermédiaire **84** peut être préparé quant à lui par une réaction multicomposants de Ugi (4-MCR) à partir d'un acide alcynoïque **85**, du furfural **86**, d'une amine **87**, et d'un isonitrile **88** (Schéma 21).

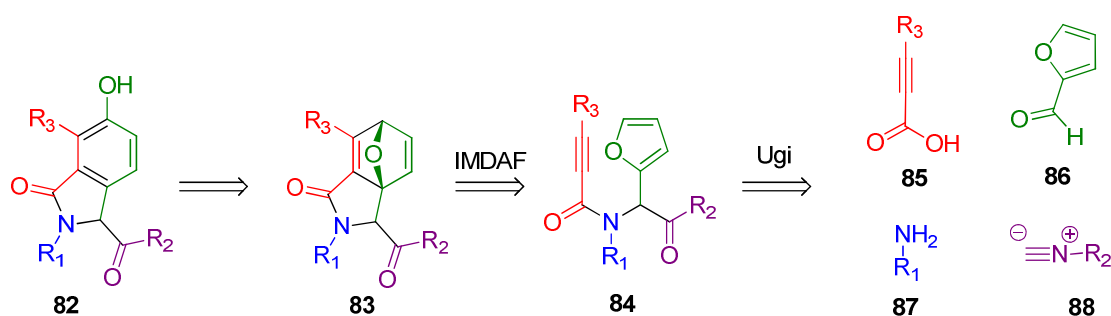


Schéma 21 : Rétrosynthèse des 2,3-dihydro-1*H*-isoindolinones de type **82**.

La réaction de Ugi implique la condensation d'une amine, d'un aldéhyde, d'un acide carboxylique et d'un isonitrile. C'est une réaction élégante qui permet d'obtenir des composés de type peptidique, substitués de manière originale et variée.<sup>348-350</sup> Dans notre cas, le groupement  $R_1$  introduit par l'amine **87** sera une chaîne aliphatique possédant une amine terminale, qui servira à connecter l'ancre moléculaire à la séquence peptidique. Le choix d'isonitriles commerciaux de type **88** étant relativement restreint, nous avons choisi dans un premier temps l'isocynoacétate de méthyle **89** pour permettre, éventuellement, des modifications ultérieures de  $R_2$ . Ce groupement pourra également être modifié dès le début de la synthèse en fonction de nos besoins, en synthétisant les isonitriles de notre choix à partir des nombreuses méthodes décrites dans la littérature.<sup>351-353</sup> Enfin, les alcynes vrais se décomposant dans les conditions de l'IMDAF,<sup>347</sup> le groupement  $R_3$  sera un méthyle

dans un premier temps. La réaction de Ugi que nous souhaitons réaliser a été décrite pour un composé très similaire au nôtre, où l'amine est substituée par de simples groupements aromatiques ou aliphatiques.<sup>354</sup>

La synthèse commence par la préparation des réactifs **91** et **92** nécessaires à la réaction de Ugi. Une solution de dicarbonate de di-*tert*-butyle est ajoutée goutte à goutte à une solution de diaminobutane **90** afin d'obtenir quantitativement le (4-aminobutyl)carbamate de *tert*-butyle **91**. Le 2-butynonate d'éthyle commercial **92** est quant à lui saponifié en milieu basique pour générer quantitativement l'acide butynoïque **93**. Le 2-furaldéhyde **86**, le (4-aminobutyl)carbamate de *tert*-butyle **91**, l'acide 2-butynoïque **93** et l'isocynoacétate de méthyle **89** sont ensuite mis en réaction dans le méthanol à température ambiante pendant trois jours pour donner le produit **94** avec un rendement de 30 %. Ce rendement moyen s'explique par des conditions de purifications par chromatographie sur colonne encore perfectibles (Schéma 22).

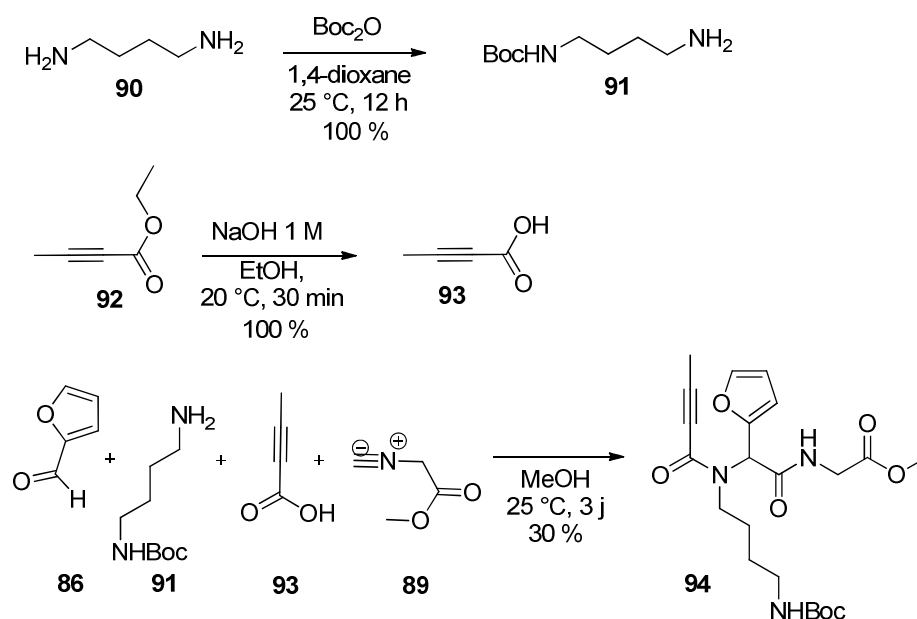


Schéma 22 : Préparation du composé **94** par la réaction de Ugi.

Bien qu'un certain nombre de mécanismes aient été proposés pour la réaction de Ugi, la première étape implique toujours la condensation de l'aldéhyde **86** et de l'amine **91** pour fournir l'imine **95**. L'acide carboxylique **93** est ensuite déprotoné par l'imine **95** pour donner l'ion iminium **96**. L'isocyanate **89** est ensuite additionné, puis l'acide alcynoïque réagit avec

le nitrilium **97** pour conduire à l'imidate **98**.<sup>355</sup> Un transfert d'acyle permet ensuite d'obtenir le dérivé peptidique **94** (Schéma 23).

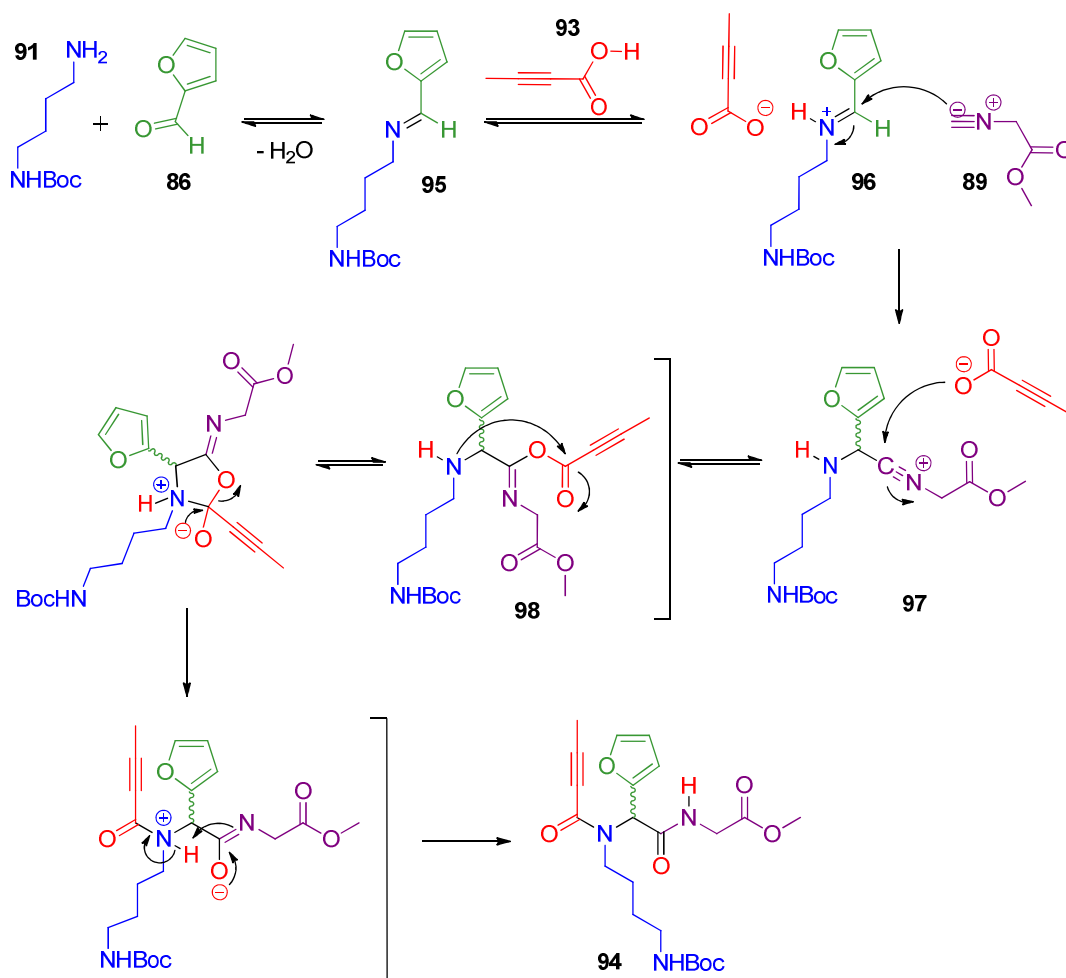
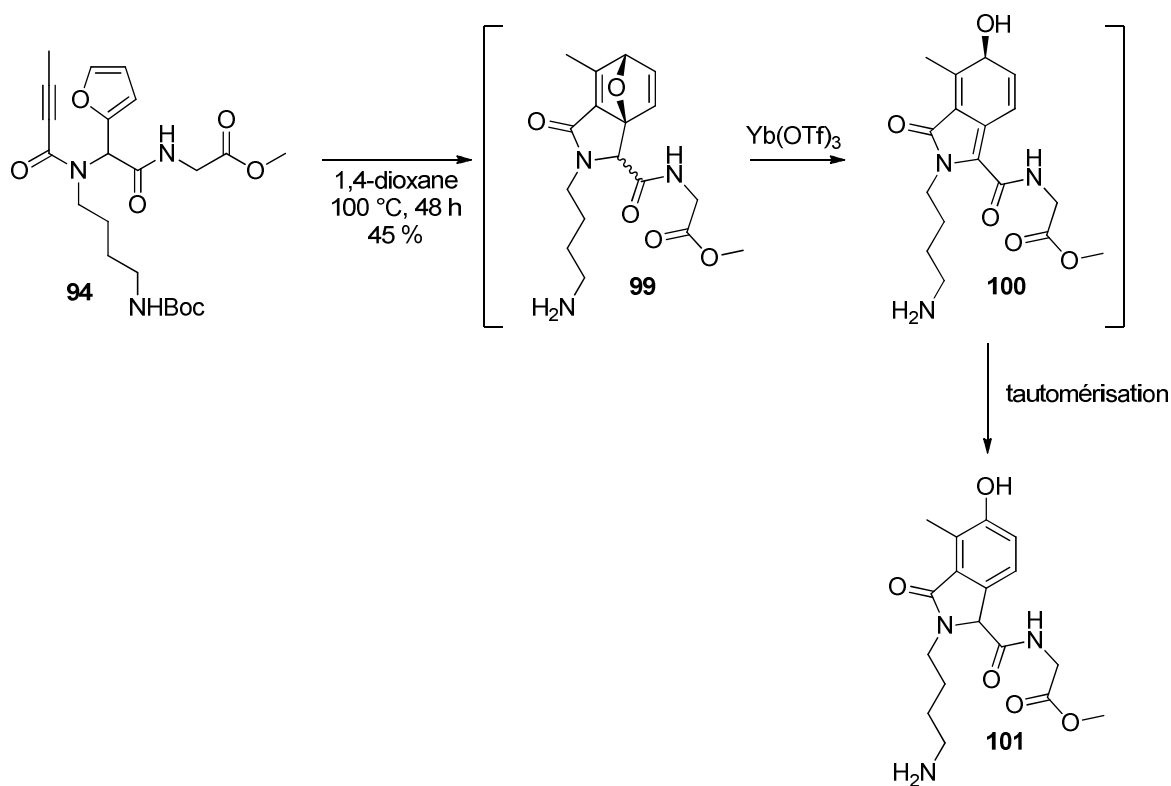


Schéma 23 : Mécanisme proposé pour la formation du composé **94** par la réaction de Ugi.

Dans la littérature, les produits issus de la réaction de Ugi sont ensuite souvent engagés dans des réactions permettant de produire divers hétérocycles.<sup>348-350, 356, 357</sup> Dans notre cas, l'adduit **94** subit une réaction de Diels-Alder intramoléculaire entre le motif furane et l'alcyne du composé **94**. La réaction est réalisée à 100 °C dans du 1,4-dioxane permet d'obtenir l'intermédiaire bicyclique **99**.<sup>354</sup> L'ajout de triflate d'ytterbium au milieu réactionnel catalyse l'ouverture du pont de l'oxabicyclo[2.2.1]heptadiène issu de l'IMDAF pour conduire à le lactame insaturée **100**, qui tautomérise ensuite pour donner l'isoindolinone **101**. Cette cascade réactionnelle particulière a été découverte par hasard lors de l'étude de la catalyse de l'IMDAF par des acides de Lewis sur des composés présentant la

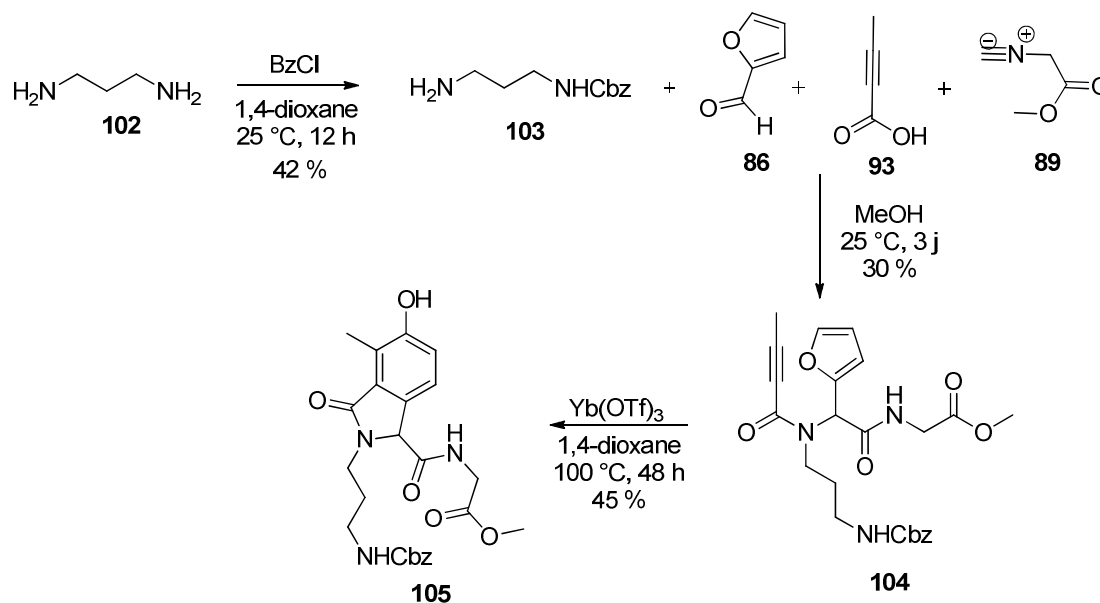
même ossature que les nôtres.<sup>347</sup> Toutefois, le triflate d'ytterbium est également, et malheureusement, responsable de la déprotection du groupement Boc (Schéma 24).



**Schéma 24** : Synthèse du composé **101** par une réaction de Diels-Alder intramoléculaire catalysée par du triflate d'ytterbium.

Des modifications fonctionnelles restent à faire sur l'isoindolinone **101** avant de pouvoir connecter l'ancre moléculaire à la partie peptidique par le biais de la fonction amine déprotégée. Nous avons repris cette synthèse en remplaçant le groupement Boc par un groupement Cbz, qui devrait être plus résistant aux conditions réactionnelles de l'IMDAF. Nous en avons également profité pour faire varier la longueur de la chaîne alkyle substituant l'amine. Une solution de chlorure de benzyle est ajoutée goutte à goutte à une solution de diaminopropane **102** afin d'obtenir le (3-aminopropyl)carbamate de benzyle **103** avec 42 % de rendement. Ce rendement moyen est lié à la formation du sous-produit diprotégé. Le 2-furaldéhyde **86**, le (3-aminopropyl)carbamate de benzyle **103**, l'acide 2-butynoïque **93** et l'isocynoacétate de méthyle **89** sont ensuite mis en réaction dans le méthanol à température ambiante pendant trois jours pour donner le produit **104** avec un rendement de 30 %. L'IMDAF catalysée au triflate d'ytterbium est ensuite lancée sur 48 h pour former l'isoindolinone **105** avec 45 % de rendement. Comme prévu, le groupement Cbz résiste aux

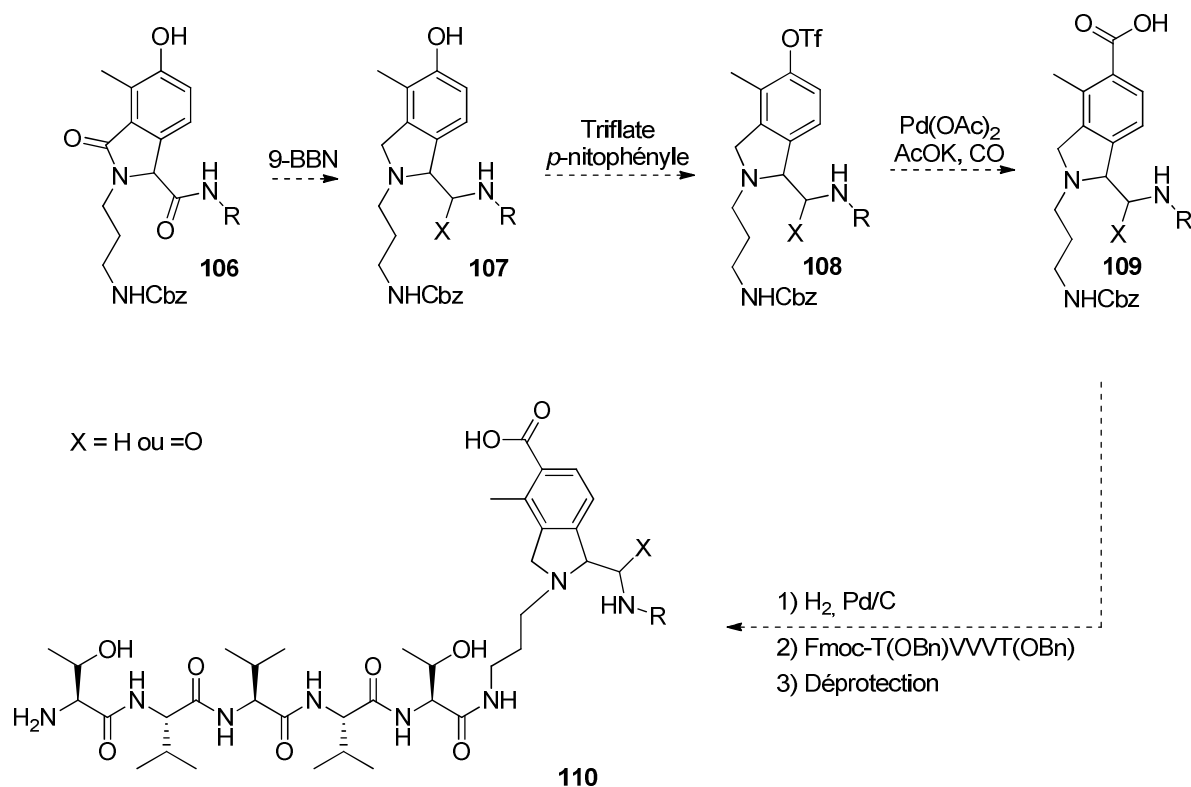
conditions réactionnelles employées. Il est toutefois envisagé de réaliser l'IMDAF au micro-onde afin d'augmenter le taux de conversion de la réaction (Schéma 25).



**Schéma 25** : Synthèse de l'isoindolinone **105** issue d'une réaction de Ugi combinée à une IMDAF.

Bien que cette synthèse doive à présent être optimisée, cette procédure élégante permet d'obtenir des isoindolinones **105** hautement substituées en seulement deux étapes, à partir de réactifs très simples. La suite de la synthèse de cette ancre consistera à réduire le lactame de l'isoindolinone **106** dans des conditions douces afin de ne pas affecter la fonction ester (Schéma 26). L'hydrure mixte d'aluminium et de lithium ( $\text{LiAlH}_4$ ), bien qu'étant le réactif le plus couramment utilisé pour cette réaction, sera donc à proscrire à cause de son manque de sélectivité.<sup>358, 359</sup> Des méthodes de réduction des lactames en amines utilisant l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL), le borohydrure de sodium<sup>360</sup> ou l'hydrosilylation catalysée par le rhodium ont été développées, mais rares sont celles qui tolèrent un groupement ester. Seuls les boranes ont été décrits comme réduisant spécifiquement les lactames et les amides en amines en présence d'un ester.<sup>361, 362</sup> Le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN) par exemple, peut réduire spécifiquement un lactame tertiaire en présence d'un ester avec d'excellents rendements.<sup>363, 364</sup> Toutefois, l'amide secondaire pourrait également être réduit par le 9-BBN,<sup>365, 366</sup> ce qui n'est pas un problème dans la mesure où ce carbonyle ne semble pas essentiel au pharmacophore. Le phénol de l'isoindole **107** sera ensuite activé sous la forme du triflate **108**, afin de réaliser l'insertion de CO par une catalyse au palladium pour

conduire à l'acide carboxylique **109**.<sup>367</sup> Enfin, l'amine **109** pourra être déprotégée par hydrogénation catalytique afin d'être couplée aux peptides et achever ainsi la synthèse des inhibiteurs potentiels de TonB de type **110**.



**Schéma 26:** Plan de synthèse d'inhibiteurs potentiels de TonB de type **110** à partir de d'intermédiaires de synthèse de type **106**.

En nous basant sur les données existantes dans la littérature ou tirées de bases de données, nous avons réussi à concevoir des inhibiteurs potentiels de la protéine TonB en utilisant les outils offerts par la modélisation et la bioinformatique. Sur la base des structures conçues, nous avons développés des méthodologies innovantes permettant d'accéder aux structures recherchées. Néanmoins, dans les temps impartis pour cette thèse, nous n'avons pas été en mesure de finaliser ces synthèses. Lorsque les synthèses de ces molécules seront achevées, nous serons en mesure d'évaluer d'une part leur affinité pour TonB, et d'autre part leur activité biologique. Dans ce but, nous avons travaillé en parallèle à la mise au point de divers tests permettant d'évaluer les propriétés de nos molécules.



**Evaluation des propriétés  
biologiques des inhibiteurs  
potentiels de TonB**





## I. Généralités

L'évaluation de l'activité biologique de nos composés de synthèse constitue un point crucial de ce projet. Dans ce contexte, nous avons souhaité développer un test *in vitro* capable de mettre en évidence, mais aussi de quantifier, l'interaction de nos inhibiteurs potentiels avec TonB, à partir des protéines bactériennes purifiées. Ces tests devraient permettre l'optimisation itérative de l'affinité des inhibiteurs pour la protéine TonB, prélude aux tests *in cellulo*. Notre laboratoire n'étant pas habilité à manipuler des bactéries multirésistantes ou utilisables comme armes biologiques, nous avons choisi de développer ces tests en utilisant les protéines issues de *Pseudomonas aeruginosa*, organisme modèle, dont la culture et la biologie moléculaire sont bien maîtrisées par les biologistes de notre équipe.

### A. Notre organisme modèle : *Pseudomonas aeruginosa*

C'est en 1882 que l'on comprit que la coloration bleu-verte des pansements de plaies chirurgicales était associée au bacille dit pyocyanique. Il s'agit d'un bacille fluorescent à Gram négatif en forme de bâtonnet de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'une longueur de 1,5 à 3  $\mu\text{m}$ , non fermentant, aérobic strict. Pratiquement toutes les souches sont mobiles grâce à un flagelle polaire unique (Figure 59).



**Figure 59** : A. *Pseudomonas aeruginosa* vu au microscope électronique à balayage. B. Culture de *Pseudomonas aeruginosa*. La fluorescence observée est due au sidérophore pyoverdine 27.

*P. aeruginosa* est un microorganisme saprophyte présent dans différents types d'environnement comme l'eau, les sols humides et les végétaux, et se nourrissant de

matières organiques en décomposition. La capacité de *P. aeruginosa* à survivre dans des environnements divers et dans des conditions nutritionnelles minimales a permis à cet organisme de coloniser progressivement les infrastructures humaines et l'Homme. Ce pathogène est en effet opportuniste : il s'attaque rarement aux personnes en bonne santé, mais se révèle particulièrement dangereux pour les patients présentant des plaies cutanées étendues (grands brûlés), immunodéprimés (sidéens) ou atteints par la mucoviscidose.<sup>368-370</sup> La capacité de ce microorganisme à coloniser facilement son hôte s'explique par le déploiement d'un grand nombre de facteurs de virulence.

L'excrétion massive d'invasines et de sidérophores vont conduire à la dégradation des protéines de l'hôte telles que l'élastine, le collagène et les transferrines, et à la séquestration du fer au profit du pathogène.<sup>79, 371</sup> En parallèle de ces stratégies d'attaque, la bactérie a développé des stratégies de défense en excréant des molécules ou des protéines dont le rôle consiste à contrer la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi la pyocyanine, un pigment soluble bleu-vert, est considérée comme une toxine de faible poids moléculaire qui peut facilement traverser les membranes biologiques pour affecter différentes fonctions essentielles dans la cellule hôte telles que l'inhibition de la respiration cellulaire ou la croissance cellulaire. De même, des toxines protéiques extracellulaires, comme l'exoenzyme S et l'exotoxine A, entraînent une inhibition de la synthèse protéique dans les cellules infectées.<sup>372</sup> Comme d'autres microorganismes, *P. aeruginosa* peut former un biofilm qui représente un facteur de résistance majeur de cet organisme face à la réponse immunitaire de l'hôte. Le biofilm est responsable de l'infection chronique chez les patients atteints de la mucoviscidose et se définit comme une population bactérienne adhérant à une surface et enveloppée d'une matrice d'exopolysaccharides. Cette matrice constitue un véritable bouclier protecteur pour les bactéries. Il est en effet très difficile pour les antibiotiques de diffuser à travers le biofilm. À cela s'ajoute une très faible perméabilité et des systèmes d'efflux performants qui rendent *P. aeruginosa* résistante à un grand nombre d'antibiotiques et responsable d'infections nosocomiales graves chez les patients fragilisés.<sup>373</sup> En outre, *P. aeruginosa* est phylogénétiquement proche des espèces *Yersinia* et *Burkholderia*, potentiellement utilisables comme armes bactériologiques. *P. aeruginosa* est donc un modèle adapté à la recherche de nouvelles antibiothérapies, à la fois en médecine civile et en médecine militaire.

## B. Evaluation des propriétés biologiques des inhibiteurs de TonB : état de l'art

La littérature ne recèle que d'un seul exemple de test biologique destiné à montrer l'inactivation de TonB par un inhibiteur.<sup>252</sup> Ce test *in cellulo* a été mis au point sur *E. coli* et exploite la susceptibilité de ce microorganisme au bactériophage  $\Phi$ 80 et aux colicines B et Ia.

Les colicines sont des substances bactéricides produites majoritairement par *E. coli* dans le but d'éliminer ses congénères en concurrence pour leur biotope. Elles sont classées dans des groupes selon leur mode d'action et leur spécificité. Elles utilisent des transporteurs de membrane externe pour rentrer dans les cellules et exercer leur action létale. Ainsi, les colicines B et Ia utilisent respectivement le transporteur de l'entérobactine FepA et le transporteur Cir pour s'introduire dans les bactéries.<sup>374-376</sup> Les bactériophages utilisent également des protéines de surface spécifiques pour s'introduire dans les cellules. Le phage  $\Phi$ 80 par exemple, utilise le transporteur du ferrichrome FhuA pour infecter *E. coli*.<sup>377</sup> Ces toxines ont un mode d'action antibactérien différent mais utilisent toutes trois des transporteurs TonB-dépendants pour infecter les cellules. Par conséquent, les bactéries présentant une machinerie TonB défectueuse seront insensibles à l'action de ces colicines ou du phage.

Ce test a été mis au point pour prouver que l'inhibition de la croissance d'*E. coli*, observée après l'ajout d'un fragment peptidique de boîte TonB dans le milieu de culture,<sup>265</sup> était bien liée à une inhibition de l'interaction TonB-TME, et non à la perturbation d'un autre système. Le protocole a été conçu dans l'optique de réaliser un criblage à grande échelle de molécules inhibant spécifiquement TonB et se déroule en deux temps. Un pré-criblage est réalisé afin de réduire le nombre de molécules devant être testées en milieu minimum. Lors de ce test, les composés qui permettent aux bactéries de résister aux colicines B et Ia sont sélectionnés. Cela signifie en effet que ces molécules sont capables d'inactiver les systèmes de transport TonB-dépendant utilisés par les colicines pour infecter les bactéries. La capacité d'inhibition de croissance des composés retenus après ce premier criblage est ensuite évaluée en milieu minimum. En effet, l'expression de TonB étant induite dans des conditions de carence en fer, les composés inhibant TonB se montrent particulièrement efficaces en milieu minimum. Ce

test en deux étapes permet donc d'identifier spécifiquement des inhibiteurs de TonB sur des cultures d'*E. coli*. Toutefois, malgré l'efficacité prétendue de ce test, aucune application n'a été décrite jusqu'ici dans la littérature.

*P. aeruginosa* n'étant que peu sensible aux colicines,<sup>378</sup> il nous faudra procéder différemment pour tester nos composés et prouver que leur action est bien due à l'inhibition de la protéine TonB. Nous souhaitons donc identifier dans un premier temps les ligands de TonB grâce à un test d'affinité réalisé dans des conditions *in vitro*. L'activité antibactérienne de ces molécules sera ensuite évaluée, tout comme leur aptitude à inhiber spécifiquement TonB, grâce à des tests réalisés *in cellulo* sur *P. aeruginosa*.

## II. Mise au point d'un test d'affinité *in vitro*

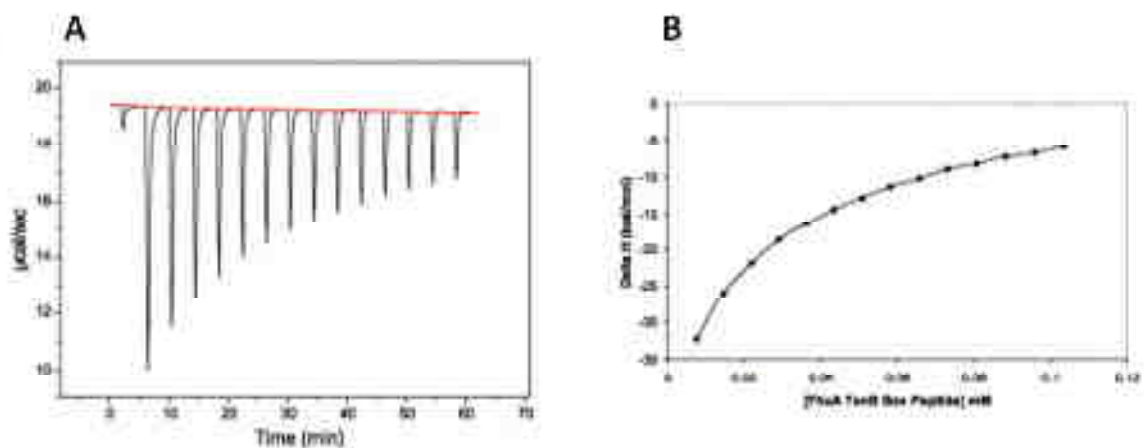
Nous souhaitons mettre au point un test nous permettant de mesurer les constantes d'affinité de nos molécules avec la protéine TonB. Idéalement, l'affinité de nos composés pour TonB devrait être meilleure que celle des transporteurs de membrane externe pour TonB. Afin de réaliser ces mesures, nous disposons d'un certain nombre d'outils. Nous sommes en effet en mesure de purifier la partie périplasmique de TonB (TonB<sub>pp</sub>), fusionnée à des étiquettes 6-histidines (6His-TonB<sub>pp</sub>) ou glutathion S-transférase (GST-TonB<sub>pp</sub>).<sup>231</sup> Le transporteur de membrane externe de la pyoverdine, FpvA, est purifié régulièrement au sein de notre équipe.<sup>379</sup> Des fragments peptidiques de la boîte TonB du transporteur FpvA pourront être utilisés dans un premier temps en tant que ligands de TonB pour mettre au point les tests. Enfin, nous avons à notre disposition plusieurs techniques permettant de réaliser ces mesures : la calorimétrie isotherme à titration, la polarisation de fluorescence et la résonance plasmonique de surface. Nous avons ainsi tenté de mettre au point des tests d'affinité reproductibles utilisant l'une de ces trois techniques. Une brève description des principes physiques exploités et les résultats obtenus pour chacune de ces approches seront décrits successivement.

## A. Calorimétrie isotherme à titration (ITC)

### 1. Principe

Lorsqu'un ligand se fixe sur un récepteur, la réaction s'accompagne d'une libération ou d'une absorption de chaleur selon le signe de l'enthalpie standard de la liaison. L'ITC permet de mesurer ces variations de chaleur. L'appareil est en effet capable de compenser la chaleur dégagée ou absorbée par la liaison du ligand à son récepteur, afin de maintenir constante la température de la cellule de mesure. Le tracé des variations de chaleur en fonction de la quantité de ligand ajouté donne des courbes de titration qui permettent de calculer la constante de dissociation du complexe.

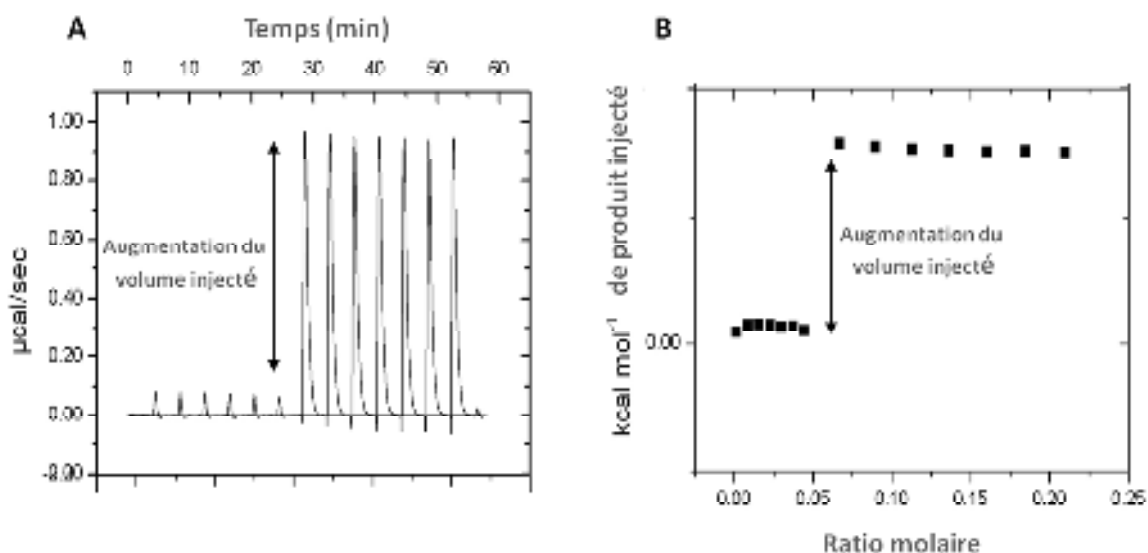
Cette technique a permis de caractériser l'interaction entre le transporteur de l'hème HasR et la protéine HasB, équivalent de TonB chez *S. marcescens*.<sup>380</sup> HasB et HasR s'associent avec une stœchiométrie 1:1 pour une constante de dissociation de 13 nM. Cette technique a également été utilisée pour mesurer la constante de dissociation entre la partie périplasmique de TonB et un décapeptide contenant la boîte TonB de FhuA ( $K_D = 36(\pm 7) \mu\text{M}$ ) (Figure 60).<sup>180</sup>



**Figure 60** : Étude calorimétrique de l'interaction TonB<sub>pp</sub>-boîte TonB de FhuA par ajout incrémentiel de 5 µL de peptide (800 µM, 50 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl) à la cellule contenant TonB (40 µM, 50 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl) à 30 °C. **A.** Données brutes. **B.** Courbe de titration.<sup>180</sup>

## 2. Résultats

Les mesures d'ITC réalisées pour évaluer l'affinité de TonB avec un peptide contenant la boîte TonB du transporteur FpvA (ADSSVDLGATMITSN) ont été effectuées sous la direction de Clarisse Maechling (Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie de Strasbourg). Le fragment de FpvA (100  $\mu$ M, Tp  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M) a ainsi été ajouté à une solution de 6His-TonB<sub>pp</sub> (1,0  $\mu$ M, Tp  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M) par injections de 10  $\mu$ L toutes les 4 min à 25 °C afin d'enregistrer une courbe de titration (Figure 61). Cependant, les signaux mesurés étant trop faibles, nous avons dû augmenter le volume d'injection à 30  $\mu$ L en cours d'expérience.



**Figure 61** : Étude calorimétrique de l'interaction 6His-TonB<sub>pp</sub>-boîte TonB de FpvA.  
**A.** Données brutes. **B.** Courbe de titration.

L'augmentation de la quantité de peptide injectée n'a pas suffi pour obtenir une courbe de titration convenable. En effet, les signaux mesurés étaient trop faibles pour pouvoir calculer une affinité. Afin de contourner ce problème, il aurait fallu augmenter massivement les quantités de protéines pour réaliser des mesures exploitables et reproductibles.<sup>180</sup> Or cette méthode, en se montrant très consommatrice en protéines, s'est rapidement révélée incompatible avec notre démarche.

## B. Polarisation de fluorescence

Cette technique n'a jamais été utilisée pour caractériser l'interaction TonB-TME ou TonB-boîte TonB. Elle offre pourtant la possibilité de développer un test d'activité *in vitro* automatisable et éventuellement applicable au criblage à haut débit. Les mesures ont été réalisées à la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative, sous la direction de Pascal Villa (UMS 3286).

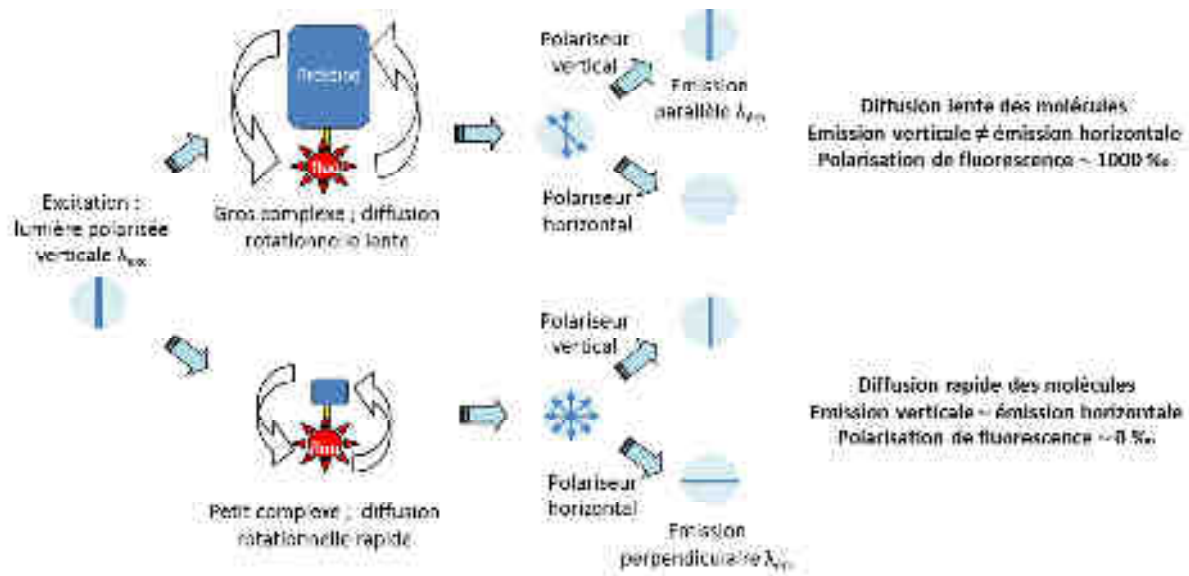
### 1. Principe

L'expérience consiste à exciter par une lumière polarisée un complexe protéique fluorescent. Ce complexe en solution est animé d'un mouvement de rotation intrinsèque (mouvement brownien) et va diffuser la lumière. La diffusion rotationnelle est d'autant plus grande que le volume moléculaire du complexe et la viscosité du milieu sont faibles et que la température est élevée. La lumière polarisée émise par le complexe est détectée en sortie de l'appareil, parallèlement et perpendiculairement à l'axe de polarisation du faisceau excitant. On peut mettre en évidence la différence d'intensité des émissions parallèle (S) et perpendiculaire (P) de fluorescence en calculant la polarisation de fluorescence (FP) selon l'expression (2) :

$$FP = \frac{S-P}{S+P} \quad (2)$$

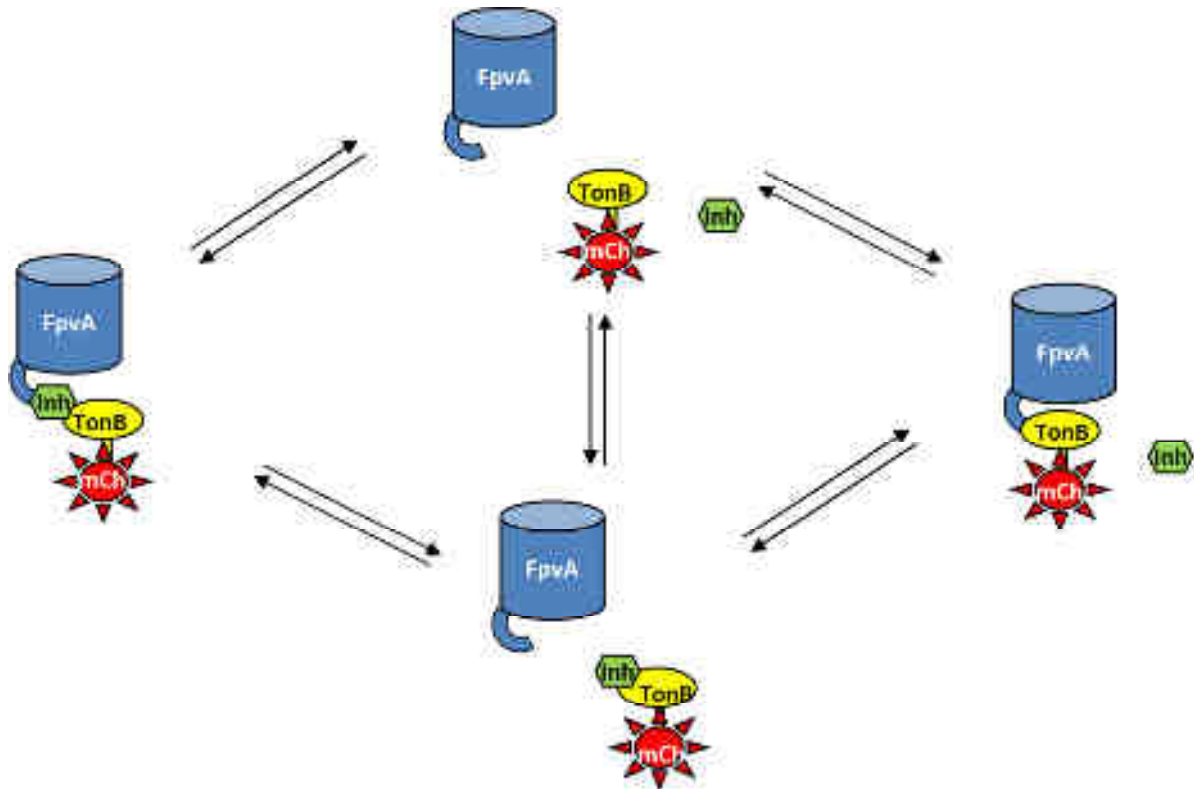
Cette valeur sans dimension dépend donc de la diffusion rotationnelle du complexe : plus la diffusion est importante, plus la polarisation diminue. Lorsque, le temps de l'expérience, la viscosité et la température sont constantes, FP est directement relié au volume moléculaire du complexe. Un petit ligand fluorescent lié à une protéine résulte en une entité fluorescente possédant un volume moléculaire plus important que le ligand seul, et donc en une FP plus importante (Figure 62). Pour des raisons pratiques, la polarisation de fluorescence sera exprimée en ‰, une valeur de 1000 ‰ signifiant que la lumière polarisée n'a pas été déviée, alors qu'une valeur de 0 ‰ signifie que la diffusion de la lumière polarisée a été maximale.





**Figure 62** : Principe de fonctionnement de la technique de polarisation de fluorescence. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont choisies en fonction de l'étiquette fluorescente (étoile rouge).

Dans notre cas, nous souhaitons évaluer la polarisation de fluorescence d'un complexe entre une protéine, le transporteur de membrane externe FpvA, et un ligand fluorescent, une protéine TonB fusionnée à une étiquette fluorescente (TonB\*). Nous souhaitons ensuite évaluer l'affinité de nos composés (non fluorescents) pour TonB\* en mesurant leur capacité à déplacer FpvA et à réduire le signal FP. En effet, l'ajout de nos molécules à TonB\* et FpvA devrait conduire à un équilibre entre les complexes TonB\*-FpvA, TonB\*-inhibiteur et/ou TonB\*-inhibiteur-FpvA s'il s'avère que nos composés stabilisent l'interaction TonB\*-FpvA. Dans le cas où nos composés auraient une meilleure affinité que FpvA pour TonB\*, l'équilibre devrait être déplacé en faveur du complexe TonB\*-inhibiteur. Ce complexe, plus petit que le complexe TonB\*-FpvA, devrait présenter une polarisation de fluorescence plus faible (Figure 63).

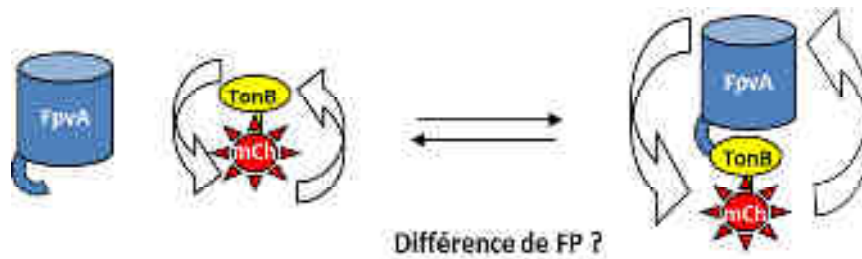


**Figure 63 :** Equilibres possibles entre TonB\* (TonB<sub>pp</sub> jaune, étiquette fluorescente en rouge), FpvA (en bleu) et l'inhibiteur (en vert).

Par conséquent, nous pourrions évaluer l'affinité de nos composés pour TonB\* en comparant la polarisation de fluorescence des complexes TonB\*-FpvA avec et sans inhibiteur.

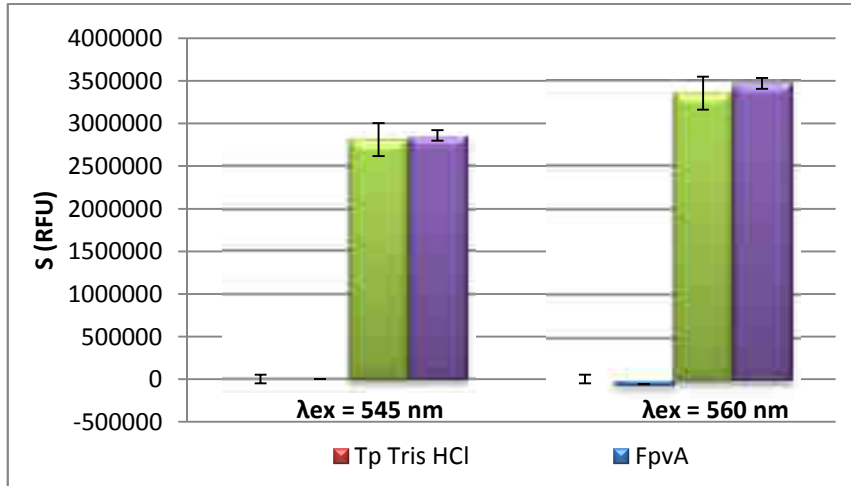
## 2. Résultats

Pour réaliser cette expérience, une fusion de la partie périplasmique de TonB de *P. aeruginosa* à une protéine fluorescente, la mCHERRY, a été construite, exprimée dans *E. coli* puis purifiée au sein de notre équipe. Nous avons voulu vérifier dans un premier temps que la polarisation de fluorescence du complexe mCHE-TonB<sub>pp</sub>-FpvA est bien différente de mCHE-TonB<sub>pp</sub> seul, c'est-à-dire voir si leur différence de volume hydrodynamique est suffisante pour avoir un effet sur la diffusion rotationnelle de la lumière, et donc sur sa polarisation (Figure 64).

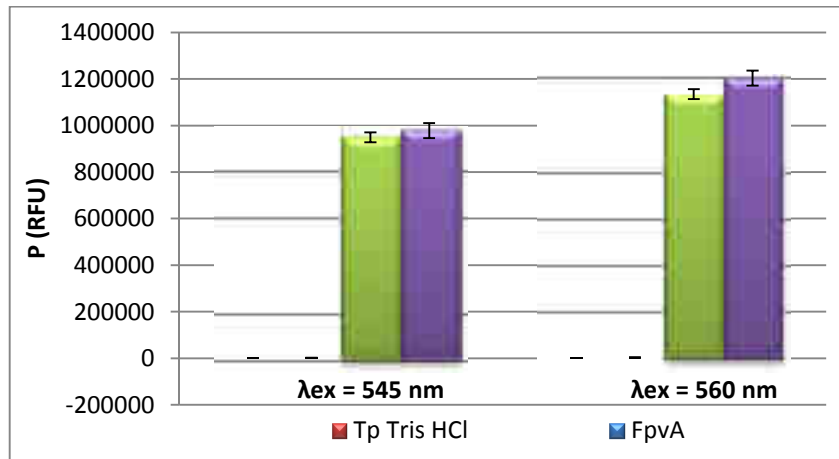


**Figure 64** : Equilibre entre TonB\* (TonB<sub>pp</sub> jaune, mCHERRY en rouge) et FpvA (en bleu).

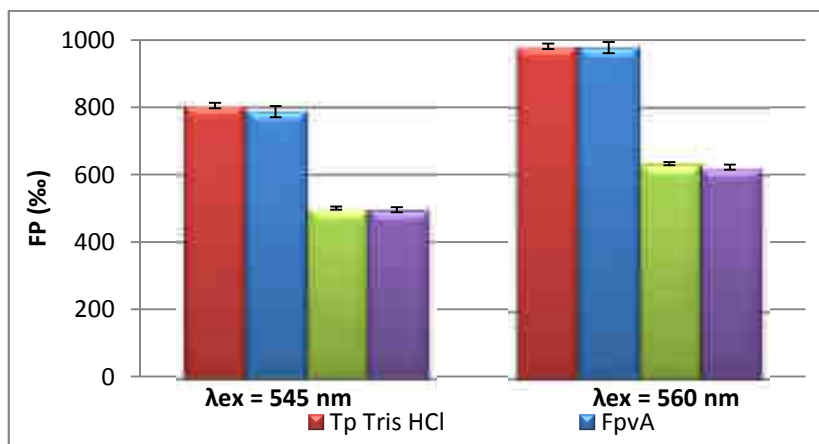
Les protéines mCHE-TonB<sub>pp</sub> (100 nM, 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,8 % OPOE), FpvA (1 μM, 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,8 % OPOE), le complexe protéique FpvA/mCHE-TonB<sub>pp</sub> et le tampon Tris sont placés dans une plaque 96 puits. La mCHERRY étant excitée à 587 nm et émettant à 610 nm, nous avons eu le choix entre deux filtres pour obtenir une lumière d'excitation monochromatique : le 545-610 nm ou le 560-610 nm (longueurs d'onde d'excitation/d'émission). Nous avons donc testé chacun de ces filtres pour déterminer lequel est le plus adapté à notre approche. L'expérience a été répétée deux fois pour chaque filtre afin d'évaluer les marges d'erreurs sur les mesures. Les résultats sont présentés sous la forme d'histogrammes présentant la moyenne des intensités de fluorescence parallèle (S) (Tableau 3) et perpendiculaire (P) (Tableau 4) à 610 nm normalisées par rapport au tampon, ainsi que le taux de polarisation (FP) qui en découle (Tableau 5). De manière générale, nous remarquons tout d'abord que les résultats obtenus sont similaires avec l'un ou l'autre filtre. Les intensités de fluorescence relevées étant tout de même un peu supérieures en excitant les protéines à 560 nm, c'est le filtre 560-610 que nous garderons pour les expériences suivantes. Nous remarquons ensuite que FpvA n'est pas fluorescent aux longueurs d'onde utilisées (Tableaux 3 et 4), ce qui se traduit par une polarisation de fluorescence maximale (Tableau 5). mCHE-TonB<sub>pp</sub>, quant-à-elle, émet bien de la fluorescence en émission parallèle (Tableau 3), mais aussi en émission perpendiculaire (Tableau 4). Cela indique une diffusion de la lumière par la protéine, et se traduit par une polarisation de fluorescence plus faible (Tableau 5). Toutefois, l'ajout de FpvA à mCHE-TonB<sub>pp</sub> ne modifie pas la polarisation de fluorescence, alors que celle-ci devrait augmenter. En effet, en se liant à mCHE-TonB<sub>pp</sub>, FpvA devrait ralentir le mouvement de rotation de mCHE-TonB<sub>pp</sub>, diminuer le phénomène de diffusion rotationnelle et donc augmenter la polarisation de fluorescence.



**Tableau 3 :** Variation de l'intensité de fluorescence parallèle à 610 nm en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

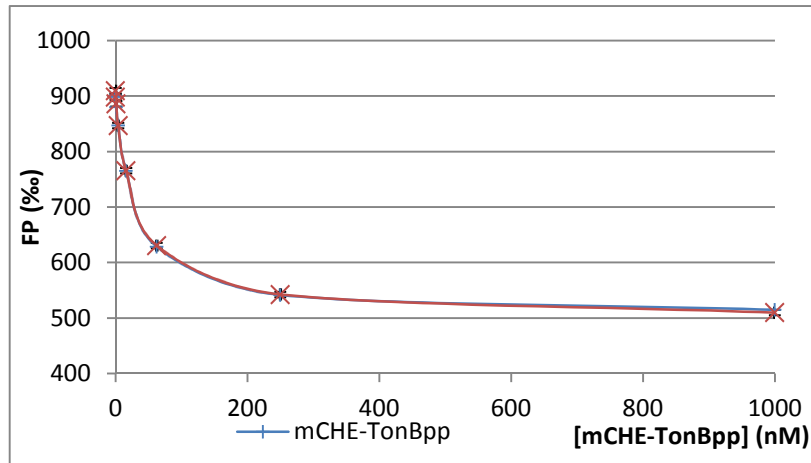


**Tableau 4 :** Variation de l'intensité de fluorescence perpendiculaire à 610 nm en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

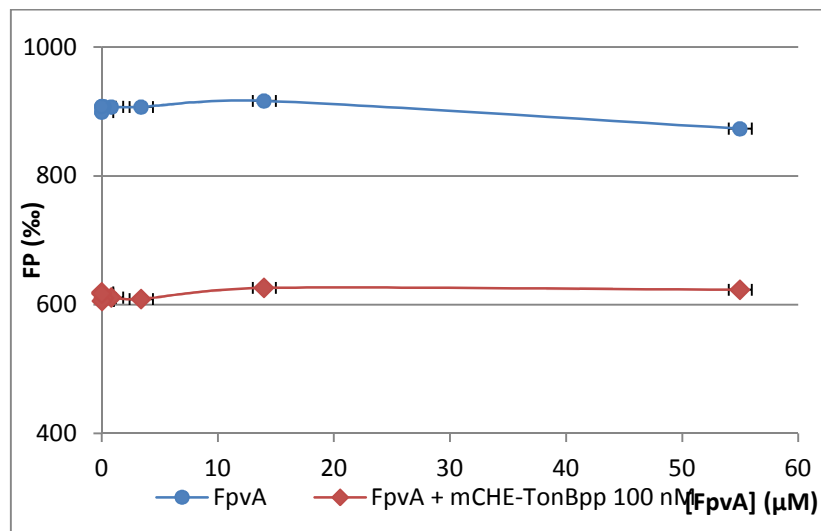


**Tableau 5 :** Variation de la polarisation de fluorescence à 610 nm en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

Nous avons voulu vérifier que l'absence d'effet de l'ajout de FpvA à mCHE-TonB<sub>pp</sub> sur la polarisation de fluorescence n'était pas liée à un mauvais rapport de concentration entre mCHE-TonB<sub>pp</sub> (100 nM) et FpvA (1 μM). Pour cela, nous avons réalisé une double gamme de concentrations qui consiste à faire varier la concentration de mCHE-TonB<sub>pp</sub> (1 ; 4 ; 16 ; 62,5 ; 250 ; 1000 nM) pour une concentration fixe de FpvA (1 μM, 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,8 % OPOE), puis à faire varier la concentration de FpvA (0,05 ; 0,2 ; 0,85 ; 3,4 ; 14 ; 55 μM) pour une concentration fixe de mCHE-TonB<sub>pp</sub> (100 nM, 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,8 % OPOE). Les résultats sont représentés sous la forme de courbes décrivant la variation de la polarisation de fluorescence en fonction de la concentration de mCHE-TonB<sub>pp</sub>, en présence ou non du transporteur FpvA (Figure 65), ou en fonction de la concentration de FpvA, en présence ou non de mCHE-TonB<sub>pp</sub> (Figure 66). Dans le premier cas, en absence de FpvA, nous remarquons que plus la concentration de mCHE-TonB<sub>pp</sub> augmente, plus la polarisation de fluorescence diminue, jusqu'à atteindre un plateau pour une concentration d'environ 200 nM (Figure 65, courbe bleue). Nous constatons également que l'addition de FpvA à une concentration largement supérieure à mCHE-TonB<sub>pp</sub> ne modifie en rien l'allure de la courbe (Figure 65, courbe rouge), alors que nous nous attendions à une augmentation générale de la polarisation de fluorescence. D'autre part, en absence de mCHE-TonB<sub>pp</sub>, la polarisation de fluorescence reste maximale lorsque la concentration de FpvA augmente (Figure 66, courbe bleue). FP reste également stable lorsque l'expérience est réitérée en présence de mCHE-TonB<sub>pp</sub> (Figure 66, courbe rouge). Par conséquent, l'addition de quantités croissantes de FpvA sur une quantité fixe de mCHE-TonB<sub>pp</sub> ne permet pas de visualiser une courbe de titration permettant d'évaluer l'affinité de FpvA pour TonB.



**Figure 65** : Variation de la polarisation de fluorescence en fonction de la concentration de mCHE-TonB<sub>pp</sub>, en présence ou non du transporteur FpvA.



**Figure 66** : Variation de la polarisation de fluorescence en fonction de la concentration de FpvA, en présence ou non de la protéine mCHE-TonB<sub>pp</sub>.

Nous n'avons donc pas réussi à observer une différence de polarisation de fluorescence entre mCHE-TonB<sub>pp</sub> seul et en présence de FpvA, indépendamment du rapport de concentration entre ces deux espèces. Deux raisons pourraient expliquer ce phénomène : soit l'étiquette mCHERRY empêche l'interaction entre TonB et FpvA, soit la différence de volume hydrodynamique entre mCHE-TonB<sub>pp</sub> et le complexe mCHE-TonB<sub>pp</sub> /FpvA n'est pas suffisamment significative pour voir un effet sur la polarisation de fluorescence. Dans tous les cas, cette méthode ne semble pas, en l'état, adaptée à la mesure de l'affinité de nos inhibiteurs pour TonB. Nous nous sommes donc tournés vers une troisième technique, la résonance plasmonique de surface.

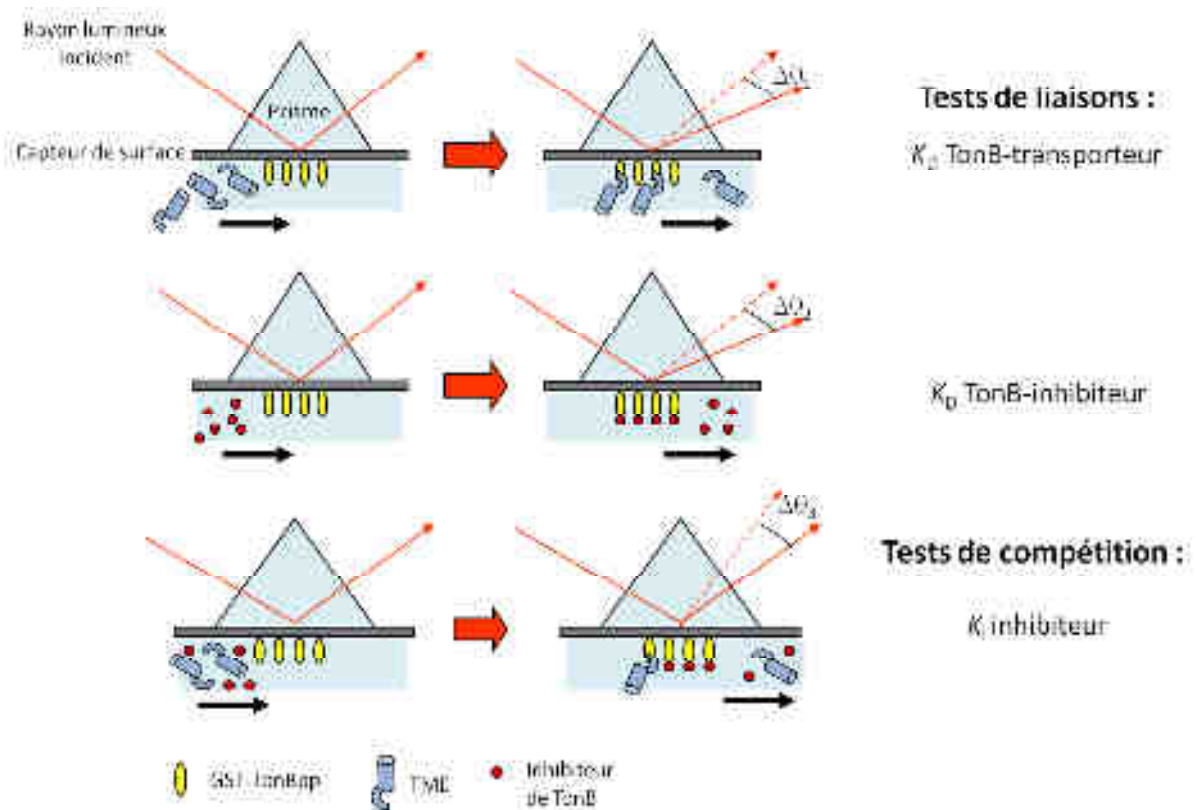
## C. Résonance plasmonique de surface (SPR)

### 1. Principe

Les biocapteurs BIACORE<sup>®</sup> utilisent le phénomène optique de résonance plasmonique de surface pour détecter l'interaction directe et en temps réel d'un "analyte" sur un "ligand". Le ligand est immobilisé à la surface d'une fine couche métallique (or ou argent) qui recouvre un prisme.<sup>381</sup> Un faisceau de lumière est utilisé pour exciter les plasmons de la surface métallique. Ces plasmons ne peuvent être excités que sous certains angles, c'est-à-dire lorsque le vecteur d'onde à la surface coïncide avec celui des plasmons de surface. Pour cet angle bien déterminé, caractéristique du métal, l'onde réfléchie est absorbée par l'excitation des plasmons de surface : l'onde réfléchie disparaît. Cet angle dépend de l'indice de réfraction de la surface. Le changement de composition de la surface change cet indice, ce qui conduit à un changement de l'angle de résonance ( $\Delta\theta$ ). Cet angle est donc proportionnel à la concentration de macromolécules à la surface. La liaison des analytes au ligand immobilisé est visualisée par un changement de signal (réponse exprimée en '*resonance units*' RU) et enregistrée en fonction du temps sous forme de sensorgramme. 1 RU correspond à la liaison 1 pg/mm<sup>2</sup> d'analyte. Les sensorgrammes réalisés pour plusieurs concentrations d'analyte permettent de déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation, et d'en déduire la valeur de la constante d'affinité de l'analyte pour le ligand.

Cette technique a déjà été utilisée pour caractériser l'interaction entre la partie périplasmique de TonB fusionnée à une étiquette GST et le transporteur FpvA.<sup>231</sup> Leur constante de dissociation a été évaluée à 2,9( $\pm$ 0,8)  $\mu$ M par cette méthode. Nous souhaitons, dans un premier temps, reproduire cette expérience afin d'évaluer la qualité des protéines et apprendre à maîtriser cet équipement très sophistiqué. La protéine GST-TonB<sub>pp</sub> a été immobilisée sur le capteur de surface, alors que FpvA était injectée sur la surface afin de réaliser une étude cinétique de l'interaction. Nous souhaitons ensuite mesurer les constantes d'affinité de deux fragments de la boîte TonB de FpvA. Le fragment ADSSVDLGATMITSN est appelé Pep1, et le fragment GATMITS, plus court, est appelé Pep2.

Enfin, nous voulions observer la compétition entre FpvA et les peptides pour se lier à TonB, afin d'évaluer la constante d'inhibition des peptides (Figure 67).



**Figure 67 :** Principe de détermination des constantes d'affinité et d'inhibition des transporteurs de membrane externe et des inhibiteurs potentiels.

L'ensemble de cette étude a été réalisée sous la direction de Gabrielle Zeder-Lutz, au sein de l'équipe Biocapteurs de notre institut.

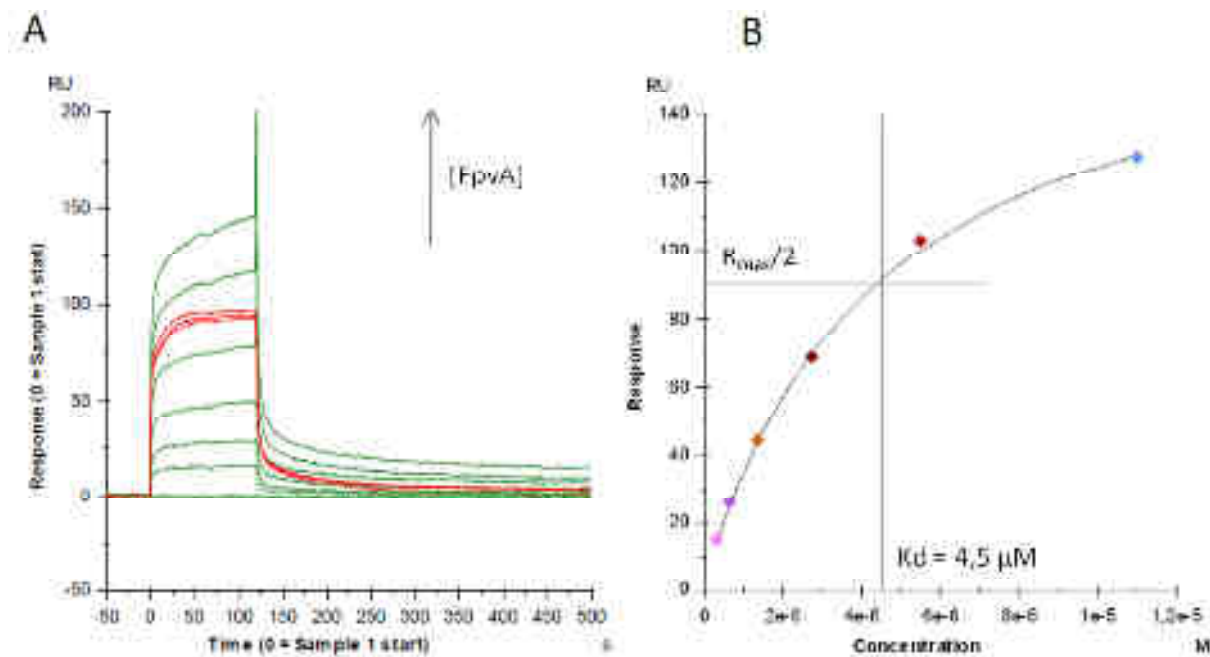
## 2. Résultats

### a) Mesure de la constante d'affinité de FpvA

Pour la détermination des constantes d'équilibre de la formation du complexe GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA, 300 à 465 RU de GST-TonB<sub>pp</sub> (100 nM, 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,8 % OPOE) sont captés par des anticorps anti-GST liés au capteur de surface de manière covalente. La capture est très stable et reproductible (coefficient de variation ~ 5 %, résultats non montrés). Le transporteur FpvA a ensuite été injecté à des concentrations allant de 0,34 à 11 μM (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,8 % OPOE). Les sensorgrammes obtenus montrent des cinétiques d'association et de dissociation rapides (Figure 68.A). Le



plateau atteint à l'équilibre est dépendant de la concentration de FpvA. La constante de dissociation à l'équilibre a été déterminée en traçant la quantité de FpvA liée à TonB à l'équilibre en fonction de la concentration de FpvA (Figure 68.B). La constante de dissociation du complexe GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA a été évaluée à environ 4,5  $\mu$ M, selon un modèle d'interaction 1:1. L'interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA s'avère donc être spécifique et peu stable, comme décrit précédemment.<sup>231</sup>



**Figure 68** : A. Profils de liaison entre GST-TonB<sub>pp</sub> (100 nM) immobilisée (464 RU) et le transporteur FpvA (0,34 ; 0,69 ; 1,37 ; 2,75 ; 5,5 ; 11  $\mu$ M). Triplet à 2,75  $\mu$ M en rouge.

B. Evaluation du  $K_D$  pour un modèle d'interaction 1:1.  $R_{max} = 176$  RU et  $K_D = 4,5$   $\mu$ M.

Nous avons ensuite utilisé les conditions opératoires mises au point avec FpvA pour tester les fragments peptidiques contenant la boîte TonB de FpvA.

#### b) Mesure de la constante d'affinité des fragments de FpvA

Pep1 a été injecté sur GST-TonB<sub>pp</sub> (380 RU) à des concentrations de 0,3 ; 0,7 ; 1,5 ; 3,0 ; 6,0 ; 12 ; 25 ; 50 et 100  $\mu$ M (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,8 % OPOE), pour donner des réponses allant de 2 à plus de 70 RU. Or la réponse étant proportionnelle à la masse des molécules, la relation entre la réponse SPR maximale attendue à saturation ( $R_{max}$ ) et le niveau de ligand immobilisé ( $R_L$ ) est définie selon la

relation (3), avec  $M_L$  et  $M_A$  les masses moléculaires du ligand (45 kDa) et de l'analyte (1,5 kDa) respectivement.

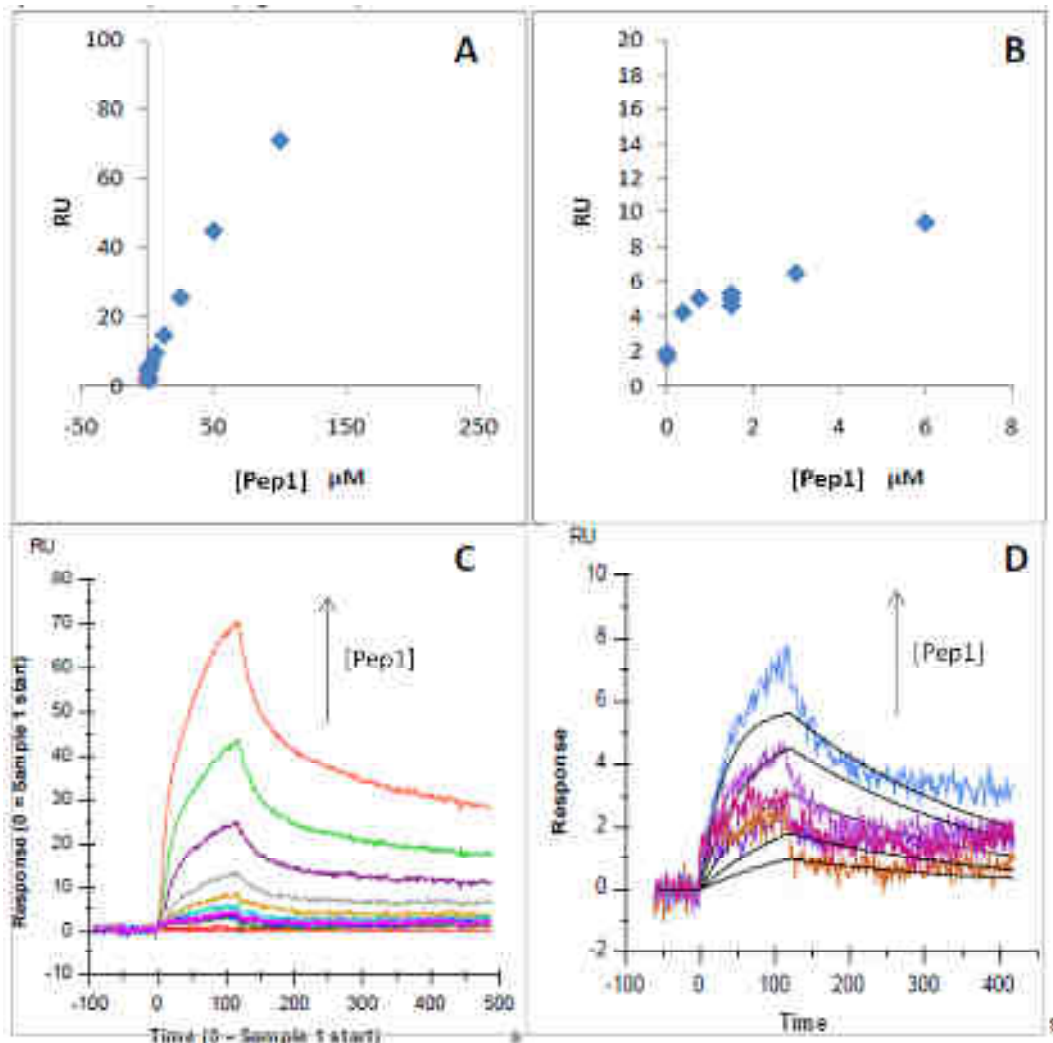
$$\frac{R_L}{R_{max}} = \frac{M_L}{M_A} \quad (3)$$

Le  $R_{max}$  attendu est donc de :

$$R_{max} = \frac{R_L \times M_A}{M_L}$$

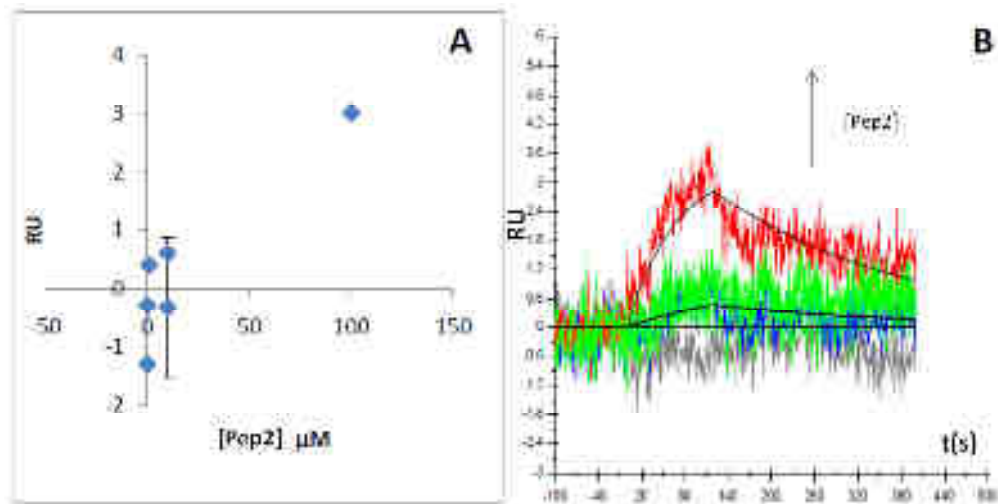
$$R_{max} = \frac{380 \times 1,5}{45} = 13 \text{ RU}$$

Par conséquent, la liaison à TonB est soit surstœchiométrique, soit non spécifique (plus de 5 Pep1/GST-TonB<sub>pp</sub>) pour des concentrations supérieures à 10  $\mu\text{M}$  (Figure 69.A). Néanmoins pour des concentrations de peptide inférieures à 10  $\mu\text{M}$ , le signal est compatible avec une liaison 1:1 (Figure 69.B). Les profils de liaison indiquent une interaction complexe, qui dévie d'un modèle d'interaction simple 1:1 pour les concentrations les plus fortes (Figure 69.C). L'ajustement de ce modèle aux profils obtenus pour les concentrations  $\leq 6 \mu\text{M}$  est cependant de qualité moyenne (Figure 69.D).



**Figure 69 :** Liaison du peptide Pep1 à la protéine GST-TonB<sub>pp</sub>. **A.** Représentation de la réponse SPR en fonction de la concentration de Pep1 (de 0,3 à 100 μM). Immobilisation de  $380 \pm 20$  RU de GST-TonB<sub>pp</sub>. Un signal maximal théorique de 13 RU est attendu pour une interaction 1:1. Les points reportés correspondent aux signaux maximaux à  $t = 110$  s. **B.** Représentation de la réponse SPR en fonction de la concentration de Pep1 (de 0,3 à 6,0 μM). **C.** Profils de liaison pour des concentrations de peptide Pep1 de 0,3 à 100 μM. **D.** Profils de liaison pour des concentrations de Pep1 < 10 μM. Les courbes en noir indiquent les courbes théoriques ajustées aux données pour un modèle Langmuir 1:1.

Le même type d'expérience a été réalisé avec le peptide Pep2, qui possède une masse moléculaire (700 Da). Ce peptide a été testé à des concentrations de 1, 10 et 100 μM. Les profils de liaison montrent une liaison spécifique de Pep2 compatible avec une interaction 1:1 et d'affinité de l'ordre de plusieurs micromolaires. Le signal est clair même s'il est à la limite du seuil de détection (Figure 70).



**Figure 70** : Liaison du peptide Pep2 à la protéine GST-TonBpp. **A.** Représentation de la réponse SPR en fonction de la concentration de Pep2 (de 1 à 100  $\mu\text{M}$ ). Environ  $547 \pm 60$  RU de GST-TonB<sub>pp</sub> sont immobilisés. Un signal maximal théorique de 9 RU est attendu pour une interaction 1:1. Les points reportés correspondent aux signaux maximaux à  $t = 110$  s. **B.** Profils de liaison correspondants. Les courbes en noir indiquent les courbes théoriques ajustées aux données pour un modèle Langmuir 1:1.

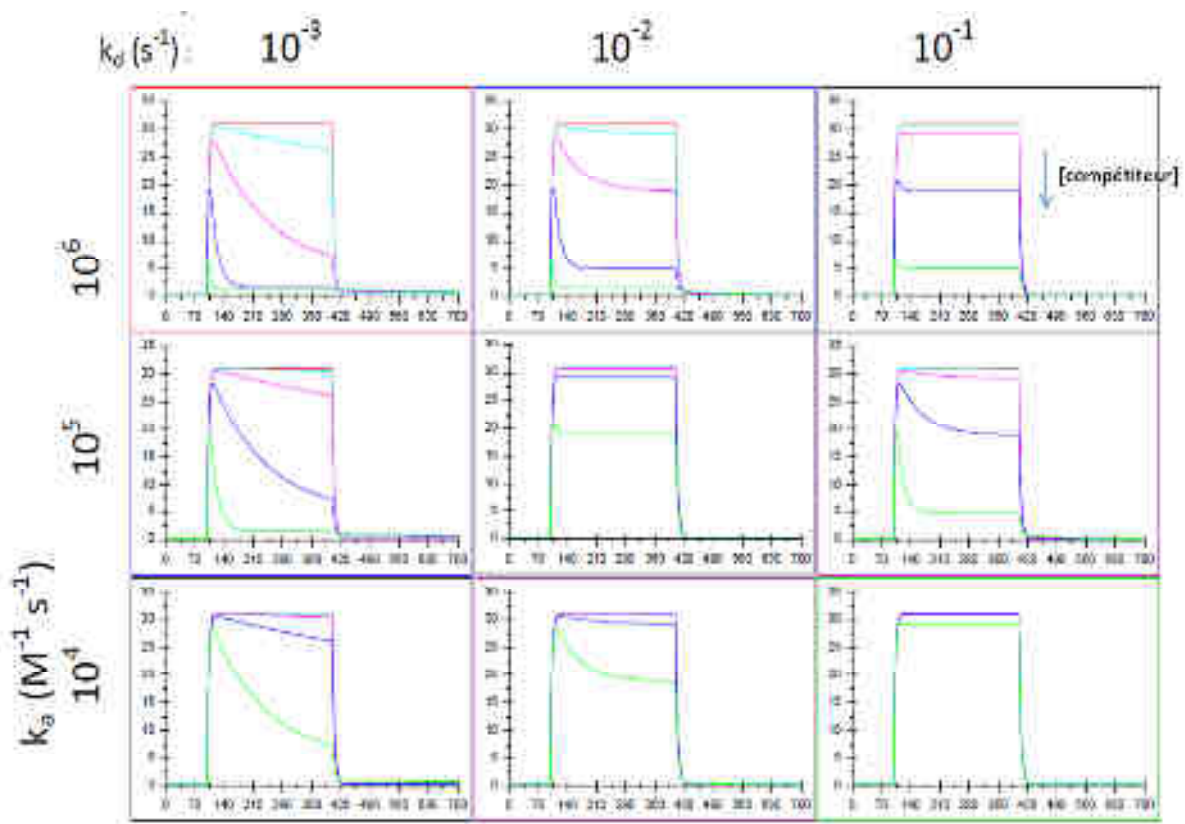
Nous avons pu voir au cours de ces expériences que la liaison GST-TonB<sub>pp</sub>/Pep1 est surstœchiométrique à des concentrations supérieures à 10  $\mu\text{M}$ . Il est possible que le peptide puisse interagir avec d'autres zones de GST-TonB<sub>pp</sub>. Le peptide le plus court, ne contenant que la boîte TonB de FpvA, ne s'est pas lié à TonB de manière surstœchiométrique. Les profils de liaison ont montré qu'une interaction 1:1 était compatible. Cependant, ce petit peptide nous amène à travailler à la limite de détection de l'appareil, et il est difficile d'évaluer précisément une constante d'affinité dans ces conditions.

Ces tests de liaisons montrent ainsi que les deux peptides Pep1 et Pep2 ont des constantes d'affinité pour GST-TonB<sub>pp</sub> de l'ordre du micromolaire. Ces constantes sont donc du même ordre de grandeur que celle du transporteur FpvA entier.

### c) Mesure de la constante d'inhibition des fragments de FpvA

Afin de préparer le test de compétition de liaison à GST-TonB<sub>pp</sub> entre FpvA et les inhibiteurs (Pep1 et Pep2 à ce jour), nous avons réalisé une simulation permettant de prédire l'allure des profils de liaisons en fonction de l'affinité de nos composés. Ainsi la figure 71 décrit les profils de liaison attendus lorsque FpvA ( $M = 90$  kDa ;  $C = 3$   $\mu\text{M}$  ( $\sim 0,5 K_D$ ) ;  $k_a = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ;  $k_d = 2 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  ;  $K_D = k_d / k_a = 6,7$   $\mu\text{M}$ ) est mélangée avec des concentrations croissantes de compétiteur ( $M = 0,9$  kDa ;  $C = 0$  ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000 nM ;

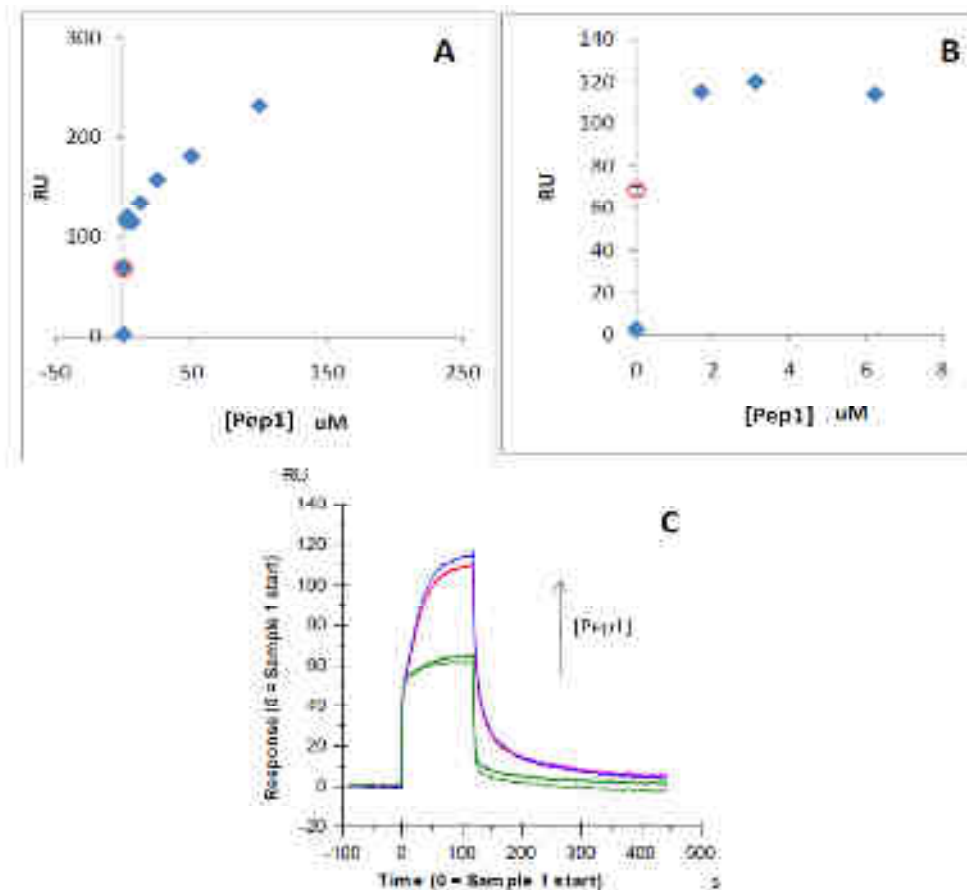
les paramètres cinétiques  $k_a$  et  $k_d$  varient :  $k_a$  de  $10^6$  à  $10^4$   $M^{-1}.s^{-1}$  et  $k_d$  de  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$   $s^{-1}$  ; temps de contact de 300 s). Le signal FpvA attendu sans compétiteur est d'environ 30 RU quand une surface GST-TonB<sub>pp</sub> de 100 RU est immobilisée. À la concentration de 1000 nM de compétiteur (en vert), une diminution du signal est observée, quelques soient les caractéristiques cinétiques de l'interaction TonB-compétiteur, et pour des affinités comprises entre 1 nM et 10  $\mu$ M. Cette diminution de signal est faible pour l'affinité la moins bonne (10  $\mu$ M, en bas à droite) mais pourrait être accentuée en augmentant la concentration de compétiteur à 100  $\mu$ M.



**Figure 71** : Simulation des profils de liaison de FpvA/GST-TonB<sub>pp</sub> en présence de concentrations croissantes de compétiteur (C = 0 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000 nM). Les paramètres cinétiques de l'interaction TonB-compétiteur :  $k_a$  et  $k_d$  varient de  $10^6$ ,  $10^5$  et  $10^4$   $M^{-1}.s^{-1}$  et de  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$   $s^{-1}$  respectivement, comme indiqué dans le tableau. La masse moléculaire du compétiteur utilisé pour la simulation est de 900 Da, et le temps de contact de 300 s.

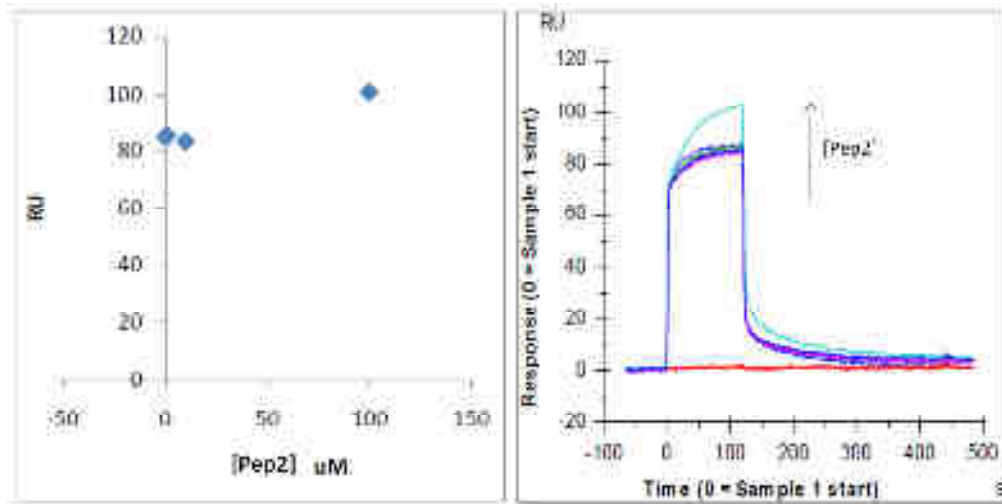
Les simulations indiquent qu'une inhibition de l'interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA par de petits composés d'affinité inférieure à 100  $\mu\text{M}$  devrait être détectable, s'ils sont testés à une concentration supérieure ou égale à 1  $\mu\text{M}$ . Ainsi, seuls ceux qui se lient au site de liaison de FpvA seront identifiés. Nous avons ensuite utilisé les conclusions de cette simulation pour tester les capacités d'inhibition de l'interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA des deux peptides Pep1 et Pep2.

Un mélange de FpvA ( $C = 2,75 \mu\text{M}$ ,  $\sim 0,5 K_D$ ) et de Pep1 ( $C = 1,5 ; 3 ; 6 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 \mu\text{M}$ ) est injecté sur 345 RU de GST-TonB<sub>pp</sub> immobilisé. Alors que le  $R_{\text{max}}$  théorique pour une interaction 1 FpvA : 1 TonB est d'environ 700 RU, un signal de  $70 \pm 2$  RU est obtenu pour le transporteur seul (Figure 72). De manière étonnante, l'ajout de Pep1 n'entraîne pas une diminution du signal mais une augmentation. La liaison directe, surstœchiométrique du peptide Pep1 sur TonB, a été montrée précédemment pour des concentrations supérieures ou égales à 10  $\mu\text{M}$ . Elle explique une partie de l'augmentation du signal observé par rapport au signal dû à FpvA seul, mais pas la totalité de l'augmentation (Figure 72.A). À plus faibles concentrations ( $< 10 \mu\text{M}$ ), nous avons vu que la liaison directe de Pep1 à TonB est de type 1:1. Cette fixation ne bloque pas la liaison de FpvA (Figure 72.B). En effet, un signal de 120 RU pour le mélange FpvA-Pep1 est obtenu à ces concentrations, la contribution au signal de la liaison directe du peptide sur TonB étant inférieure à 10 RU (Figure 72.C). Une explication possible serait que, très étrangement, le transporteur FpvA aurait une meilleure affinité pour le complexe TonB-peptide que pour TonB seul.



**Figure 72 :** Compétition par le peptide Pep1 de l'interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA. **A.** Représentation de la réponse SPR en fonction de l'ajout de quantités croissantes de Pep1 (de 0 à 100  $\mu\text{M}$ ). Environ 345 RU de GST-TonB<sub>pp</sub> sont immobilisés. Le  $R_{\text{max}}$  théorique pour une interaction 1 FpvA : 1 TonB est d'environ 700 RU, un signal de  $70 \pm 2$  RU est obtenu pour le transporteur seul ( $C = 2,75 \mu\text{M}$ , cercle rouge). **B.** Représentation de la réponse SPR en fonction de l'ajout de quantités croissantes de Pep1 (de 0 à 6  $\mu\text{M}$ ). **C.** Profils de liaison correspondants du mélange FpvA-peptide pour  $[\text{Pep1}] < 6 \mu\text{M}$ . Le profil pour le récepteur seul (2,75  $\mu\text{M}$ ) est en vert.

Le même type d'expérience a été réalisé avec Pep2. Ce peptide a été testé à des concentrations de 1, 10 et 100  $\mu\text{M}$ , et a été co-injecté avec FpvA ( $C = 2,75 \mu\text{M}$ ) sur 478 RU de GST-TonB<sub>pp</sub>. Aucune inhibition de l'interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA par le peptide Pep2 n'a été détectée à 1 et 10  $\mu\text{M}$ , et comme avec Pep1, une légère augmentation du signal est observée pour 100  $\mu\text{M}$  de peptide (Figure 73).



**Figure 73 :** Compétition par le peptide Pep2 de l'interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA. **A.** Représentation de la réponse SPR en fonction de l'ajout de quantités croissantes de Pep2 (1, 10, 100 μM). Environ  $478 \pm 16$  RU de TonB sont immobilisés, un signal maximal théorique de 960 RU est attendu pour une interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA de type 1:1. Un signal de  $85 \pm 1$  RU est obtenu pour le transporteur seul (2,75 μM, triplicat). Le point reporté correspond au signal à  $t = 110$  s. **B.** Profils de liaison correspondants, le signal le plus élevé est obtenu en présence de 100 μM de peptide Pep2 (courbe turquoise).

L'ensemble de ces expériences montrent que la SPR apparaît comme la méthode la plus adaptée pour mesurer l'affinité de nos inhibiteurs potentiels pour TonB. En effet, une interaction spécifique d'affinité de l'ordre de quelques micromolaires entre le transporteur de membrane externe FpvA et la protéine GST-TonB<sub>pp</sub> a pu être mesurée, ce qui est cohérent avec les résultats publiés antérieurement par notre équipe.<sup>231</sup> La liaison directe entre les peptides correspondants à la boîte TonB du transporteur FpvA (Pep1 et Pep2) et GST-TonB<sub>pp</sub> a également été mise en évidence. Pour le peptide Pep1, la liaison est surstoéchiométrique, même à faibles concentrations. Une modulation de l'affinité du site de liaison du transporteur FpvA est observée en présence de ce peptide, qui semble augmenter la stabilité du complexe GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA. La liaison de Pep2 est, quant-à elle, compatible avec une interaction de type 1:1 aux concentrations testées (1 à 100 μM), et d'affinité de l'ordre du micromolaire. La liaison à GST-TonB<sub>pp</sub> de ce peptide n'est pas compétitive avec celle du transporteur entier. Ce résultat montre toutefois qu'il devrait être possible de détecter la liaison directe à TonB de composés de faible masse moléculaire. Enfin, une étude par simulations indique qu'une inhibition de l'interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA par de petits composés d'affinité inférieure ou égale à 100 μM devrait être détectable s'ils sont testés à une concentration supérieure à 1 μM. Seuls ceux qui se lient au site de liaison de FpvA



seront identifiés grâce à cette méthode. Nous devons confirmer avec nos composés synthétiques si l'ajout d'un agent compétiteur empêche la formation du complexe GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA, ou si, au contraire, il la favorise, comme cela semble être le cas avec Pep1. Une stabilisation de l'interaction protéine-protéine ne compromettrait en rien notre approche. Dans ce cas, la protéine TonB ne serait pas séquestrée dans le périplasme par nos molécules, mais par les TME grâce à la présence de nos molécules. Si cette interaction de type ternaire s'avère être suffisamment stable, la protéine TonB ne serait plus capable d'énergiser d'autres transporteurs et les systèmes d'acquisition du fer s'en trouveraient profondément perturbés.

### III. Tests d'activité *in cellulo* : perspectives

Une fois que nous aurons identifié les ligands de TonB par SPR, nous pourrions évaluer leur activité antimicrobienne sur des cultures de *P. aeruginosa*. Nous procéderons en deux étapes. La première consistera à évaluer les CMI de nos composés sur des souches de *P. aeruginosa* en milieu carencé en fer. Cela permettra de déterminer leur activité antimicrobienne dans des conditions proches de celles rencontrées par les bactéries lors de l'infection d'un hôte.

Les molécules qui présentent une CMI intéressante seront soumises à un second test afin de vérifier que leur activité antimicrobienne est bien liée à une inhibition des processus de transport TonB-dépendants. Pour cela, nous testerons nos molécules dans des expériences de transport du fer(III) radioactif. Les composés capables d'inhiber à la fois la croissance bactérienne et le transport actif du fer constitueront les composés tête de série d'une nouvelle classe d'antibiotiques spécifiques des bactéries à Gram négatif, les inhibiteurs de la protéine TonB.

Cependant, une absence de CMI lors du premier test ne signifiera pas nécessairement que la molécule est inactive sur TonB. En effet, ces molécules, identifiées par SPR comme étant des ligands de TonB, pourraient rester bloquées dans le milieu extracellulaire lors du test *in cellulo*. Dans ce cas, nous pourrions contourner la faible perméabilité de *P. aeruginosa* en vectorisant nos molécules par l'un des sidérophores de notre microorganisme modèle, la pyochéline. De nombreux travaux ont d'ores et déjà été réalisés au sein de notre équipe afin

d'exploiter cette stratégie dite du "cheval de Troie" dans le cadre de la recherche de nouvelles antibiothérapies contre *Pseudomonas aeruginosa*.



**Vectorisation  
d'antibiotiques par la  
pyochéline**

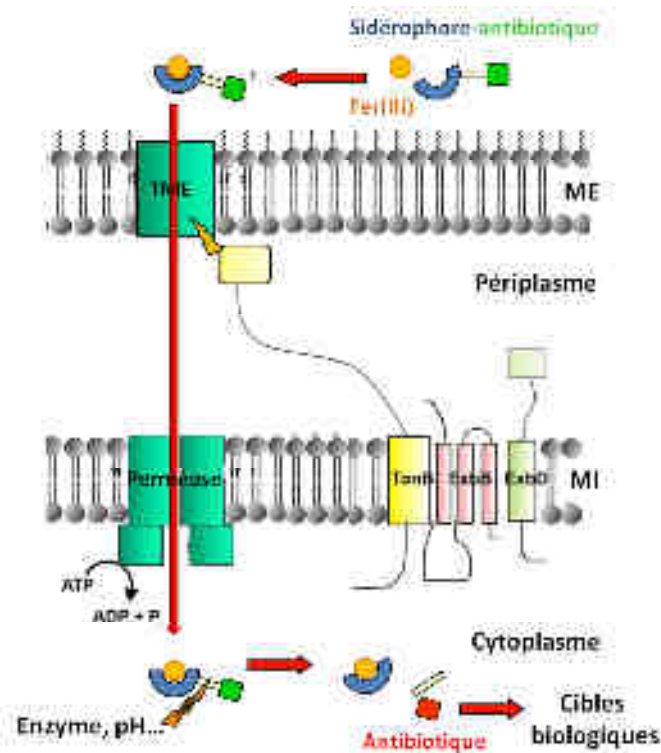


# I. Vectorisation d'antibiotique par les sidérophores

## A. Principe général

Les systèmes de transport du fer sont autant de portes au travers de l'enveloppe bactérienne pour des molécules spécifiquement reconnues par ces systèmes complexes et hautement régulés. La conjugaison d'un antibiotique avec un sidérophore peut donc être un moyen d'introduire une molécule bactéricide dans la bactérie en utilisant les voies de transport du fer sidérophores-dépendantes.<sup>382, 383</sup>

Ces "chevaux de Troie" sont donc constitués d'un sidérophore jouant le rôle de motif de spécificité et d'un antibiotique, les deux entités chimiques étant reliées par un bras espaceur. Celui-ci doit, en général, être clivé à l'intérieur de la cellule bactérienne pour libérer l'antibiotique.<sup>73</sup> Ce dernier peut alors atteindre sa cible biologique (Figure 74).



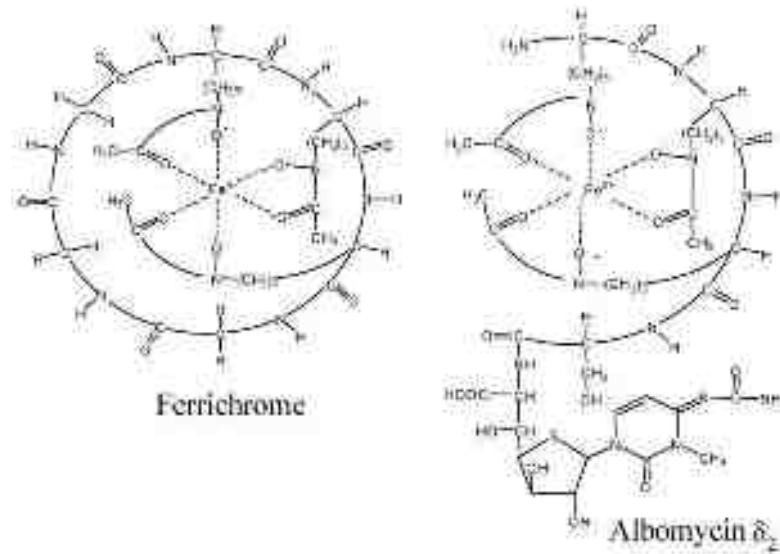
**Figure 74 :** Schéma général illustrant la stratégie du cheval de Troie. Les conjugués sidérophore-antibiotiques sont reconnus par les TME puis entrent dans la cellule bactérienne par la voie de transport du fer sidérophore-dépendante. Dans la cellule, le bras espaceur est hydrolysé. L'antibiotique alors libéré peut alors atteindre sa cible. Adapté de Krewulak *et al.*<sup>113</sup>

Cette stratégie particulièrement élégante est inspirée des sidéromycines, des conjugués naturels entre un sidérophore et un antibiotique.

## B. Les sidéromycines

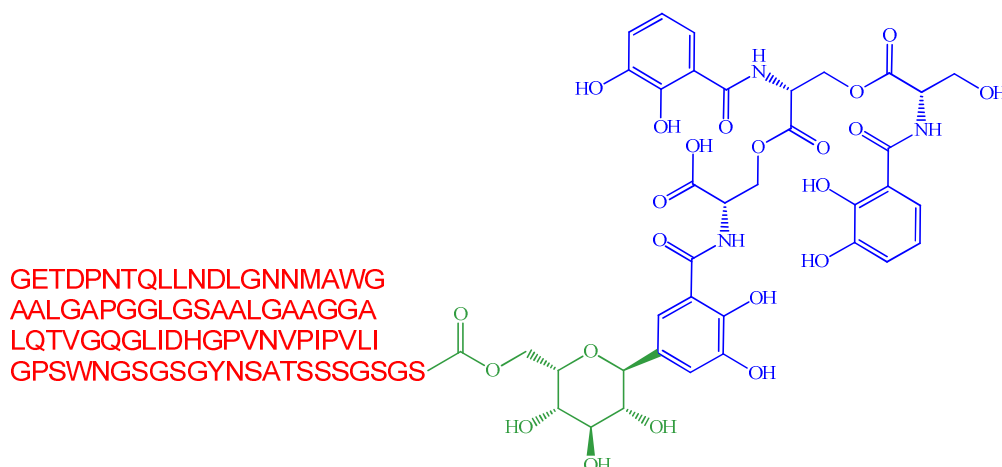
Les sidéromycines ont été découvertes en même temps que les sidérophores de type hydroxamates : la première sidéromycine, appelée ferrymicine, a été isolée de *Streptomyces griseoflavus* en 1960.<sup>131, 384</sup> Ce sont des molécules naturelles produites par les bactéries et qui sont constituées d'un antibiotique lié de manière covalente à un sidérophore. Les sidéromycines permettent aux bactéries sécrétrices d'éradiquer les bactéries concurrentes lors de la colonisation de leur environnement. Elles se divisent en plusieurs catégories selon la nature du sidérophore et celle de l'antibiotique. On peut citer en exemple les albomycines, les ferrimycines, les danomycines, les salmycines ou les microcines.<sup>385</sup>

L'albomycine, produite par les streptomycètes, est l'une des sidéromycines qui a été le plus étudiée. Elle possède une activité antibiotique à large spectre caractérisée par une CMI de 5 ng/mL sur un grand nombre de bactéries à Gram négatif.<sup>131, 386</sup> Elle est composée d'un antibiotique de type thioribosyl-pyrimidine lié à un peptide structuralement proche du ferrichrome (Figure 75). Ce conjugué est donc reconnu par le transporteur FhuA du ferrichrome et transporté à travers la membrane externe de la bactérie *via* la voie de transport ferrichrome-dépendante.<sup>387-389</sup> Une fois à l'intérieur de la cellule bactérienne, l'albomycine est hydrolysée par une peptidase endogène : le groupe thioribosyl-pyrimidine est alors séparé du sidérophore, ce qui lui permet d'inhiber la séryl-ARNt synthétase bactérienne et de révéler son activité antibiotique.<sup>382, 390</sup>



**Figure 75** : Structures du ferrichrome et de l'albomycine. Adaptée de Braun *et al.*<sup>382</sup>

Il semble que la taille de l'antibiotique lié au sidérophore importe peu et que les sidéromycines soient capables de vectoriser des antibiotiques très volumineux. C'est le cas de la microcine E492m produite par *Klebsiella pneumoniae*, qui est constituée d'une chaîne peptidique de 84 acides aminés, reliée par un motif glycosidique à un trimère *N*-(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-sérine mimant un sidérophore de type catéchol (Figure 76). Le sidérophore est reconnu puis transporté dans la cellule par des transporteurs TonB-dépendants spécifiques aux sidérophores de type catécholates comme celui de l'entérobactine, FepA.<sup>391</sup> L'activité antibiotique de cette microcine semble liée à la formation de pores dans la membrane interne, aboutissant à la mort bactérienne.<sup>392, 393</sup>



**Figure 76** : Structure de la microcine E492m. La chaîne peptidique est représentée en rouge, le bras espaceur glycosidique en vert et le sidérophore de type catéchol en bleu.

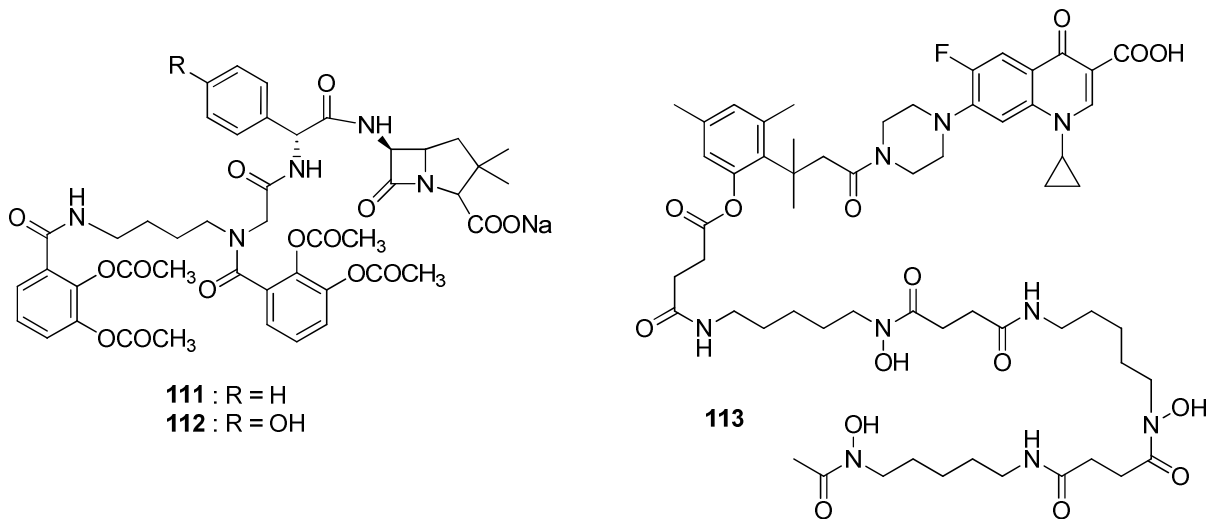


La conjugaison d'un sidérophore avec un antibiotique permet à ces composés d'avoir en moyenne des CMI au moins 100 fois plus faibles que celles des antibiotiques seuls. Ces caractéristiques ont donc incité les chercheurs à développer des sidéromycines synthétiques permettant l'entrée massive d'antibiotiques dans les bactéries à Gram négatif.

### C. Les conjugués sidérophore-antibiotique synthétiques et hémisynthétiques

À l'image des sidéromycines, ces composés sont constitués d'un analogue de sidérophore couplé à un antibiotique. La partie sidérophore agit en tant que vecteur, ce qui permet de transporter l'antibiotique à l'intérieur des bactéries grâce aux systèmes d'assimilation du fer TonB-dépendants.

Nous avons vu que les sidérophores comprennent principalement les fonctions hydroxamate et/ou catécholate. Il n'est donc guère étonnant que les premières approches décrivent des conjugués entre des sidérophores synthétiques incluant le motif catéchol et des antibiotiques comme les sulfonamides et  $\beta$ -lactames.<sup>131, 394-396</sup> Ainsi, les composés bicatécholates couplés à l'ampicilline **111** et **112** ont montré une activité inhibitrice sur des souches cliniques de *P. aeruginosa* et *B. cepacia* supérieure à celle d'antibiotiques de dernière génération comme la ciprofloxacine, l'imipénème et le méropénème, avec des CMI<sub>50</sub> compris entre 60 et 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figure 77).<sup>397</sup> Ces conjugués intègrent un antibiotique dont la cible, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane, est périplasmique. De même, des conjugués entre un sidérophore et un antibiotique dont la cible est cytoplasmique ont eux aussi prouvés leur efficacité sur des souches de *P. aeruginosa*. Notamment, les conjugués de type **113** entre la desferrioxamine B, jouant ici le rôle du sidérophore, et une fluoroquinolone, la ciprofloxacine, ont permis d'obtenir des activités inhibitrices prometteuses sur *P. aeruginosa* (Figure 77).<sup>398</sup>



**Figure 77** : Structures de conjugués sidérophore-antibiotique de synthèse possédant une activité inhibitrice sur *P. aeruginosa* et/ou *B. cepacia*.

Comme dans le cas des sidéromycines naturelles, ces conjugués synthétiques peuvent avoir besoin d'une étape d'hydrolyse pour démasquer leur activité ou relarguer l'antibiotique. Cette étape est catalysée par des peptidases ou des estérases de la bactérie. Dans ce contexte, il convient de mentionner que dans les composés **111** et **112**, les fonctions catéchol sont masquées par des groupes acétyle éliminables *in vivo* par des lipases/estérases bactériennes.

L'ensemble de ces données montrent le fort potentiel offert par ces "chevaux de Troie" synthétiques. La stratégie consistant à vectoriser un antibiotique par un sidérophore permet en effet de bénéficier de l'efficacité et de la spécificité des systèmes d'assimilation du fer pour transporter la molécule active dans la bactérie. Cette stratégie offre également la possibilité de cibler une espèce bactérienne pathogène précise, en choisissant judicieusement le motif d'adressage. Dans ce contexte, et depuis 2004, notre équipe s'intéresse à la pyochéline et au système de transport du fer pyochéline-dépendant. La pyochéline étant un sidérophore commun à *P. aeruginosa* et *B. cepacia*, des chevaux de Troie fondés sur la pyochéline auraient une activité sur ces deux espèces bactériennes en limitant les effets de l'antibiotique sur l'hôte ou sur les bactéries n'exprimant pas le système de transport du fer Pch dépendant.

## II. La pyochéline

### A. Généralités

La pyochéline **30** est un sidérophore commun à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Burkholderia cepacia*. Cette molécule a été isolée et caractérisée pour la première fois à la fin des années 70.<sup>80</sup> Elle possède un énantiomère naturel, l'énantiopyochéline **114**, qui est un sidérophore de *Pseudomonas fluorescens* (Figure 78).<sup>139, 399</sup>

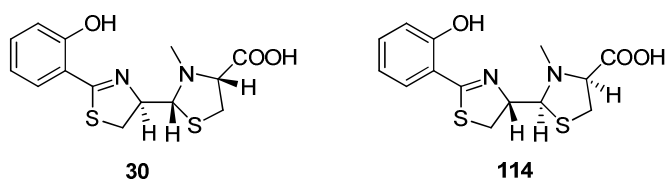
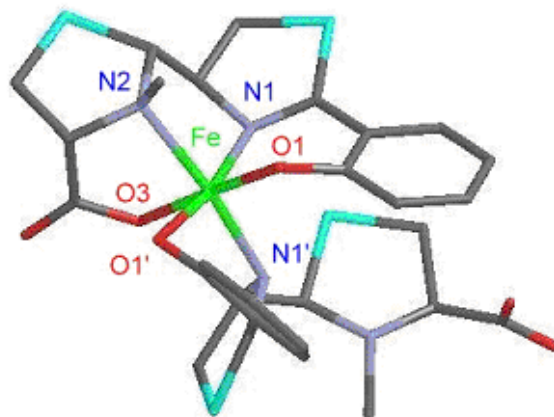


Figure 78 : Structures de la pyochéline **30** et de l'énantiopyochéline **114**.

La constante d'affinité de la pyochéline pour le fer(III) est de  $10^{5,7} \text{ M}^{-1}$  dans le méthanol.<sup>400</sup> Cependant, des études récentes menées par notre équipe en collaboration avec l'équipe de Anne-Marie Albrecht-Gary (ECPM, Strasbourg-Cronenbourg) prouvent que l'affinité de la pyochéline pour le fer est nettement supérieure dans les milieux hydroalcooliques ( $p\text{Fe} = 16$ ).<sup>132</sup> En comparaison d'autres sidérophores tels que l'entérobactine ( $p\text{Fe} = 35,5$ ) ou la pyoverdine ( $p\text{Fe} = 27$ ), cette affinité peut paraître faible, et la pyochéline est parfois considérée comme un sidérophore mineur des bactéries de la famille des *Pseudomonas*. Toutefois il semblerait que ce sidérophore joue un rôle majeur dans les premières phases de l'infection.<sup>401</sup>

Les propriétés de complexation de la pyochéline vis-à-vis de l'ion Fe(III) ont été étudiées et ont permis de mettre en évidence que l'espèce prédominante en solution est un complexe présentant une stœchiométrie ligand/Fe(III) 2:1.<sup>132, 133</sup> La RPE (Résonance Paramagnétique Électronique) a prouvé que le Fe(III) est hexacoordiné en présence de pyochéline, et l'utilisation de l'EXAFS (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) a permis de montrer que les atomes de soufre du sidérophore ne participent pas à la coordination de l'ion métallique. Grâce à ces résultats, un modèle a pu être proposé pour le complexe ferrique de

stœchiométrie 2:1 en solution, dans lequel une des deux pyochélines est tétradentate et l'autre bidentate (Figure 79).<sup>133</sup>



**Figure 79** : Structure modélisée et minimisée du complexe pyochéline-Fer(III) de stœchiométrie 2:1. Tirée de Tseng et *al.*<sup>133</sup>

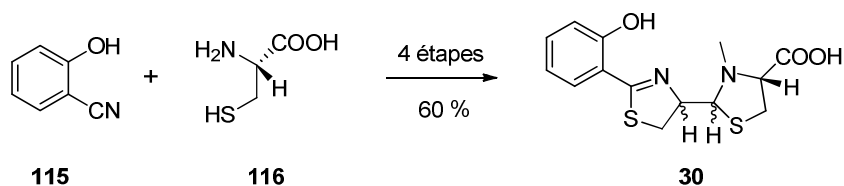
En fonction des souches, *P. aeruginosa* n'excrète qu'entre 5 et 35 mg de pyochéline par litre de culture. L'étude de la voie de transport dépendante de ce sidérophore a donc nécessité la mise au point d'une synthèse totale permettant d'obtenir aisément les quantités de sidérophore nécessaires aux études biologiques. En outre, la pyochéline naturelle est une molécule difficilement fonctionnalisable : la fonction acide carboxylique n'est en effet pas exploitable en raison de sa participation à la sphère de coordination du métal. Par conséquent, et comme dans le cas d'autres composés naturels bioactifs, la synthèse totale permettra aussi d'explorer les voies d'accès conduisant à la synthèse d'analogues à visée thérapeutique.

## B. Synthèse totale et aspects stéréochimiques

Plusieurs synthèses stéréocontrôlées de la pyochéline ont été développées au cours de ces deux dernières décennies.<sup>400, 402</sup> Notre équipe a largement contribué aux avancées dans ce domaine en développant une synthèse originale de la pyochéline et de ses analogues.<sup>403-405</sup>

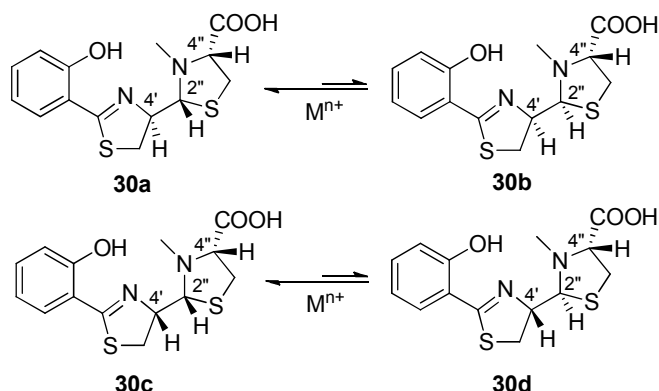
Cette synthèse permet d'obtenir la pyochéline **30** en quatre étapes à partir de 2-hydroxybenzonnitrile **115** et de (D)-cystéine **116**. Cette synthèse est utilisée couramment au laboratoire pour synthétiser la pyochéline à l'échelle multigramme avec un rendement de

60 % sur quatre étapes (contre 25 % maximum sur quatre à onze étapes pour les approches antérieurement décrites) (Schéma 27).



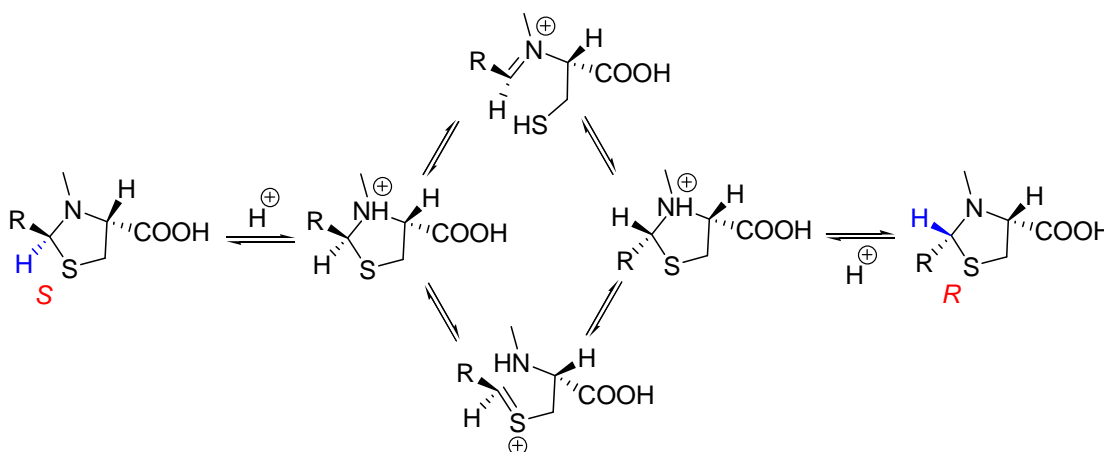
**Schéma 27** : Préparation de la pyochéline **30** en partant du 2-hydroxybenzonnitrile **115** et de la (D)-cystéine **116**.

A l'instar des autres synthèses totales décrites dans la littérature, ce protocole génère la pyochéline **30** sous la forme d'un mélange des quatre diastéréoisomères **30a** ( $4'R, 2''R, 4''R$ ), **30b** ( $4'R, 2''S, 4''R$ ), **30c** ( $4'S, 2''R, 4''R$ ) et **30d** ( $4'S, 2''S, 4''R$ ) dans des proportions respectives 4/3/2/1.<sup>406</sup> Parmi eux, seuls les composés **30a** et **30b** sont des pyochélines. Les composés **30c** et **30d** sont des diastéréoisomères non-naturels appelés néopyochélines. Le centre  $C4''$ , introduit dans la dernière étape, ne s'épimérise pas. Ces quatre diastéréoisomères sont donc le résultat de l'existence de deux configurations pour les centres  $C4'$  et  $C2''$ . L'épimérisation au niveau du centre asymétrique  $C4'$  est liée aux conditions réactionnelles rencontrées au cours de la synthèse. La configuration du centre  $C2''$  peut être quant à elle modifiée en présence du métal, qui induit la formation d'un centre de configuration  $R$  sur cette position.<sup>407</sup> Ainsi, en présence d'un ion métallique, **30b** se transforme en **30a** et **30d** conduit à **30c**. (Figure 80).



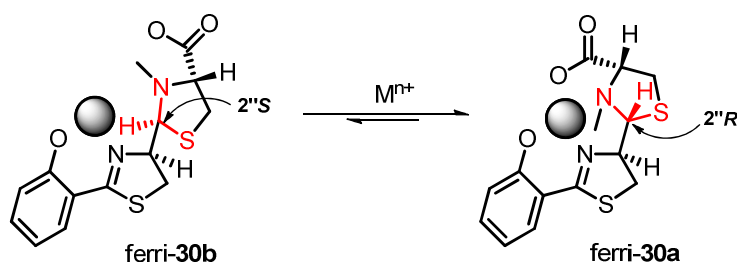
**Figure 80** : Les quatre diastéréoisomères de la pyochéline **30**. Les stéréoisomères **30a** et **30b** sont les diastéréoisomères naturels de la pyochéline. Les stéréoisomères **30c** et **30d** sont des diastéréoisomères non-naturels de la pyochéline constituant la néopyochéline.

Il s'avère que le carbone C2'' est un carbonyle aldéhydique masqué sous la forme d'un thioaminal. Ce motif est susceptible de s'ouvrir puis de se refermer en présence d'un acide par une série de réactions en équilibre (Figure 81).<sup>406</sup> La configuration du carbone C2'' est donc extrêmement labile.



**Figure 81** : Mécanisme de l'épimérisation de la position C2'' de la pyochéline en présence d'un catalyseur acide.

Ceci explique que la présence d'un métal induit la formation exclusive d'une configuration *R* sur le carbone C2'' à partir d'un centre presque totalement épimérisé. Cette interconversion au niveau du carbone C2'' est probablement le résultat d'un effet de matrice lié à l'ion métallique. Celui-ci oriente la configuration de la pyochéline afin d'optimiser la chélation. Ainsi, la formation d'un centre (2''*R*) (ferri-**30a**) permet de rapprocher le carboxylate de l'ion métallique alors qu'au contraire une configuration (2''*S*) (ferri-**30b**) oriente le carboxylate hors de la sphère de coordination (Figure 82). Cette hypothèse est basée sur des observations faites en présence de zinc(II),<sup>407</sup> mais peut sans doute être extrapolées au fer(III), comme le suggèrent des observations expérimentales plus anciennes.<sup>400</sup>



**Figure 82** : Influence de la configuration du carbone C2'' sur le mode de complexation du métal (représenté par une sphère) par la pyochéline.

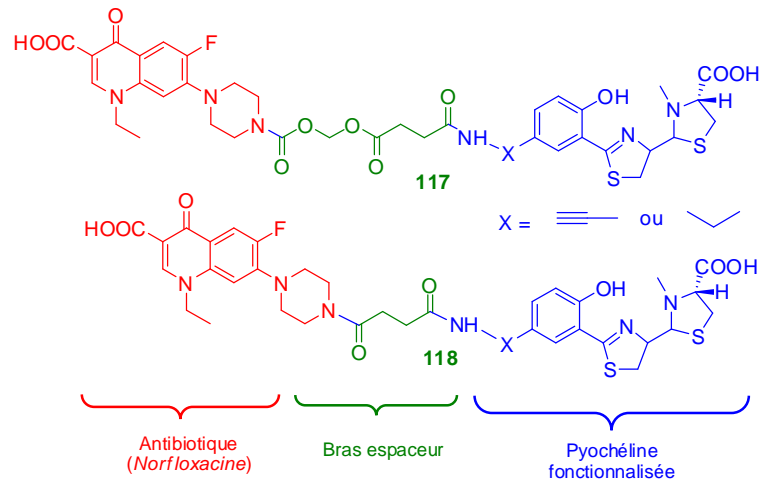
En présence de Fe(III), le mélange des quatre diastéréoisomères de la pyochéline conduit à un mélange de ferripyochéline et ferrinéopyochéline dans des proportions 7/3. Jusqu'en 2007, mise à part la CLHP chirale, il n'existait pas de méthode permettant de séparer la pyochéline **30a/30b** de la néopyochéline **30c/30d**. La purification par chromatographie sur colonne de silice démétallée mise au point dans notre équipe a permis de résoudre efficacement ce problème.

Cette synthèse et ces protocoles de purifications constituent les bases sur lesquelles ont pu se développer les synthèses des conjugués pyochéline-antibiotiques au sein de notre équipe.

### III. Vectorisation d'antibiotiques par la pyochéline : état de l'art

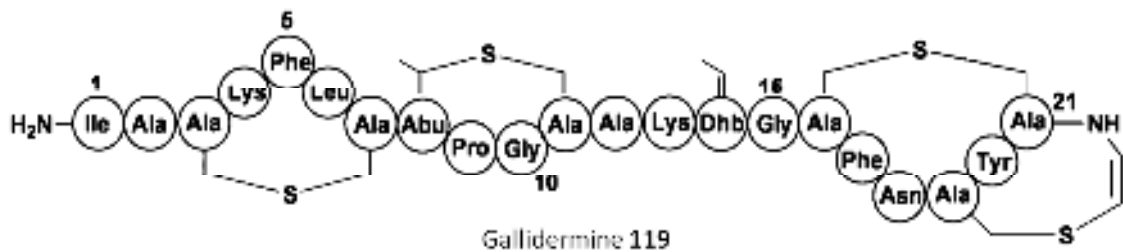
#### A. Vectorisation d'antibiotiques par une pyochéline fonctionnalisée en position C5

Les premiers conjugués pyochéline-antibiotiques ont été synthétisés dans notre équipe par le Dr Freddy Rivault en 2006. Il s'agissait alors de coupler une fluoroquinolone, la norfloxacin, et une pyochéline fonctionnalisée en position 5. Cette position du sidérophore avait été choisie dans une première approche car sa fonctionnalisation est aisée d'un point de vue synthétique. De plus, la présence de substituants en C5 n'altère pas les propriétés chélatantes du sidérophore. La pyochéline a donc été fonctionnalisée en C5 par une extension propylique souple ou propargylique rigide comportant une fonction amine terminale à laquelle la norfloxacin pouvait être connectée par l'intermédiaire de bras espaceurs adaptés.<sup>403, 408</sup> L'antibiotique et le sidérophore ont été connectés *via* un bras hydrolysable *in vivo* (composés de type **117**) ou *via* un bras succinate (composés de type **118**) stable dans les conditions physiologiques (Figure 83).



**Figure 83** : Structure des conjugués norfloxacine-pyochéline de type **117** et **118**.

L'activité inhibitrice des conjugués Pch-norfloxacine sur la croissance bactérienne a été testée sur la souche PAO1 de *P. aeruginosa* cultivée en milieu minimum. Il s'est avéré que les conjugués munis d'un bras espaceur stable de type **118** n'inhibaient pas la croissance bactérienne. En revanche celle-ci est totalement inhibée en présence des conjugués de type **117**, qui possèdent un bras hydrolysable *in vivo*.<sup>408</sup> Toutefois, l'activité des prodrogues restait inférieure à celle de l'antibiotique testé seul. D'autres conjugués, entre une pyochéline fonctionnalisée en C5 et un lantabiotique, la gallidermine **119**, ont depuis été synthétisés par l'équipe de John Vederas (Figure 84).<sup>409</sup>



**Figure 84** : Structure simplifiée de la gallidermine **119**.<sup>409</sup>

Les lantabiotiques sont des peptides antimicrobiens modifiés post-traductionnellement efficaces contre les bactéries à Gram positif. Ils agissent en formant des pores dans les membranes et/ou en inhibant la synthèse du peptidoglycane. Leur incapacité à traverser la membrane externe des bactéries à Gram négatif limitent toutefois leur utilisation contre ces pathogènes. La vectorisation de ces composés par les sidérophores devrait donc aider à surmonter ce problème. Malheureusement, les conjugués pyochéline-gallidermine n'ont



montré qu'une faible activité antibactérienne sur *P. aeruginosa* et *B. cepacia* en milieu carencé en fer.<sup>409</sup> Il semble donc que la position C5 choisie pour fonctionnaliser la pyochéline n'était pas adaptée.

La résolution de la structure tridimensionnelle de FptA, le récepteur spécifique de la ferripyochéline,<sup>161</sup> permet ainsi d'expliquer, au moins partiellement, ces résultats. Cette structure montre en effet que la substitution de la pyochéline en C5 peut provoquer des conflits stériques avec le transporteur. L'étude du site de liaison de la pyochéline au transporteur FptA a permis d'identifier une autre position capable d'accepter des substitutions imposantes. Ainsi, l'azote N3" de la thiazolidine est orienté vers une poche plus large où pourrait se déployer un bras espaceur flexible connecté à un substituant, comme par exemple, un antibiotique (Figure 85).



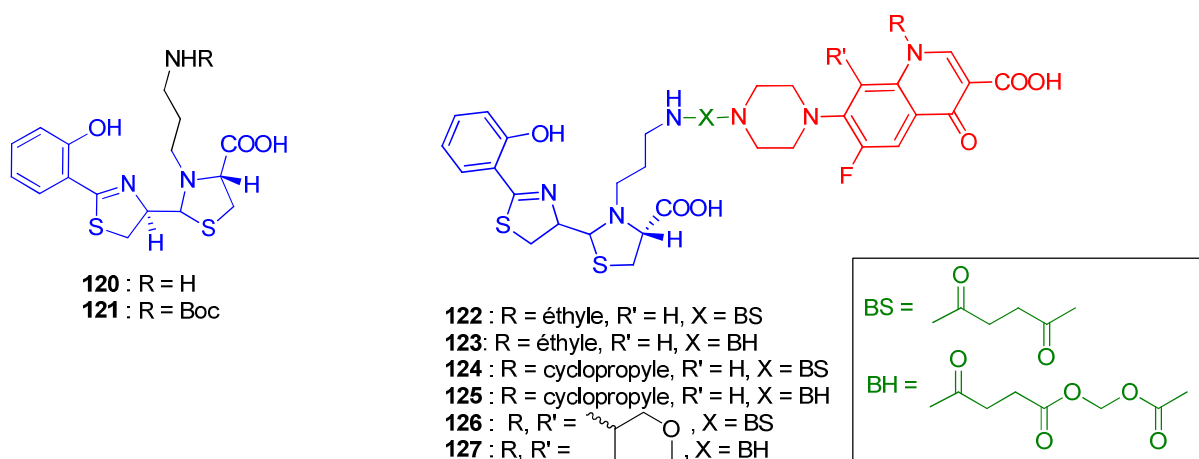
**Figure 85** : Structure tridimensionnelle du transporteur FptA (vu du côté extracellulaire) cocristallisé avec la ferripyochéline. La position C5, engendrant une gêne stérique est indiquée par une flèche rouge et la position N3", favorable à des substitutions imposantes, est indiquée par une flèche verte.

Ces résultats ont donc orienté notre équipe vers la synthèse d'une nouvelle génération de conjugués pouvant vectoriser un antibiotique grâce à une pyochéline fonctionnalisée en position N3".

## B. Vectorisation de fluoroquinolones par une pyochéline fonctionnalisée en position N3''

Cette nouvelle génération de conjugués a été synthétisée par le Dr Sabrina Noël. Dans ce contexte les pyochélines fonctionnalisées en position N3'' **120** et **121** (Figure 86.A) ont été préparées. Ces composés ont prouvé qu'ils étaient capables de transporter le Fe(III) et de se lier au transporteur FptA avec une affinité du même ordre que le sidérophore naturel.<sup>410</sup> La synthèse de sondes fluorescentes basées sur cette pyochéline fonctionnalisée a permis de vérifier par microscopie de fluorescence que cet analogue de sidérophore parvenait à transporter efficacement des xénobiotiques à l'intérieur de la bactérie en utilisant la voie de transport pyochéline-dépendante.<sup>411</sup>

Suite à ces résultats encourageants, trois fluoroquinolones (norfloxacin, ciprofloxacin et ofloxacin) ont été connectées par l'intermédiaire de bras espaceurs stables (composés **122**, **124** et **126**) ou hydrolysables *in vivo* (composés **123**, **125** et **127**) à la pyochéline fonctionnalisée (Figure 86.B).



**Figure 86 : A.** Structure des pyochélines fonctionnalisées en N3'' **120** et **121**. La sous-structure de la pyochéline est coloré en bleu, l'extension propylique fonctionnalisant la pyochéline est colorée en noir. **B.** Structure des conjugués pyochéline-fluoroquinolones avec bras espaceur stable (**122**, **124** et **126**) ou hydrolysable *in vivo* (**123**, **125** et **127**).

Lors de l'évaluation de l'activité biologique de ces composés, les conjugués **122**, **124** et **126** munis d'un bras stable n'ont présenté aucune activité inhibitrice sur la croissance de *P. aeruginosa*. Par contre, les conjugués pyochéline-fluoroquinolones **123**, **125** et **127** présentaient une activité inhibitrice envers *P. aeruginosa*. Malheureusement, cette activité

restait inférieure à celle de l'antibiotique libre. De plus, les conjugués restaient actifs sur une souche incapable d'assimiler le fer par la voie pyochéline-dépendante. Ce résultat montrait que l'hydrolyse du bras espaceur ne se déroulait pas dans la bactérie mais plutôt dans le milieu extracellulaire. En outre, l'activité des conjugués a probablement été globalement minimisée compte tenu de la faible solubilité de l'ensemble de ces conjugués dans les milieux aqueux.<sup>410</sup>

L'ensemble de ces travaux montrent donc que la pyochéline fonctionnalisée **120** est capable de vectoriser une molécule exogène par le système de transport du fer pyochéline-dépendant. Nous souhaitons désormais faire varier les familles d'antibiotiques vectorisées par la pyochéline afin de tendre vers des conjugués plus solubles et plus actifs.

## IV. Synthèse de conjugués pyochéline-antibiotiques : travaux de thèse

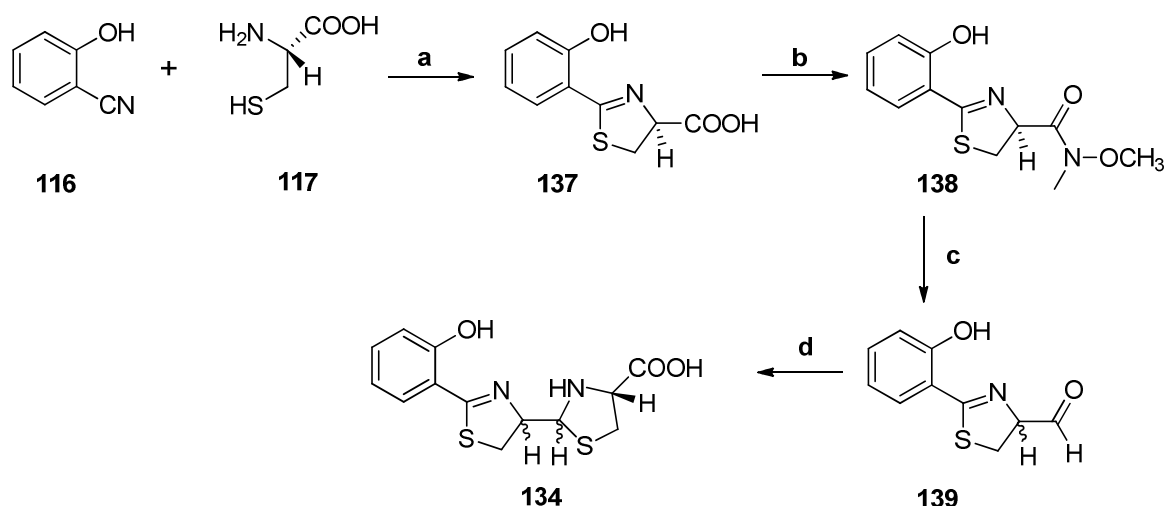
L'objectif ultime de ce travail sera bien entendu de connecter les inhibiteurs potentiels de TonB à la pyochéline lorsque la synthèse de ceux-ci sera achevée. Nous souhaitons également connecter la pyochéline à d'autres antibiotiques, dont la cible est cytoplasmique, comme les oxazolidinones. C'est plus particulièrement sur le linézolide **10**, que nos travaux de cette thèse ont porté (Figure 87). Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 1, le linézolide est le seul antibiotique réellement innovant mis sur le marché ces 40 dernières années. Il cible le ribosome et inhibe efficacement la synthèse des protéines. La faible perméabilité et les systèmes d'efflux des bactéries à Gram négatif limitent, pour l'instant, l'action antibactérienne du linézolide aux bactéries à Gram positif. En outre, le linézolide n'agit pas spécifiquement sur les cellules bactériennes, et n'est donc pas dénué d'effets secondaires pour le patient. La vectorisation de cet antibiotique par la pyochéline permettrait donc de réduire la toxicité de ce médicament, et de faciliter son entrée dans *P. aeruginosa*, bactérie à Gram négatif généralement peu sensible à cet antibiotique.<sup>26, 412</sup> Pour permettre la connexion à la pyochéline fonctionnalisée, nous synthétiserons deux analogues **128** et **129** du linézolide **10** (Figure 87).



Nous allons détailler plus particulièrement la synthèse de la pyochéline fonctionnalisée en position N3" **120**, celles du linézolide **10** et de ses analogues **128** et **129**, puis celle du bras espaceur **136**. L'assemblage des conjugués pyochéline-linézolide sera abordé dans les perspectives.

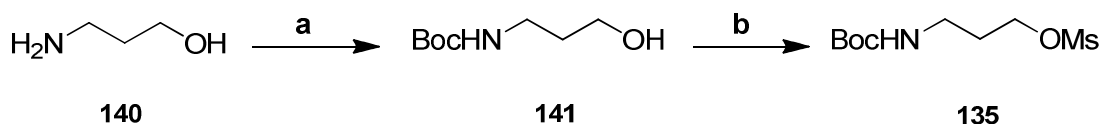
## A. Synthèse de la pyochéline fonctionnalisée en position N3"

La synthèse de la pyochéline fonctionnalisée a été réalisée selon la procédure mise au point par le Dr Sabrina Noël,<sup>410</sup> qui débute par la synthèse de la *nor*-pyochéline **134**. La synthèse de cet analogue est très similaire à celle de la pyochéline **30** qui a été optimisée dans notre équipe pour améliorer à la fois le rendement et le contrôle stéréochimique.<sup>403, 404</sup> Les deux substrats de départ, le 2-hydroxybenzonnitrile **116** et la (D)-cystéine **117**, sont condensés dans un mélange hydrométhanolique tamponné à pH 6,4 pour obtenir la thiazoline **137**.<sup>413</sup> Une épimérisation partielle a lieu mais deux recristallisations successives dans un mélange éthanol/hexane permettent d'obtenir la thiazoline **137** avec 94 % d'excès énantiomérique. Les études menées par CLHP ont montré que l'ampleur de l'épimérisation n'est ni fonction du temps de réaction ni fonction du pH du milieu réactionnel ou de la nature du tampon utilisé (résultats non publiés). L'amide de Weinreb **138** est ensuite obtenu en couplant la fonction carboxylique de la thiazoline **137** avec la *N,O*-diméthylhydroxylamine en présence d'EDCI. Dans ces conditions, cet agent de couplage n'entraîne apparemment pas d'épimérisation et facilite les étapes de purification. L'amide de Weinreb **138** est ensuite réduit par l'hydrure mixte d'aluminium et de lithium dans du THF pour conduire à l'aldéhyde **139**.<sup>414</sup> Enfin, la condensation de l'aldéhyde **139** avec la (L)-cystéine permet de former la thiazolidine **134** avec un rendement de 59 % à partir de l'amide de Weinreb **138** (Schéma 29). La *nor*-pyochéline est alors obtenue sous la forme d'un mélange de trois diastéréoisomères **134a** (4'*R*, 2''*R*, 4''*R*), **134b** (4'*R*, 2''*S*, 4''*R*), **134c** (4'*S*, 2''*S*, 4''*R*) dans des proportions 50/40/10.



**Schéma 29** : Synthèse de la *nor*-pyochéline **134**. Réactifs et conditions : (a) MeOH/tampon phosphate 0,1 M, pH 6,4, 60 °C, 94 %. (b) CH<sub>3</sub>ONHCH<sub>3</sub>.HCl, DIPEA, EDCI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 à 20 °C, 59 %. (c) LiAlH<sub>4</sub>, THF, -50 à -20 °C. (d) L-Cystéine.HCl, AcOK, EtOH/H<sub>2</sub>O, 20 °C, 59 % sur 2 étapes.

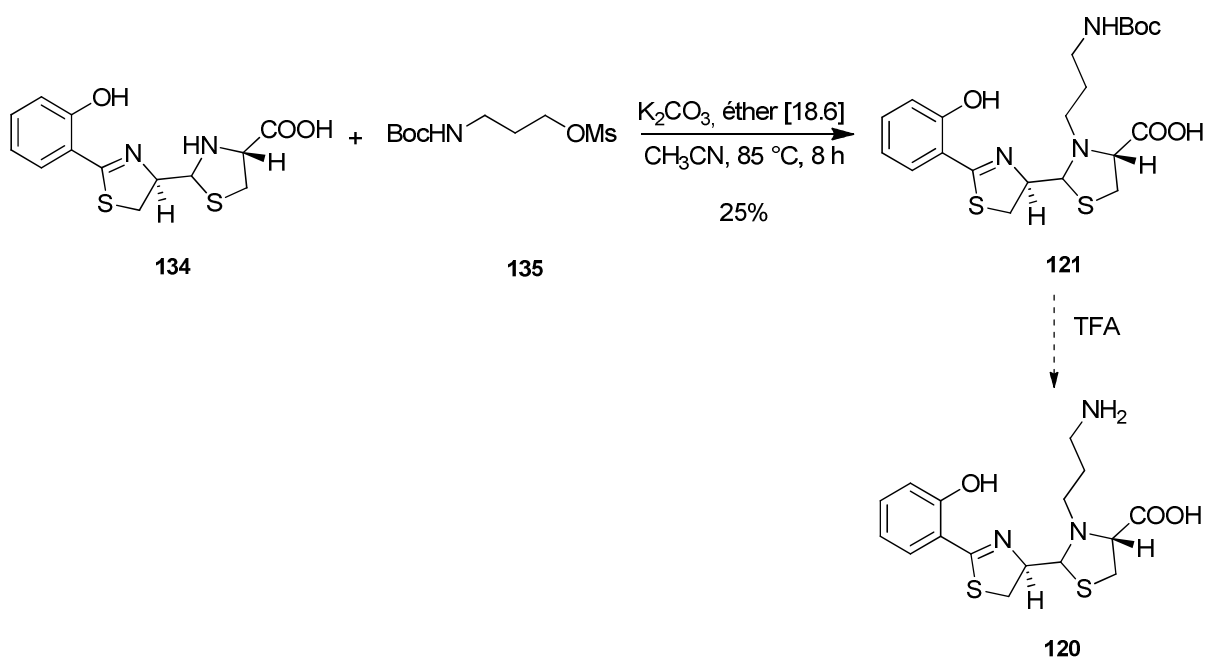
L'extension aminée **135** a ensuite été préparée en partant du 3-aminopropanol **140**. La fonction amine est tout d'abord protégée avec un groupement Boc pour conduire au carbamate **141** avec un rendement de 76 %. La fonction hydroxyle du composé **141** est ensuite activée sous la forme du mésylate **135**, obtenu avec un rendement de 100 % (Schéma 30).<sup>415</sup>



**Schéma 30** : Synthèse de l'extension aminée **135**. Réactifs et conditions : (a) Boc<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 à 20 °C, 76 %. (b) MsCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 à 20 °C, 100 %.

L'extension aminée **135** a ensuite été couplée à la *nor*-pyochéline **134** pour obtenir la pyochéline fonctionnalisée en position N3'' **121** recherchée. Cette étape avait nécessité une longue mise au point des conditions réactionnelles par le Dr Noël. Les conditions optimales décrivent la formation du produit désiré dans l'acétonitrile à reflux, en présence de carbonate de potassium et d'éther-couronne [18.6], avec un rendement de 62 % (Schéma 31). Nous avons cependant eu des difficultés à reproduire cette étape délicate, en n'obtenant la pyochéline fonctionnalisée qu'avec un rendement maximal de 25 %. La réaction en elle-même est complète, le problème n'est donc pas lié aux conditions réactionnelles. Celui-ci semble plutôt provenir des conditions de purification du mélange de

diastéréoisomères obtenu à l'issue des cinq étapes de la synthèse. La purification sur gel de silice démetallée s'est avérée difficile : une grande partie du produit reste en effet sur la silice dans les conditions d'élution permettant une séparation des diastéréoisomères, ce qui explique le rendement final faible. L'optimisation des protocoles de purification devraient donc nous permettre à l'avenir d'accéder à des quantités satisfaisantes de pyochéline fonctionnalisée **121**. La déprotection du groupement Boc par du TFA pourra ensuite nous permettre de conjuguer la pyochéline fonctionnalisée **120** à divers antibiotiques.

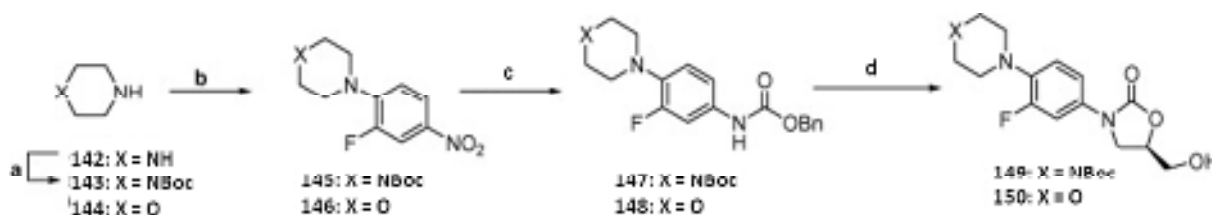


**Schéma 31** : Synthèse de la pyochéline fonctionnalisée *N*-Boc **121**, précurseur de la pyochéline fonctionnalisée **120**.

En parallèle, nous avons synthétisé le linézolide **10**, qui servira de contrôle lors des expériences biologiques, et ses analogues fonctionnalisés **128** et **129** destinés à être connectés avec la pyochéline fonctionnalisée **120**.

## B. Synthèse du linézolide et de ses analogues

Une synthèse d'analogues du linézolide a récemment été proposée par l'équipe de Marvin Miller.<sup>412</sup> Dans ce protocole, la pipérazine **142** est tout d'abord mono-protégée par un groupement Boc afin d'obtenir la *N*-Boc-pipérazine **143** avec un rendement de 50 %. La synthèse se poursuit par la substitution nucléophile aromatique en milieu basique du 3,4-difluoronitrobenzène par la morpholine **144** et la *N*-Boc-pipérazine **143** préalablement préparée. Les dérivés para-substitués du nitrobenzène **145** et **146** sont ainsi obtenus avec 84 % et 49 % de rendement respectivement. La réduction de la fonction nitro par hydrogénation catalytique, suivie d'une réaction avec du chloroformiate de benzyle permet d'obtenir les anilines protégées **147** et **148** avec 89 % et 92 % de rendement respectifs. Ces composés sont ensuite traités successivement avec du *n*-butyllithium et du *R*-glycidyl butyrate à -78 °C pour former les oxazolidinones **149** et **150** avec 70 % de rendement (Schéma 32).

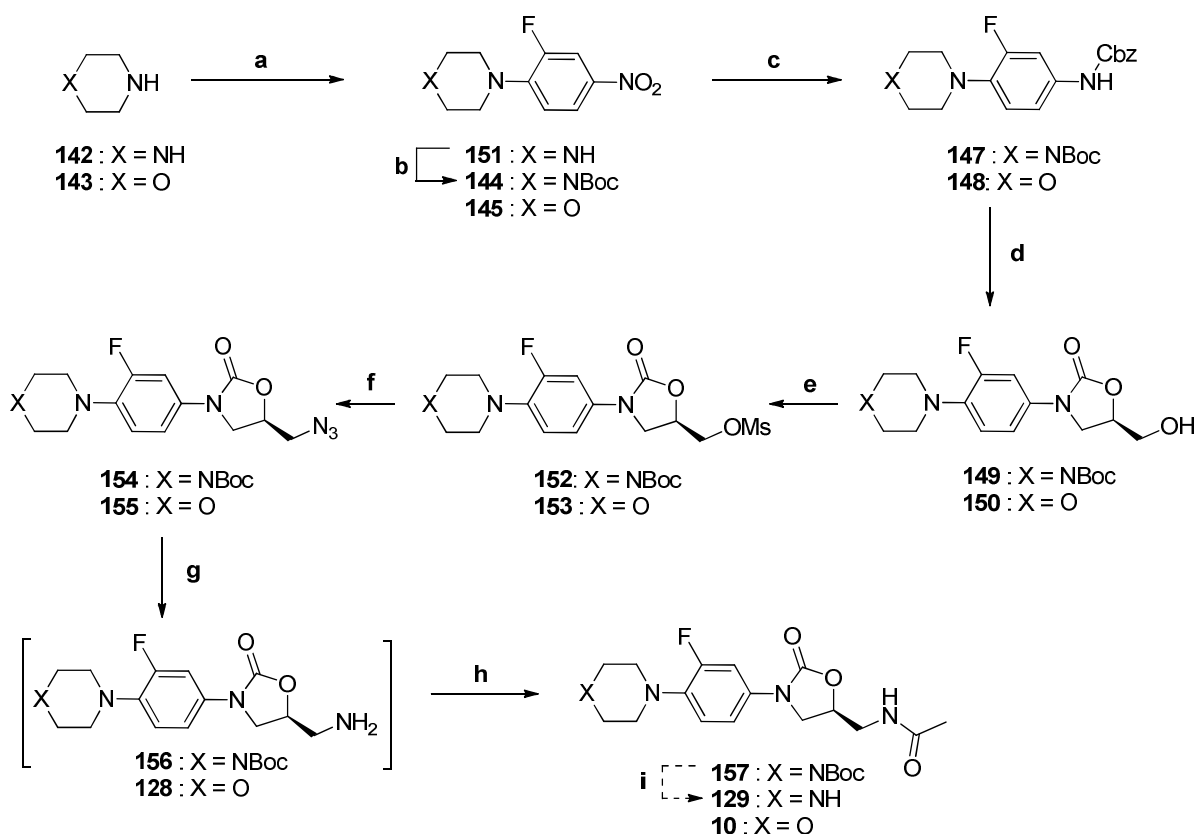


**Schéma 32** : Synthèse du linézolide et d'analogues, proposée par Miller. Réactifs et conditions : (a) Boc<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50 %. (b) 3,4-difluoronitrobenzène, DIPEA, CH<sub>3</sub>CN, 49 % pour **145**, 84 % pour **146**. (c) i. Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH ; ii. CbzCl, NaHCO<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, 89 % pour **147**, 92 % pour **148**. (d) i. *n*BuLi, THF, -78 °C ; ii. (*R*)-glycidyl butyrate, 71 % pour **149**, 70 % pour **150**.

Entre nos mains, les deux premières étapes de la synthèse ne conduisaient pas aux produits attendus avec des rendements acceptables. Nous avons donc modifié et optimisé les deux premières étapes de la synthèse. Celle-ci commence directement par la substitution nucléophile aromatique en milieu basique du 3,4-difluoronitrobenzène par la morpholine **144** ou la pipérazine **142**. La réaction se déroule à 80 °C dans l'acétonitrile et permet d'obtenir quantitativement les intermédiaires **145** et **151**. L'amine secondaire de la pipérazine **151** est ensuite protégée par un groupement Boc en milieu basique avec un rendement de 98 %. La simple inversion des deux premières étapes permet donc d'obtenir l'intermédiaire **144** avec 98 % de rendement, au lieu des 25 % décrits par Miller et son



équipe. La fonction nitro est ensuite réduite en amine par du borohydrure de sodium en présence de sulfate de cuivre.<sup>416</sup> Cette méthode permet d'obtenir les amines intermédiaires rapidement, proprement et de manière quantitative. Ces amines sont ensuite directement protégées sous forme de carboxybenzyles **147** et **148** par réaction avec du chloroformiate de benzyle en présence de DIPEA, avec des rendements respectifs de 68 % et 74 % sur deux étapes. Les carbamates obtenus sont ensuite traités successivement avec du *n*-butyllithium puis du (*R*)-glycidyl butyrate afin de former les oxazolidinones **149** et **150** correspondantes de configuration *R* en C5.<sup>417</sup> Une mise au point de la température de réaction a été nécessaire pour cette étape. Le *n*-butyllithium doit être ajouté à -78 °C, puis la température est laissée remonter jusqu'à -10 °C pour favoriser la déprotonation du carbamate. Lorsque celle-ci est complète, le *R*-glycidyl butyrate est ajouté goutte à goutte à -70 °C, puis la température est laissée remonter jusqu'à 20 °C pour promouvoir l'attaque nucléophile du carbamate sur l'époxyde puis la cyclisation. Les oxazolidinones **149** et **150** sont ainsi obtenues avec 72 % de rendement. Leur fonction alcool est ensuite activée sous la forme de mésylate **152** et **153** afin d'être convertie quantitativement en azoture **154** et **155** par de l'azoture de sodium à 75 °C dans du DMF. Les azotures sont ensuite réduits en amine par la réaction de Staudinger en utilisant de la triphénylphosphine sur support solide afin de faciliter l'élimination de l'oxyde de triphénylphosphine formé au cours de la réaction.<sup>418</sup> Nous avons choisi cette méthode car elle permet de réduire des azotures dans des conditions très douces. Les amines des composés intermédiaire **156** et **128** sont ensuite directement acétylées afin d'obtenir le linézolide **10** d'une part, et l'analogue **157** d'autre part. Le traitement du composé **157** par du TFA conduit à l'analogue recherché **129** (Schéma 33).



**Schéma 32** : Synthèse du linézolide **10** et de ses analogues **128** et **129**. Réactifs et conditions : (a) 3,4-difluoronitrobenzène, CH<sub>3</sub>CN, 70 à 80 °C, 1 h, 100 % pour **142**, 94 % pour **143**. (b) Boc<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, 20 °C, 2h30, 98 %. (c) i. NaBH<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, THF/MeOH/H<sub>2</sub>O, 0 à 20 °C, 1 h ; ii. CbzCl, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 °C, 12 h. 68 % pour **147**, 74 % pour **148** sur deux étapes. (d) i. *n*BuLi, THF, -78 à -10 °C, 30 min ; ii. *R*-glycidyl butyrate, 20 °C, 2 h, 72 % pour **149**, 71 % pour **150**. (e) MsCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 à 25 °C, 2 h, 94 % pour **152**, 87 % pour **153**. (f) NaN<sub>3</sub>, DMF, 75 °C, 4 h, 100 % pour **154** et **155**. (g) PPh<sub>3</sub> supportée, THF/H<sub>2</sub>O, 55 °C, 1 h. (h) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 °C, 12 h. (i) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 °C.

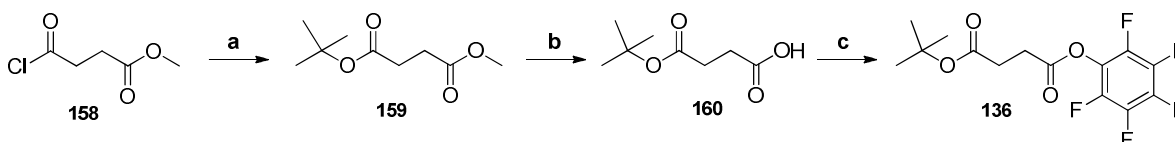
Les composés **128** et **129** pourront par la suite être connectés à la pyochéline par l'intermédiaire d'un bras espaceur *via* leurs fonctions amines. Pour cela, le groupement Boc de l'analogue de la pyochéline **121** sera clivé par de l'acide trifluoroacétique pour permettre le couplage de l'amine **120** avec le bloc bras espaceur-antibiotique.

## C. Synthèse du bras espaceur

Nous souhaitons connecter les analogues du linézolide à la pyochéline par l'intermédiaire d'un bras espaceur stable de type succinique, bien que les conjugués pyochéline-fluoroquinolones possédant un bras espaceur stable n'aient pas présenté d'activité biologique.<sup>410</sup> Les fluoroquinolones ont en effet besoin d'être dissociées de leur

vecteur pour pouvoir exercer leur activité antibiotique, mais le cas des oxazolidinones est différent. En effet, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les oxazolidinones de 2<sup>ème</sup> génération sont substituées sur les positions que nous souhaitons modifier, et présentent pourtant des activités équivalentes voire supérieures à celle du linézolide.

Dans une première approche, nous souhaitons donc coupler les analogues du linézolide **128** et **129** avec le bras succinique en utilisant les conditions mises au point par le Dr Noël pour la synthèse de conjugués pyochéline-fluoroquinolones.<sup>410</sup> Le bras espaceur doit se présenter sous la forme d'un ester activé pour pouvoir être connecté à la fonction amine des agents antibactériens. La synthèse du bras espaceur débute par la substitution du chlorure commercial **158** par le *tert*-butanol dans un mélange de pyridine et de chloroforme pour conduire au diester **159** avec un rendement de 74 %. La saponification de l'ester méthylique du composé **159** génère le *tert*-butylhémisuccinate **160** avec un rendement de 88 %. Ce dernier composé est traité par du pentafluorophénol en présence d'EDCI dans du tétrahydrofurane pour conduire à l'ester activé **136** avec un rendement de 80 % (Schéma 34).

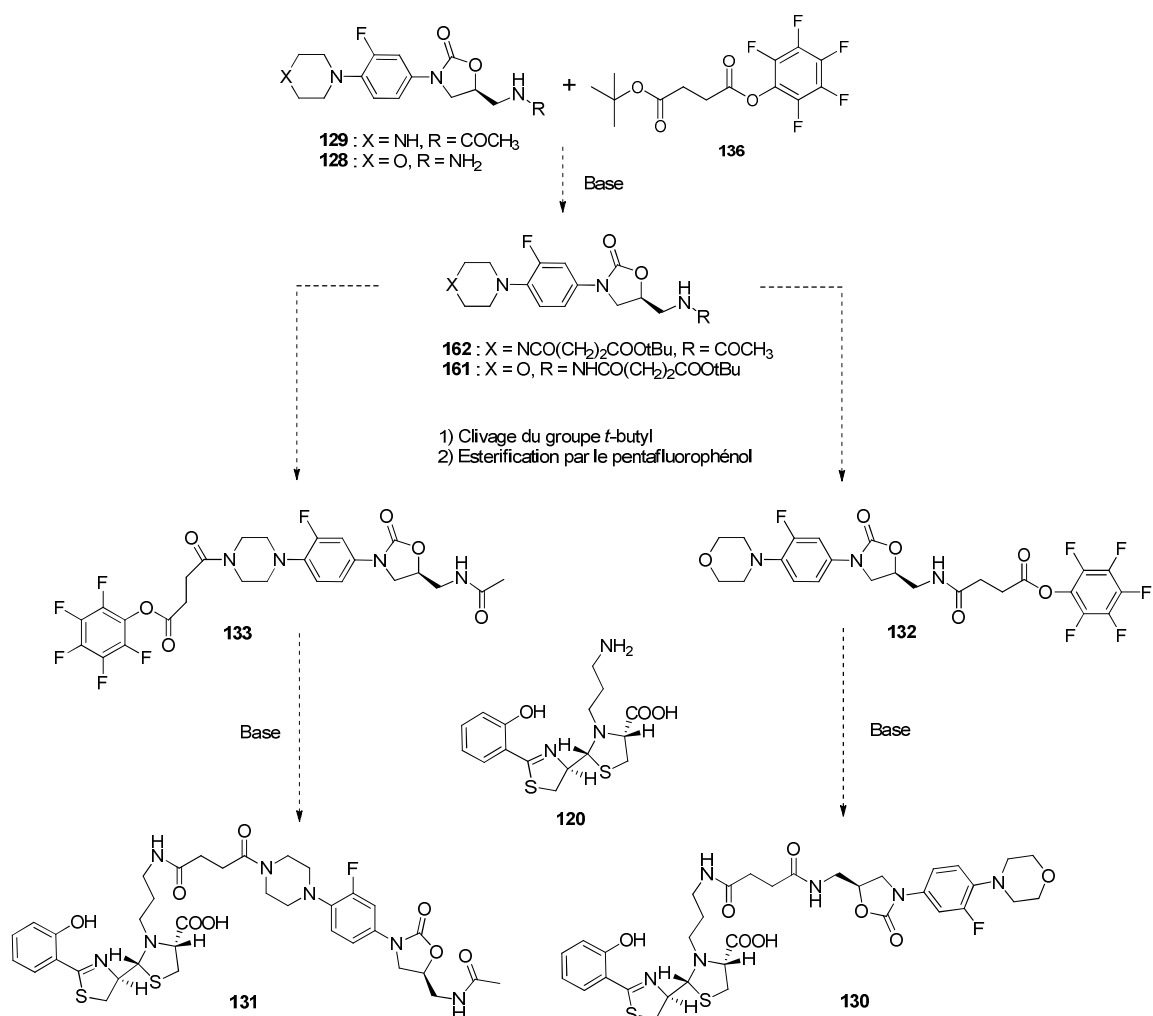


**Schéma 34:** Synthèse du *tert*-butylhémisuccinate activé **136**. Réactifs et conditions : (a) *t*BuOH, pyridine, CHCl<sub>3</sub>, 65 °C, 74 %. (b) NaOH<sub>aq</sub> 0,6 N, THF, 88 %. (c) C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>OH, EDCI, THF, 80 %.

## D. Perspectives : assemblages des conjugués pyochéline-antibiotiques

Nous avons réussi à synthétiser deux analogues **128** et **129** du linézolide grâce à des protocoles optimisés. Nous avons en outre préparé un bras espaceur de type succinique **136** permettant de connecter les analogues du linézolide à une pyochéline fonctionnalisée en position N3". Le diester succinique **136** préalablement synthétisé sera ainsi mis en réaction avec les analogues du linézolide **128** et **129** en présence d'une base pour conduire aux esters *tert*-butyliques **161** et **162**. Après le clivage de l'ester *tert*-butylique et activation de la fonction carboxylique nous devrions obtenir les esters de pentafluorophénol **132** et **133**.

Enfin, le bloc linézolide-bras espaceur pourra être connecté à la pyochéline fonctionnalisée **120** en présence d'une base pour générer les conjugués **130** et **131** (Schéma 35).



**Schéma 35** : Synthèse des conjugués pyochéline-linézolid **130** et **131**.

Nous pourrions ensuite évaluer l'activité inhibitrice des molécules finales sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. En fonction des activités observées, il sera peut-être nécessaire de changer le bras espaceur stable pour un bras espaceur hydrolysable. Dans ce cas il sera important de vérifier que l'hydrolyse du bras espaceur se passe bien dans la cellule, et non dans le milieu extracellulaire. Des recherches sont d'ailleurs actuellement en cours au sein de notre équipe pour développer des bras espaceurs hydrolysables *in cellulo*.



# **Conclusion**



Dans le cadre de la recherche de nouvelles antibiothérapies, la protéine TonB constitue une cible biologique idéale. Cette protéine, en s'associant aux transporteurs de membrane externe, permet le transport d'un nutriment vital, le fer. Cette protéine conservée est très répandue chez les bactéries à Gram négatif, mais est absente dans les cellules eucaryotes, ce qui devrait permettre à des antibiotiques visant TonB d'atteindre un grand nombre de ces microorganismes, *a priori* sans avoir d'effets indésirables pour l'hôte. L'inhibition de cette protéine devrait avoir un effet notable sur la prolifération bactérienne et diminuer fortement la virulence des souches pathogènes. Toutefois, les stratégies antibiotiques dirigées contre TonB mentionnées dans la littérature sont rares et limitées au pathogène modèle *E. coli*. Elles visent en effet une machinerie moléculaire complexe et dont le fonctionnement fait encore l'objet de nombreuses hypothèses. Nous avons fait le choix ambitieux et novateur d'étudier l'inhibition de la protéine TonB, chez un pathogène résistant, *P. aeruginosa*. Deux approches ont pu être explorées au cours de ces travaux.

La première approche consistait à développer des inhibiteurs non compétitifs de l'interaction TonB-TME. Nous souhaitons entraver les changements conformationnels de TonB et/ou modifier son affinité pour les transporteurs de membrane externe grâce à des ligands qui viendraient s'insérer au cœur de la protéine. Une poche de liaison potentielle a ainsi pu être mise en évidence lors de l'exploration informatique de la protéine TonB. Ce site devait faire l'objet d'un criblage *in silico* de chimiothèques virtuelles afin d'établir les structures d'inhibiteurs ou de modulateurs potentiels. Cependant, une étude de simulation moléculaire dynamique a montré que cette cavité n'était pas suffisamment grande pour accueillir une molécule exogène.

Nous nous sommes donc focalisés sur notre seconde approche, c'est-à-dire le développement d'inhibiteurs compétitifs de TonB. Nous souhaitons interrompre une interaction protéine-protéine. Ce type d'approche est en plein essor dans le domaine de la recherche pharmaceutique. Toutefois, notre cas est inédit : l'interaction entre TonB et les transporteurs de membrane externe (TME) repose sur la formation d'un feuillet  $\beta$  entre la protéine TonB et 4 à 5 acides aminés du TME, appelée boîte TonB. Empêcher la formation de ce feuillet s'annonçait complexe, mais cette stratégie a été validée il y a 30 ans sur des souches d'*E. coli* en montrant qu'un fragment peptidique de boîte TonB pouvait effectivement affecter la croissance et la virulence bactérienne en séquestrant TonB dans le



périplasme. La conception de nos molécules s'est donc inspirée des ligands naturels de TonB. L'analyse énergétique de l'interaction TonB-boîte TonB nous a tout d'abord permis d'identifier des résidus hydrophobes cruciaux à l'interaction. Des alignements de séquences de boîtes TonB de TME de *P. aeruginosa*, puis d'un grand nombre d'espèces bactériennes nous ont ensuite permis d'identifier les séquences TSATS et TVVVT comme peptides consensus. Les synthèses de ces fragments ont été réalisées par des méthodes de synthèse classique ou continue en solution reposant sur la préparation d'esters de pentafluorophénol. Nous souhaitons ensuite fonctionnaliser ces peptides par des hétérocycles afin de créer des interactions supplémentaires avec des résidus polaires de TonB, afin d'augmenter l'affinité des peptides pour la protéine cible. Dans ce contexte, des châssis moléculaires de type 1,2,4-triazine et isoindole ont été synthétisés. Nous avons notamment élaboré une nouvelle voie de synthèse de 1,2,4-triazinones en partant de dipeptides protégés par un groupement protecteur encore peu utilisé, le Tpscoc. Nous avons également synthétisé des isoindolinones substituées de manière originale *via* une réaction multicomposants, suivi d'une réaction de Diels-Alder intramoléculaire.

Nous avons étudié en parallèle la mise au point d'un processus d'évaluation *in vitro* des propriétés d'affinité de nos composés pour leur cible, TonB. Nous avons pour cela testé différentes techniques. La calorimétrie isotherme à titration s'est révélée être une technique très consommatrice en protéines et a dû être abandonnée. Nous avons donc construit une protéine TonB fluorescente afin de mesurer les constantes d'affinité de nos composés par polarisation de fluorescence, mais cette technique n'a pas donné les résultats escomptés. La résonance plasmonique de surface semble être la technique la plus adaptée. Elle nous a permis d'évaluer les constantes d'affinité d'un transporteur de membrane externe et de deux peptides contenant la boîte TonB de ce transporteur. Les résultats des simulations de tests de compétition a montré qu'il sera possible de mesurer la constante d'inhibition de nos composés de l'interaction TonB-TME.

Enfin, nous souhaitons appliquer la stratégie dite du "Cheval de Troie" pour déjouer la faible perméabilité membranaire de notre modèle d'étude, *Pseudomonas aeruginosa*. De nombreux travaux ont déjà été faits dans notre équipe à ce sujet. Nous souhaitons conjuguer le linézolide, un antibiotique très efficace mais agissant spécifiquement sur les bactéries à Gram positif, à la pyochéline, un sidérophore de *P. aeruginosa*. Nous pourrions

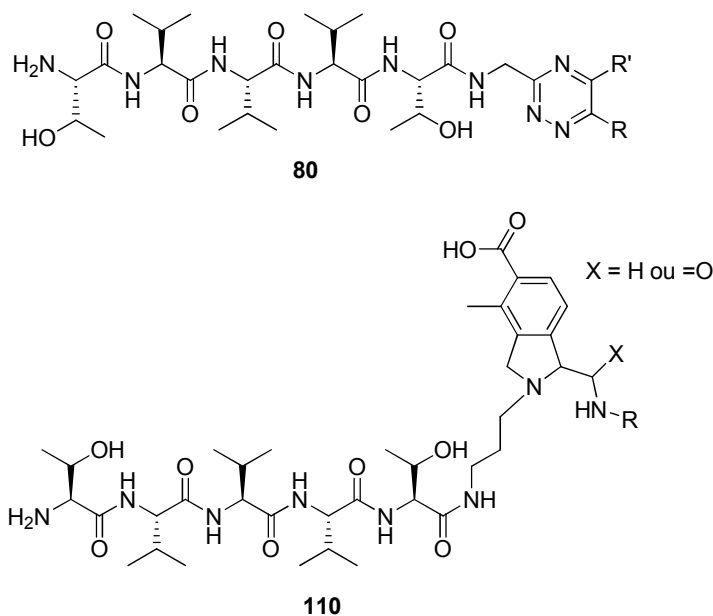
ainsi rendre ce pathogène sensible à ce puissant antibiotique en utilisant la voie de transport du fer pyochéline-dépendante. Nous avons pour cela préparé une pyochéline fonctionnalisée en position N3'', ainsi que de deux analogues du linézolide par une voie de synthèse optimisée. Un bras espaceur de type succinique préparé en parallèle nous permettra ensuite de connecter le sidérophore à l'antibiotique. À terme, cette stratégie sera exploitée pour vectoriser les inhibiteurs de TonB.



# **Perspectives**



Au cours de cette thèse, nous avons ouvert la voie à la synthèse de d'inhibiteurs potentiels de la protéine bactérienne TonB. La synthèse des composés de type **80** et **110** est notre objectif à court terme (Figure 88). Les ancres moléculaires de type 1,2,4-triazine et isoindole seront connectées par une fonctions amides au peptide TVVVT, ainsi qu'au peptide TSATS.

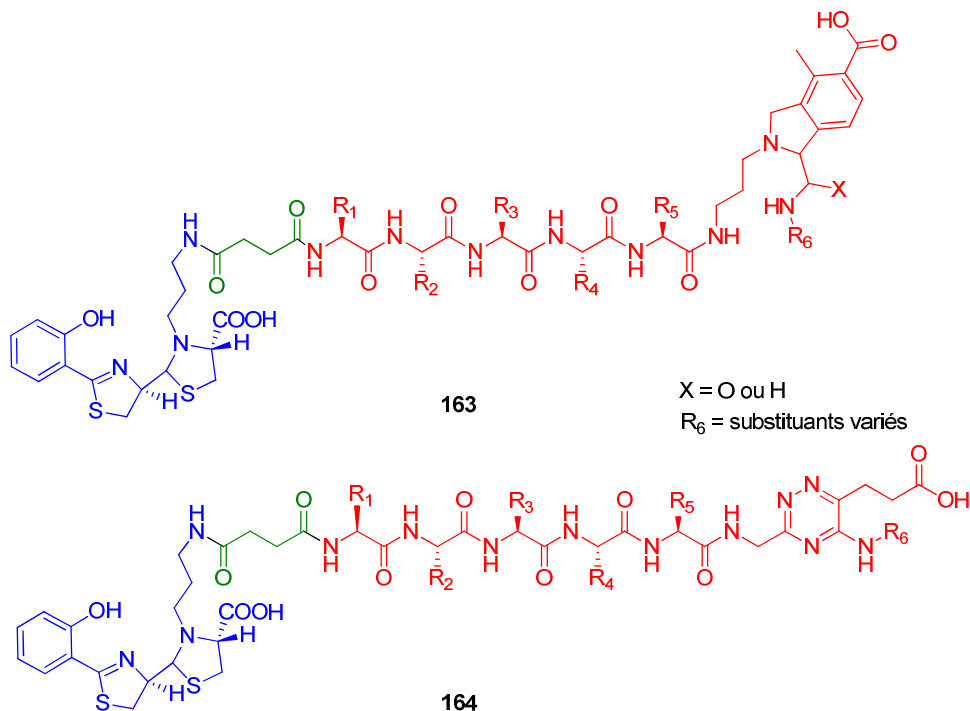


**Figure 88** : Structures des inhibiteurs potentiels de TonB de type **80** et **110**.

L'évaluation de la constante d'affinité de ces molécules pour TonB se fera par résonance plasmonique de surface. L'accès possible aux cinétiques de liaisons par cette technique est un avantage. Le profil idéal pour nos inhibiteurs serait des composés très affins pour TonB qui formeraient une liaison stable avec la protéine cible. Nous pourrions également contrôler grâce à des tests de compétition si nos composés inhibent l'interaction TonB-TME, ou si, au contraire, ils la stabilisent. En effet, la stabilisation de l'interaction TonB-TME pourrait également avoir un effet biologique tout à fait intéressant. Les propriétés antibactériennes de nos composés seront ensuite évaluées *in cellulo* en mesurant leur aptitude à inhiber la croissance de *P. aeruginosa* par la mesure des CMI, puis l'inhibition spécifique de TonB sera mise en évidence par des expériences de transport du fer radioactif ( $^{55}\text{Fe}$ ).

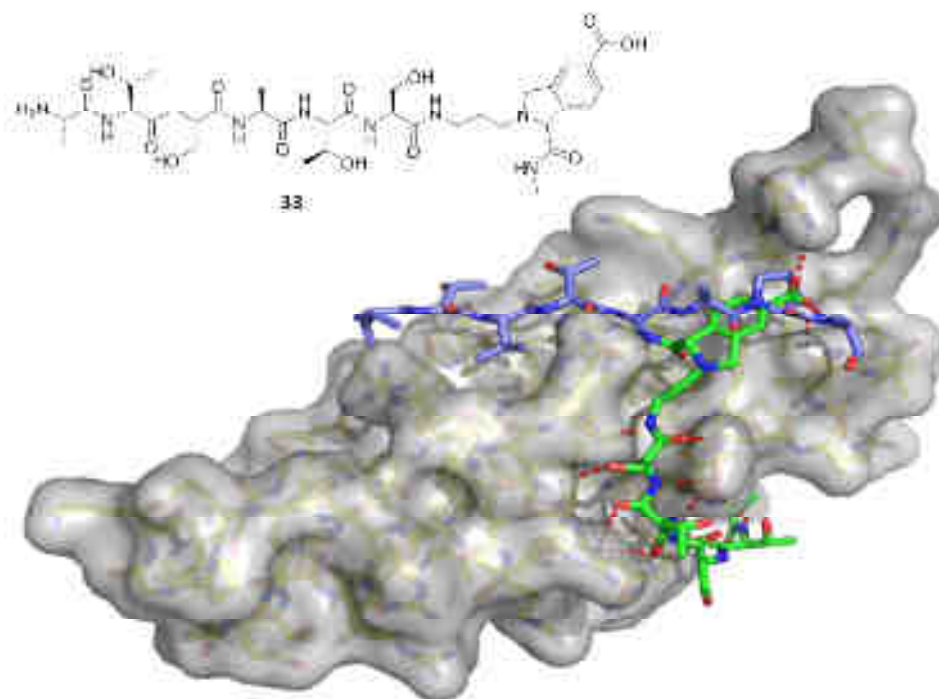
Les inhibiteurs potentiels de TonB ne présentant pas de CMI pourront être vectorisés en utilisant la voie de transport du fer pyochéline-dépendante, afin d'en faire des bactériostatiques dirigés contre *P. aeruginosa*. L'approche synthétique développée pour la production de conjugués entre la pyochéline et le linézolide dans le cadre de la stratégie du cheval de Troie pourra être appliquée aux inhibiteurs potentiels **80** et **110** de TonB. Ils

pourront être connectés à un bras espaceur succinique *via* la fonction amine terminale de la chaîne peptidique, afin d'être couplés à la pyochéline et d'obtenir les conjugués pyochélines-inhibiteurs de TonB **163** et **164** (Figure 89).



**Figure 89** : Structures des inhibiteurs potentiels de TonB conjugués à la pyochéline **163** et **164**. La pyochéline fonctionnalisée est représentée en bleu, le bras espaceur en vert et les inhibiteurs potentiels de TonB en rouge.

Nous pourrions également synthétiser une nouvelle série d'inhibiteurs. Cette série a émergé grâce à un résultat inattendu obtenu lors d'un essai d'amarrage flexible de la molécule **33** avec DOCK6. L'algorithme "*Anchor and grow*" utilisé permet d'identifier la plus grande sous-structure rigide du ligand (ici, le cycle isoindole) puis de l'ancrer sur la protéine. Le ligand est ensuite reconstruit à partir de cette position en autorisant la rotation des liaisons prédéfinies comme étant flexibles. Cette méthode donne la possibilité au ligand de se réarranger structuralement en fonction du récepteur. Le résultat obtenu par cette méthode s'est révélé surprenant (Figure 90). En effet, l'hétérocycle ne s'est pas positionné tout à fait là où nous l'attendions : la fonction amide qui substitue l'isoindole se trouve dans la poche d'interaction du résidu Ala13 de la boîte TonB de FhuA. La chaîne peptidique se retrouve quant à elle dans un autre sillon de la protéine TonB. Ce sillon n'avait jusqu'alors jamais été décrit dans la littérature.



**Figure 90** : Résultat de l'amarrage flexible de l'inhibiteur **33** (en vert) sur la protéine TonB d'*E. coli* (surface grise) réalisé avec DOCK6, en comparaison de la position de la boîte TonB de FhuA (en bleu). Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés rouge.

Il a été montré que, outre les transporteurs de membrane externe, la partie périplasmique de TonB est capable d'interagir avec d'autres protéines périplasmiques, telles que les protéines FhuD, BtuF, Lpp ou OmpA.<sup>184, 419-421</sup> Les rôles exacts de ces interactions n'est pas connu, mais il est probable qu'elles contribuent aux processus de transport ou de recyclage de la protéine TonB. Des études plus poussées, impliquant les biologistes de l'équipe, devraient permettre de vérifier quel est le rôle biologique de ce sillon et si cette zone est impliquée dans des interactions cruciales avec d'autres partenaires protéiques. Ce résultat nous a permis de définir une deuxième catégorie d'inhibiteurs potentiels. En effet, il est à noter que le groupement méthylamide, porté par l'isoindole, est orienté vers le site de liaison de TonB avec ses transporteurs. Il est alors possible d'imaginer un prolongement de ce méthylamide par une autre chaîne peptidique, ce qui conduirait à un inhibiteur de type **165**. D'autres structures **166** et **167** de type *gemini* plus ou moins flexibles pourraient également remplir cette fonction et permettre d'étudier l'influence de l'hétérocycle (Figure 91). Dans ce cas, c'est le second peptide qui pourrait servir d'ancre moléculaire au premier.



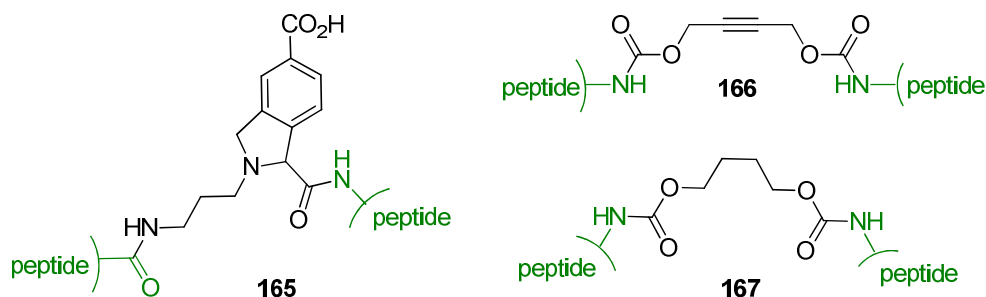


Figure 91 : Structures des inhibiteurs de type **165**, **166** et **167**.

Les inhibiteurs de type **165** dérivés de l'isoindole seront synthétisés à partir de l'intermédiaire **168** (Schéma 37). Dans un premier temps, l'acide benzoïque sera protégé sous forme d'ester benzyle, puis la fonction ester sera saponifiée pour donner l'acide carboxylique **169** correspondant. Celui-ci sera activé sous forme d'ester de pentafluorophénol comme décrit précédemment avant d'être couplé au peptide de notre choix. L'ensemble des groupements protecteurs sera ensuite clivé par hydrogénation catalytique selon la méthode mise au point lors de la synthèse peptidique pour donner l'inhibiteur potentiel **170**.

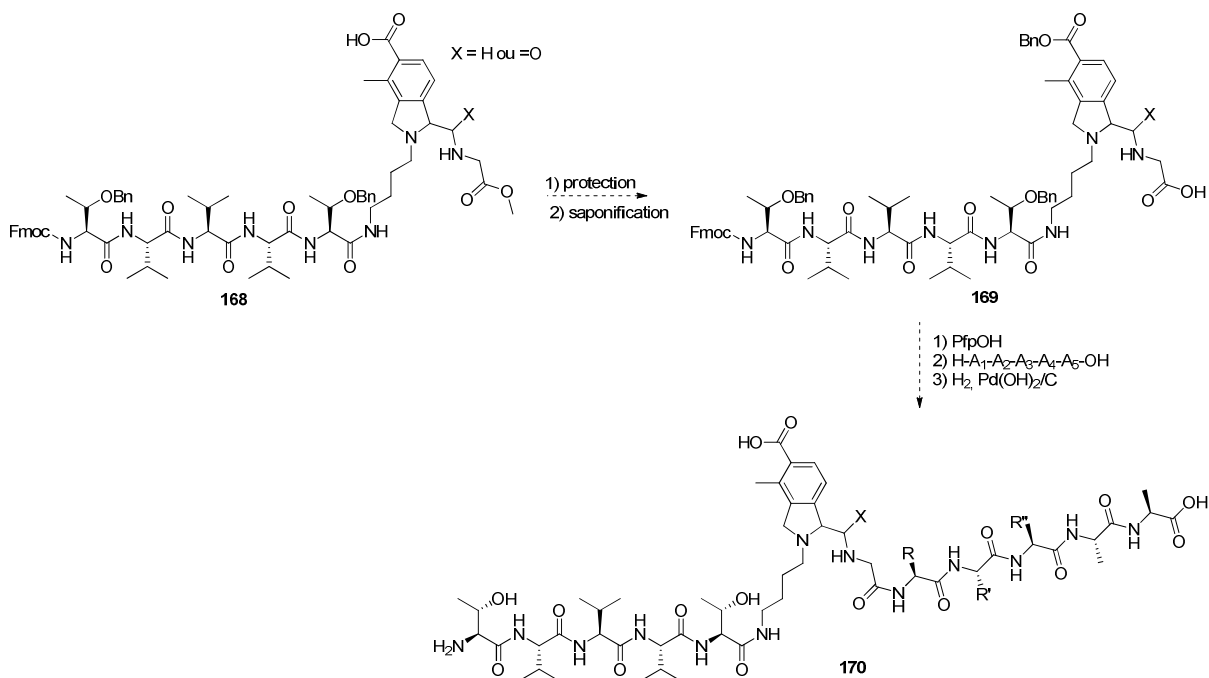


Schéma 37 : Synthèse des inhibiteurs de type **170** dérivés de l'isoindole à partir de l'intermédiaire **168**.

Afin de voir si la seconde chaîne peptidique joue le rôle d'ancre moléculaire pour la première, nous avons conçu des inhibiteurs potentiels symétriques ne comportant pas

d'hétérocycle. Les structures de molécules peptidiques symétriques à visée thérapeutique sont tout à fait inédites. Nous nous sommes inspirés pour cela d'un motif présenté comme étant un nouveau groupement protecteur pour la synthèse peptidique, le but-2-ynylbisoxycarbonyle (Bbc).<sup>422</sup> Le chloroformiate **172** correspondant est obtenu quantitativement par réaction du triphosgène sur le 1,4-dihydroxybutyne **171** en présence de pyridine (Schéma 38). Nous souhaitons ensuite coupler le BbcCl **172** avec les peptides synthétisés précédemment. Afin de mettre au point les conditions de réaction, nous avons fait réagir le BbcCl avec la (L)-alanine et la *O*-benzyl-(L)-thréonine en milieu basique. Les carbamates *gemini* **173** et **174** correspondants ont été obtenus avec d'excellents rendements, ce qui est de bon augure pour le couplage avec des chaînes plus longues et pour l'obtention d'inhibiteurs potentiels de type **175**.

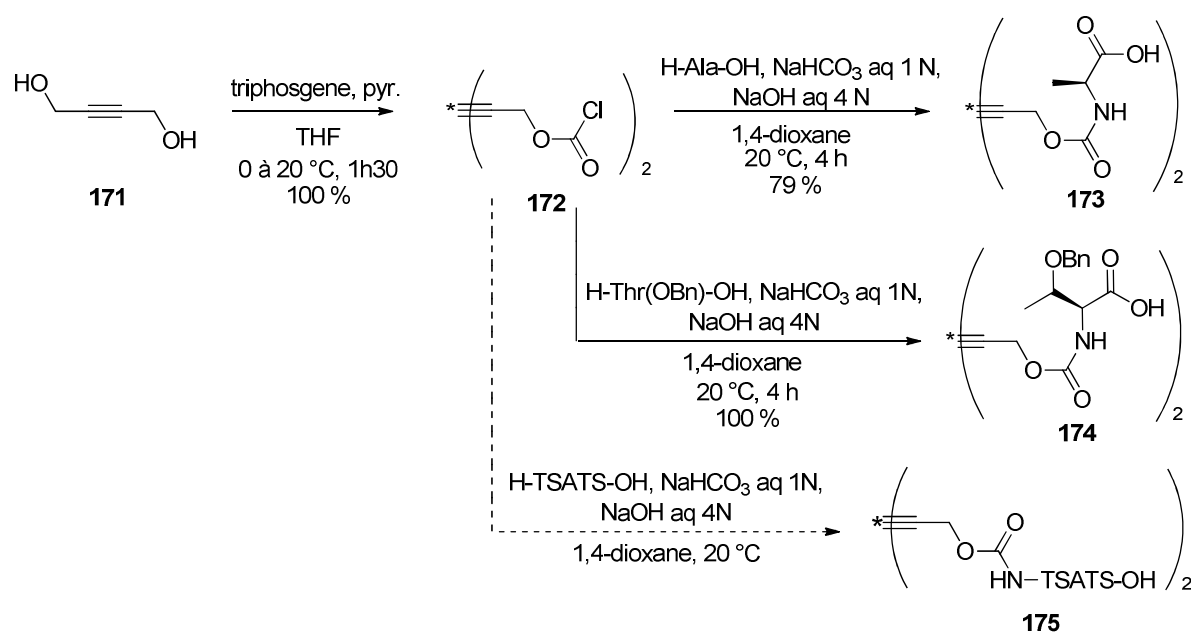
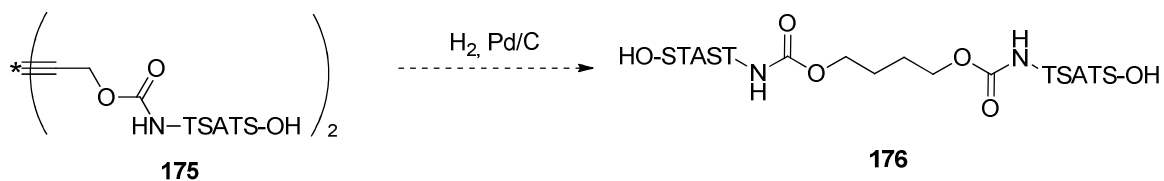


Schéma 38 : Synthèse des inhibiteurs de type *gemini* rigides de type **175**.

Le motif central de type but-2-yne est très rigide et contraint l'orientation des chaînes peptidiques. Afin d'évaluer la contribution de cette orientation fixe à l'activité des inhibiteurs potentiels, nous souhaitons synthétiser des inhibiteurs *gemini* flexibles qui pourront servir de contrôle négatif. Pour cela les inhibiteurs rigides **175** seront soumis à une hydrogénation catalytique, afin d'obtenir des composés de type **176** (Schéma 39).



**Schéma 39** : Plan de synthèse des inhibiteurs de type géminé flexibles de type **176**.

En parallèle, de nouveaux inhibiteurs pourront être conçus en exploitant les résultats de l'étude dynamique de l'interaction TonB/boîte TonB du transporteur FhuA, encore en cours en collaboration avec l'équipe d'Annick Dejaegere. Les interactions de la chaîne peptidique avec TonB pourront être améliorées en choisissant des acides aminés naturels ou non qui viendront s'insérer parfaitement dans les poches hydrophobes révélées par l'étude des points chauds de l'interaction. En effet, des composés peptidomimétiques pourraient non seulement augmenter l'affinité des composés pour TonB, mais aussi les protéger d'une dégradation éventuelle par les enzymes bactériennes ou par celles de l'hôte. Ce même travail d'optimisation pourra être réalisé afin d'améliorer la structure des ancres hétérocycliques, toujours en collaboration avec l'équipe d'Annick Dejaegere.

# **Partie expérimentale**



# I. Matériels et méthodes informatiques

## A. Caractérisation de la cavité identifiée dans TonB

**Alignements multiple de séquences.** Les séquences des protéines TonB de microorganismes variés ont été retrouvées par BlastP en prenant celle de la protéine TonB d'*E. coli* (UniprotKB ID : P02929) comme référence.<sup>267</sup> Les séquences sélectionnées ont été alignées en utilisant les paramètres par défaut de MUSCLE.<sup>268</sup> L'alignement a été corrigé et amélioré automatiquement par le programme Rascal de la suite logicielle PipeAlign,<sup>423</sup> puis manuellement avec Jalview.<sup>269</sup> Les séquences correspondant aux domaines C-terminaux ont été isolées puis soumises à nouveau à MUSCLE, Rascal et Jalview. La prédiction de la structure secondaire a été réalisée par Jalview à partir de la séquence consensus issue de l'alignement multiple.<sup>424, 425</sup>

**Etude dynamique de la protéine TonB de *P. aeruginosa*.** La structure tridimensionnelle de la partie périplasmique de TonB de *P. aeruginosa* (Swiss-Prot ID : Q51368) a été reconstruite par homologie à celle d'*E. coli* (PDB ID : 2GSK). Le modèle a été réalisé avec Modeller, puis sa qualité a été contrôlée par le serveur en ligne Verify3D.<sup>270, 271</sup> Les extrémités N- et C-terminales de la protéine ont été respectivement masquées par des groupements acétyle (ACE) et N-méthylamide (NME). L'énergie du modèle a été minimisée avec CHARMM.<sup>426</sup> La phase de minimisation a été réalisée tout d'abord sur le solvant, puis sur le système complet. Les simulations moléculaires dynamiques et l'analyse de trajectoires ont été réalisées avec AMBER8 et VMD. Deux molécules d'eau ont été insérées "manuellement" dans la cavité détectée dans TonB afin de forcer son ouverture. Les paramètres physiques et le RMSD ont été relevés après chaque course par *ptraj analysis*. Les simulations ont été réalisées sur 1 ns. Les coordonnées atomiques et l'énergie du système ont été relevées toutes les 10 ps. 100 clichés ont ainsi été analysés pour chaque trajectoire.

## B. Etude moléculaire dynamique de l'interaction TonB-FhuA

**Structures.** La structure cristallographique de TonB en complexe avec FhuA, le transporteur de membrane externe du ferrichrome chez *E. coli*, a été obtenue depuis la *Protein Data Bank* (code PDB : 2GSK).<sup>427</sup> De cette structure ont été extraites le domaine C-terminal de TonB (chaîne B) et la boîte TonB du transporteur FhuA (résidus 8-16 de la chaîne A) : TITVTAAPA.

**Simulations moléculaires dynamiques.** Les simulations moléculaires dynamiques ont été réalisées avec CHARMM.<sup>426</sup> Les atomes d'hydrogènes ont été ajoutés à la structure cristallographique avec le module HBUILD.<sup>428</sup> Les résidus terminaux de la protéines et le résidu N-terminal du peptide sont à l'état chargé ( $\text{NH}_3^+$  et  $\text{COO}^-$ ). Le résidu C-terminal du peptide est masqué avec un groupement NME. L'énergie du complexe a été minimisée, puis le complexe a été solvaté dans le modèle de milieu aqueux TIP3P.<sup>429</sup> La phase de minimisation a été réalisée tout d'abord sur le solvant, puis sur le système complet. Les simulations moléculaires dynamiques ont été réalisées à 300 K sur 9 ns, avec un pas de 1 fs, afin de générer de multiples conformations à partir de la structure expérimentale.

**Analyse MM/PBSA.** Les structures sont extraites des simulations moléculaires dynamiques afin de décomposer l'énergie libre selon l'analyse MM/PBSA.<sup>283</sup> La composante électrostatique est calculée grâce au programme Brownian Dynamics de l'Université de Houston.<sup>430</sup> Les charges et rayons atomiques utilisés pour la protéine sont ceux du champ de force de CHARMM.<sup>431</sup> L'énergie libre totale et les composantes individuelles ont été moyennées et pondérées selon la taille des groupes de populations. De même, la contribution de chaque acide aminé à la déviation standard a été calculée en prenant en compte le poids d'échantillonnage de la conformation.

## C. Amarrage moléculaire

**Amarrage moléculaire de l'inhibiteur potentiel 33.** Les structures de TonB en complexe avec la boîte TonB du transporteur FhuA ont été obtenues comme décrit précédemment. Les amarrages moléculaires ont été réalisés avec DOCK6.<sup>432</sup> Les structures

de TonB et des ligands ont été préparés avec Chimera, les charges ont été calculées avec la suite logicielle AmberTools.<sup>272, 287</sup> Les hydrogènes sont ajoutés, puis la forme du site de liaison est repérée par des sphères avec le module *sphgen*. Une grille de score de 32 Å est définie autour de TonB. Les paramètres d'amarrage ont été mis au point en utilisant la boîte TonB de FhuA comme ligand (score de référence : -45,0). Des contraintes sont ajoutées aux paramètres recommandés pour éviter les clashes stériques. La minimisation des structures est réalisée avant chaque calcul. 15 conformères sont calculés pour chaque essai d'amarrage, les 3 meilleurs sont affinés avec Amber. L'amarrage rigide de la molécule **33** est exécuté avec l'algorithme *Rigid* (score -18,7 pour la structure de la Figure 53), et l'amarrage flexible est exécuté avec *Anchor an grow* (score : -83,6 pour la structure de la Figure 90).

## II. Protocoles de synthèses et données analytiques et spectrales

Tous les solvants de réactions proviennent de source commerciale et ont été utilisés avec une pureté supérieure à 99,8 %. L'ensemble des réactifs ont été fournis par Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka et Alfa-Aesar et ont été utilisés sans modification. Les réactions ont été suivies par Chromatographie sur Couche Mince sur plaques d'aluminium Merck SilicaGel 60 F<sub>254</sub> (0,25 mm). Les plaques CCM sont révélées sous UV, par une solution de KMnO<sub>4</sub>, par une solution de ninhydrine, ou par des vapeurs d'iode. Les produits obtenus ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice naturelle ou démétallée Merck Kieselgel 60 (63-200 µm). Les chromatogrammes des peptides ont été obtenus sur une colonne ChiralCell OD-H 250 x 4,6 mm, sur une CLHP analytique Gilson. Les échantillons ont été dissous dans du méthanol avec 5 % de TFA, et ont été élués en mode isochratique par un mélange *n*-heptane/isopropanol 1/1. Les conditions de séparations ont été déterminées sur un mélange racémique de *N*-Fmoc-*O*-benzylsérine, synthétisée à partir de (±)*O*-benzylsérine commerciale. Les chromatogrammes ont été traités avec le logiciel TRILUTION LC. Les spectres RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et <sup>19</sup>F ont été effectués dans le chloroforme, l'acétone, l'eau ou le DMSO deutérés sur un Bruker Avance 400 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm, en utilisant les solvants deutérés comme référence interne. La multiplicité des signaux sera indiquée par s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet, q pour quadruplet, quint



pour quintuplet, et m pour massif. Les signaux larges seront indiquées par un "l" après la multiplicité du signal. Lorsqu'il y aura une ambiguïté sur l'attribution du signal, les protons ou carbones concernés seront écrits en italique. Les spectres de masse basse résolution et haute résolution ont été effectués au Service Commun d'Analyse (SCA) de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg par la technique de l'électrospray ESI. Les spectres de masse basse résolution sont enregistrés sur un appareil Bruker Daltonic MicroTOF et ceux de haute résolution sur un appareil QToF.

## A. Procédures générales

### Procédure générale 1 : clivage du groupement Fmoc

#### Procédure 1.a : avec de la TAEA<sup>297</sup>

La TAEA (10 eq) est ajoutée à un mélange d'acide aminé *N*-Fmoc (1,0 eq) dans du dichlorométhane (0,1 M). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à ce que tout l'acide aminé de départ ait été consommé (suivi CCM). Le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse saturée de NaCl (3 x) et de tampon phosphate pH 5,5 (3 x). La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée sous pression réduite.

#### Procédure 1.b : avec de la pipéridine

Une solution d'acide aminé *N*-Fmoc (1,0 eq) dans de la pipéridine (0,05 M) est agité à température ambiante jusqu'à ce que tout l'acide aminé de départ ait été consommé (suivi CCM). Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau glacée. Le précipité blanc de DBF-pipéridine est éliminé par filtration sur fritté. Le filtrat est extrait avec de l'éther diéthylique (4 x) puis évaporé sous pression réduite.

#### Procédure 1.c : avec de la 4-AMP

La 4-AMP (10 eq) est ajoutée goutte à goutte à un mélange d'acide aminé *N*-Fmoc (1,0 eq) dans du dichlorométhane (0,05 M). Le mélange réactionnel est agitée à température ambiante jusqu'à ce que tout l'acide aminé de départ ait été consommé (suivi CCM). Le milieu réactionnel dilué avec du dichlorométhane, lavé avec de l'eau (2 x) puis une solution

de tampon phosphate pH 5,5 (2 x). La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée sous pression réduite.

## **Procédure générale 2 : couplage peptidique**

### Procédure 2.a : avec du HBTU

À une solution d'acide aminé Fmoc-AA<sub>n+1</sub>-OH (1,0 eq) dans le DMF (0,1 M) sont ajoutés successivement le HBTU (2,0 eq) et le HOBT (1,0 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h à température ambiante sous atmosphère d'argon. Un mélange d'acide aminé H-AA<sub>n</sub>-OtBu (1,2 eq) dans le DMF (0,1 M) et la DIPEA (3,0 eq) sont ajoutés successivement, puis la solution est agitée à température ambiante pendant 12 h. Le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau puis extrait avec de l'éther diéthylique (2 x). Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution aqueuse d'HCl 0,5 N, une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> puis une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées puis évaporées sous pression réduite.

### Procédure 2.b : avec de l'EDCI

À un mélange d'acide aminé Fmoc-AA<sub>n+1</sub>-OH (1,0 eq) dans du dichlorométhane (0,1 M) sont ajoutés successivement l'EDCI (1,2 eq), le HOBT (1,2 eq) et le DMAP (0,2 eq). Le mélange est agité pendant 30 min à température ambiante sous atmosphère d'argon. Un mélange d'acide aminé H-AA<sub>n</sub>-OtBu (1,2 eq) dans du dichlorométhane (0,1 M) est ajouté, puis le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 h. Le milieu réactionnel est dilué avec du dichlorométhane, lavé avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtré puis évaporé sous pression réduite.

### Procédure 2.c : en passant par l'ester de pentafluorophénol

À un mélange de *N*-Fmoc-AA<sub>n</sub>-OH (1,0 eq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,5 M) sont ajoutés l'EDCI (1,5 eq) et le pentafluorophénol (1,5 eq). Le mélange est agité à température ambiante sous atmosphère d'argon jusqu'à ce que le réactif de départ ait été entièrement consommé (suivi par CCM). Le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse d'HCl 0,5 N puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée puis adsorbée sur gel de silice (10 x la masse d'acide aminé) pour être éluée rapidement à travers un lit de célite et de silice avec un mélange de cyclohexane/AcOEt 1/2 (élution suivie par CCM). Le filtrat est concentré sous

vide pour donner l'ester de pentafluorophénol utilisé tel quel dans la réaction suivante. Une solution d'ester de pentafluorophénol (1,0 eq) dans du THF (0,5 M) et la DIPEA (2,0 eq) sont ajoutées successivement à une solution aqueuse (1,0 M) de H-AA<sub>n+1</sub>-OH (2,0 eq). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à la fin de la réaction. Le THF est évaporé sous pression réduite, le résidu est repris dans de l'eau, puis acidifié à pH 3,0 avec une solution aqueuse d'acide citrique 0,5 M. Le précipité blanc obtenu est filtré sur fritté, rincé avec de l'eau, puis séché sous pression réduite. Dans le cas où le précipité est trop fin, la suspension est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x). Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées sous pression réduite. Les peptides sont obtenus sous la forme de solides blanc après trituration avec de l'éther diéthylique.

**Procédure générale 3 : formation de l'hydrazide.** Une solution aqueuse d'hydrazine à 51 % (3,2 eq) est ajoutée à une solution d'ester méthylique (1,0 eq) dans du méthanol (0,02 M). Le mélange est agité à température ambiante pendant 12 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. L'eau résiduelle est éliminée par distillation azéotropique avec de l'éthanol.

**Procédure générale 4 : réaction de Ugi.** Un mélange d'aldéhyde (1,0 eq), d'acide (1,0 eq), d'amine (1,0 eq) et d'isocyanate (1,0 eq) dans du méthanol est agité à température ambiante pendant 3 jours puis le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite.

**Procédure générale 5 : IMDAF.** Le triflate d'ytterbium(III) (0,5 eq) est ajouté à une solution d'adduit de Ugi (1,0 eq) dans du 1,4-dioxane (0,2 M) placée sous flux d'argon. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 48 h avant d'être filtré puis évaporé sous vide.

**Procédure générale 6 : substitution nucléophile aromatique.** Le composé nucléophile (2,0 eq) est dissous dans de l'acétonitrile (0,4 M). La solution est chauffée à 70 °C avant d'ajouter goutte à goutte, en 15 min, une solution de 3,4-difluoronitrobenzène (1,0 eq) dans de l'acétonitrile (0,2 M). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 1 h avant d'être évaporé sous pression réduite.

**Procédure générale 7 : réduction de la fonction nitro et protection de l'amine avec un groupement Cbz.** À une solution de composé nitré (1,0 eq) dans du THF (0,1 M) est ajouté du méthanol (4 x V<sub>THF</sub>). Le mélange est refroidi à 0 °C par un bain de glace avant d'ajouter

une solution aqueuse saturée de  $\text{CuSO}_4$  ( $0,5 \times V_{\text{THF}}$ ). La solution est agitée vigoureusement puis le borohydrure de sodium (7,0 eq) fraîchement broyé à l'aide d'un mortier est ajouté par portions. La suspension noire est ramenée à température ambiante et est agitée pendant 1 h à température ambiante avant d'être filtrée sur Buchner. Le filtrat est dilué avec de l'eau et extrait avec du dichlorométhane (3 x). Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrées et évaporées sous pression réduite pour donner l'amine intermédiaire. Celle-ci est dissoute dans du dichlorométhane (0,01 M) et placée sous atmosphère d'argon. De la DIPEA (3,0 eq) et du chloroformiate de benzyle (1,1 eq) sont ajoutés successivement au mélange. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante, sous atmosphère d'argon, pendant 12 h. Le mélange réactionnel est lavé avec une solution aqueuse de HCl 0,5 N, de l'eau, puis une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée, et évaporée sous pression réduite.

**Procédure générale 8 : formation de l'oxazolidinone.** Un mélange de benzyloxycarbonylamine (1,0 eq) dans du THF anhydre (1 M) est placé dans un tricol flambé sous argon. Le mélange est refroidi à  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  avant d'être traité avec du *n*-BuLi 2,2 M dans du cyclohexane (1,1 eq). Le mélange est agité 30 min en laissant remonter la température jusqu'à  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ . Le milieu réactionnel est refroidi à  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ , le *R*-glycidyl butyrate (1,0 eq) est ajouté goutte à goutte puis le mélange est agité à température ambiante pendant 12 h. Le milieu réactionnel est quenché par ajout d'une solution aqueuse saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La phase aqueuse est séparée puis extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x). La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée puis adsorbée sur silice afin d'être purifiée par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt, 1/1 -> 1/2).

**Procédure générale 9 : formation du mésylate.** À un mélange d'alcool (1,0 eq) dans du dichlorométhane (1 M) refroidi à  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , est ajouté le chlorure de mésyle (1,5 eq) goutte à goutte. Le mélange est refroidi à  $0\text{ }^\circ\text{C}$  puis la triéthylamine (1,5 eq) est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  puis une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est isolée, séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée et évaporée sous pression réduite.

**Procédure générale 10 : formation de l'azoture.** L'azoture de sodium (2,0 eq) est ajouté à une solution de mésylate (1,0 eq) dans du DMF (0,1 M) placée sous atmosphère d'argon. La solution est chauffée à 65 °C jusqu'à ce que le mésylate soit entièrement consommé (suivi par CCM). Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau, puis est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x). Les phases organiques sont combinées, lavées avec de l'eau (3 x) et une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, et évaporées sous pression réduite.

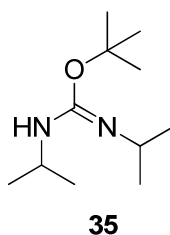
**Procédure générale 11 : réduction de l'azoture et acétylation.** La triphénylphosphine supportée (1,5 eq) et l'eau (0,5 V<sub>THF</sub>) sont ajoutées à une solution d'azoture (1,0 eq) dans du THF (0,1 M). La solution est agitée pendant 1 h à 55 °C. Le milieu réactionnel est filtré sur fritté. La résine est rincée avec de l'acétate d'éthyle. Le filtrat est séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtré puis évaporé sous pression réduite. L'amine ainsi formée est directement dissoute dans du dichlorométhane (0,1 M). La pyridine anhydre (10 eq) et l'anhydride acétique (5,0 eq) sont ajoutés à cette solution. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 h, avant d'être dilué dans du dichlorométhane et lavé avec une solution aqueuse d'HCl 0,5 N puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée sous pression réduite.

**Procédure générale 12 : protection de fonctions amine avec le BbcCl.** L'acide aminé (2,0 eq) est dissous dans un mélange de NaHCO<sub>3</sub> aq 1 N (0,2 M) et de NaOH<sub>aq</sub> 4 N (6 M). La solution est refroidie à 0 °C par un bain de glace avant d'ajouter goutte à goutte un mélange de BbcCl **172** (1,0 eq) dans du 1,4-dioxane (0,3 M). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à ce que la réaction soit complète, puis est dilué avec de l'eau et acidifié à pH 2,0 avec une solution aqueuse d'HCl 1 N. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x). Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution aqueuse d'HCl 0,5 N, de l'eau puis une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite.

## B. Protocoles de synthèse et caractérisation des produits

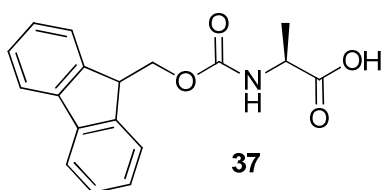
**N,N'-diisopropyl-O-tert-butylisourée 35.**<sup>294</sup> Le 1,3-diisopropylcarbodiimide (10,0 g, 78,4 mmol, 1,0 eq), le *tert*-butanol anhydre (9,10 mL, 94,1 mmol, 1,2 eq) et le chlorure de

cuivre(I) (0,08 g, 0,78 mmol,  $1,10^{-3}$  eq) sont introduits dans un ballon bicol séché à l'étuve, sous atmosphère d'argon. La suspension est agitée à 20 °C pendant 6 jours, le suivi de la réaction se faisant par RMN  $^1\text{H}$ . Lorsque la réaction est terminée, la *N,N'*-diisopropyl-*O*-*tert*-butylisourée **35** est distillée sous vide (30 Pa,  $T_{\text{eb}}$  84 °C) pour fournir un liquide incolore (10,4 g, 51,8 mmol, rdt 66 %, mélange d'isomères *cis* et *trans*).



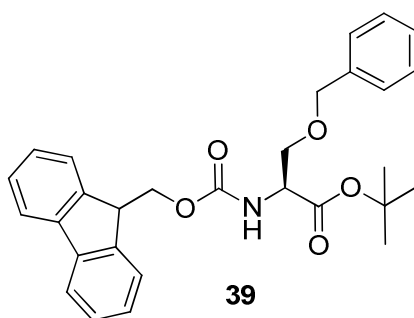
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,70 et 3,62 (sept<sub>cis</sub>, sept<sub>trans</sub>, 1H,  $J = 6,3, 6,5$  Hz, CHNH), 3,10 (sept, 1H,  $J = 6,2$  Hz, CH), 1,44 et 1,34 ( $s_{\text{cis}}$ ,  $s_{\text{trans}}$ , 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1,05 (d, 6H,  $J = 6,4$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2$ ), 1,01 (d, 6H,  $J = 6,2$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149,8 et 148,4 (C=N), 78,4 et 77,4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 49,1 et 46,4 (CH), 43,6 (CH), 29,2 et 28,6 ( $(\text{CH}_3)_3$ ), 24,5 ( $(\text{CH}_3)_2$ ), 24,0 ( $(\text{CH}_3)_2$ ).

***N*-Fmoc-(L)-alanine 37.** Une suspension de (L)-alanine (550 mg, 5,00 mmol, 1,0 eq) dans un mélange de 1,4-dioxane (10 mL) et de  $\text{Na}_2\text{CO}_{3\text{aq}}$  1 M (13,5 mL) est refroidie à 0 °C par un bain de glace. Une solution de chloroformiate de 9-fluorénylméthylcarbonyle (1,32 g, 5,00 mmol, 1,0 eq) dans du 1,4-dioxane (10 mL) est ensuite ajoutée goutte à goutte. La suspension blanche est agitée à 0 °C pendant 1h30, puis à 20 °C pendant 3 h. Le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau (100 mL), puis extrait avec de l'éther diéthylique (60 mL). La phase aqueuse est isolée, acidifiée à pH 2,0 avec une solution d'HCl 1 N, et extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 60 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrées puis évaporées sous pression réduite pour donner une huile incolore qui cristallise dans du *n*-heptane. La *N*-Fmoc-(L)-alanine **37** est obtenue sous la forme d'un solide blanc (1,52 g, 4,90 mmol, rdt 98 %).



Rf 0,17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9/1). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 7,85 (d, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,71 (dd, 2H, J = 4,4, 7,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,40 (t, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,32 (td, 2H, J = 1,2, 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,75 (d, 1H, J = 7,2 Hz, NH), 4,37-4,21 (m, 4H), 1,42 (d, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 174,4 (C=O), 156,8 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 145,1, 142,1, 128,5, 127,9, 126,1, 120,9, 67,6 (CH<sub>Ala</sub>), 50,2 (CH<sub>2 Fmoc</sub>), 48,1 (CH<sub>Fmoc</sub>), 18,1 (CH<sub>3</sub>).

**Ester *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(*L*)-sérine-*tert*-butylique 39.** La *N,N'*-diisopropyl-*O-tert*-butylisourée **35** (800 mg, 4,00 mmol, 4,0 eq) est ajoutée goutte à goutte à un mélange de *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(*L*)-sérine (426 mg, 1,00 mmol, 1,0 eq) et de DMAP (12,0 mg, 0,10 mmol, 0,1 eq) dans du THF anhydre (5,0 mL). Le mélange est chauffée à 60 °C pendant 12 h. La suspension blanche revient naturellement à température ambiante avant d'être filtrée sur fritté. Le solide est lavé avec du THF. Le filtrat est adsorbé sur silice, puis purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt, 98/2 -> 80/20) pour fournir l'ester *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(*L*)-sérine-*tert*-butylique **39** sous la forme d'un solide blanc (470 mg, 0,99 mmol, rdt 99 %).

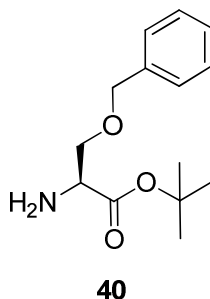


Rf 0,70 (cyclohexane/AcOEt, 2/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,74 (d, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,60 (dd, 2H, J = 4,4, 7,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,38 (t, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,34-7,27 (m, 7H, CH<sub>ar</sub>), 5,66 (d, 1H, J = 7,2 Hz, NH<sub>Ser</sub>), 4,57 (d, 1H, J = 14 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 4,48 (d, 1H, J = 14 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 4,40-4,31 (m, 3H, CH<sub>2 Fmoc</sub> et CH<sub>Ser</sub>), 4,22 (t, 1H, J = 7,2 Hz, CH<sub>Fmoc</sub>), 3,87 (dd, 1H, J = 3,2, 9,6 Hz, CH<sub>2 Ser</sub>), 3,68 (dd, 1H, J = 3,2, 9,6 Hz, CH<sub>2 Ser</sub>), 1,44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 169,5 (C=O), 156,2 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 144,1, 144,0, 141,5, 137,8, 128,6, 128,0, 127,9, 127,3, 125,4, 120,1, 82,5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 73,6 (CH<sub>2 Bn</sub>), 70,4 (CH<sub>2 Ser</sub>), 67,3 (CH<sub>2 Fmoc</sub>), 55,1 (CH<sub>Ser</sub>), 47,4 (CH<sub>Fmoc</sub>), 27,1 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

**Ester *O*-benzyl-(*L*)-sérine-*tert*-butylique 40.** L'amine **40** est synthétisée en suivant la procédure générale 1.a, à partir de l'ester *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(*L*)-sérine-*tert*-butylique **39** (475 mg, 1,00 mmol). L'huile jaune pâle obtenue est adsorbée sur silice puis purifiée par

chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt, 75/25 puis 50/50) pour fournir l'amine **40** sous la forme d'une huile incolore (184 mg, 0,73 mmol, rdt 73 %).

L'amine **40** a été également synthétisée en suivant la procédure générale 1.b, à partir de l'ester *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(L)-sérine-*tert*-butylique **39** (1,51 g, 3,19 mmol). L'huile jaune pâle (694 mg, 2,77 mmol, rdt 87 %) obtenue est engagée directement dans la réaction suivante.

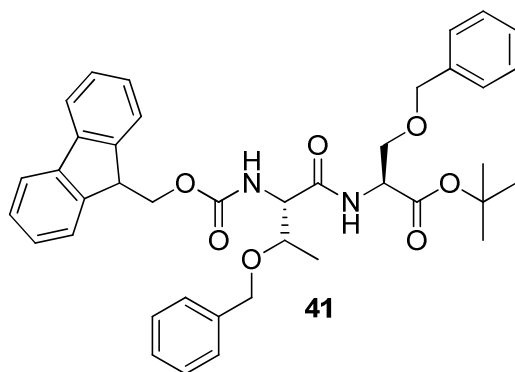


Rf 0,50 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,33-7,25 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>), 4,54 (d, 1H, J = 12 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 4,48 (d, 1H, J = 12 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 3,68 (dd, 1H, J = 5,2, 9,2 Hz, CH<sub>2</sub>Ser), 3,64 (dd, 1H, J = 4,0, 9,2 Hz, CH<sub>2</sub>Ser), 3,49 (dd, 1H, J = 4,0, 5,2 Hz, CH<sub>Ser</sub>), 1,42 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,0 (C=O), 138,0, 128,3, 127,7, 127,6, 81,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 73,3 (CH<sub>2</sub>Bn), 72,3 (CH<sub>2</sub>Ser), 55,4 (CH<sub>Ser</sub>), 28,0 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. SM *m/z* 252,3 [M+H]<sup>+</sup>.

***N*-Fmoc-Thr(*OBn*)-Ser(*OBn*)-*OT*Bu **41****. Le dipeptide **41** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.a, à partir de l'amine **40** (60,3 mg, 0,24 mmol) et de la *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(L)-thréonine (88,0 mg, 0,20 mmol). L'huile jaune obtenue est adsorbée sur silice puis purifiée par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt, 98/2 puis 90/10) pour fournir le dipeptide **41** sous la forme d'un solide blanc (124 mg, 0,19 mmol, rdt 93 %).

Le dipeptide **41** a également été synthétisé en suivant la procédure générale 2.b, à partir de l'amine **40** (32,0 mg, 0,11 mmol) et de la *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(L)-thréonine (41,0 mg, 0,09 mmol). Le solide beige obtenu est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt, 98/2 puis 90/10) pour fournir le dipeptide **41** sous la forme d'un solide blanc (50 mg, 75,6 μmol, rdt 84 %).

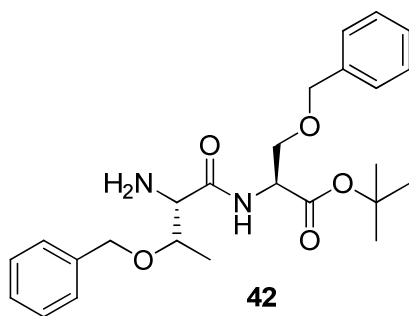




Rf 0,55 (cyclohexane/AcOEt, 2/1). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,73 (d, 2H,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7,58 (dd, 2H,  $J = 2,8, 7,2$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7,45 (d<sub>l</sub>, 1H,  $J = 7,6$  Hz, NH), 7,39-7,18 (m, 14H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 5,81 (d<sub>l</sub>, 1H,  $J = 7,2$  Hz, NH), 4,66-4,57 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{Bz}$  et  $\text{CH}_{\text{Thr}}$ ), 4,46-4,34 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{Bz}$ ,  $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$  et  $\text{CH}_{\text{Ser}}$ ), 4,21 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 4,13 (qd<sub>l</sub>, 1H,  $J = 2,8, 6,0$  Hz,  $\text{OCH}_{\text{Thr}}$ ), 3,83 (dd, 1H,  $J = 3,2, 9,6$  Hz,  $\text{CH}_2_{\text{Ser}}$ ), 3,58 (dd, 1H,  $J = 3,2, 9,6$  Hz,  $\text{CH}_2_{\text{Ser}}$ ), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1,21 (d, 3H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3_{\text{Thr}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169,4 (C=O), 168,8 (C=O), 156,4 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 144,1, 141,5, 138,2, 136,4, 128,6, 128,0, 127,9, 127,8, 127,3, 125,3, 120,2, 82,5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 74,5 (OCH<sub>Thr</sub>), 73,4 (CH<sub>2</sub><sub>Bn</sub>), 71,7 (CH<sub>2</sub><sub>Bn</sub>), 70,1 (CH<sub>2</sub><sub>Ser</sub>), 67,3 (CH<sub>2</sub><sub>Fmoc</sub>), 57,8 (CH<sub>Ser</sub>), 53,4 (CH<sub>Thr</sub>), 47,4 (CH<sub>Fmoc</sub>), 28,2 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 15,2 (CH<sub>3</sub>). SM  $m/z$  665,3 [M+H]<sup>+</sup>, 687,3 [M+Na]<sup>+</sup>.

**H-Thr(OBn)-Ser(OBn)-OtBu 42.** L'amine **42** est synthétisée en suivant la procédure générale 1.a, à partir du dipeptide **41** (1,55 g, 2,33 mmol). Le solide jaune pâle obtenu (876 mg, 1,98 mmol, rdt 85 %) est utilisé directement dans la réaction suivante.

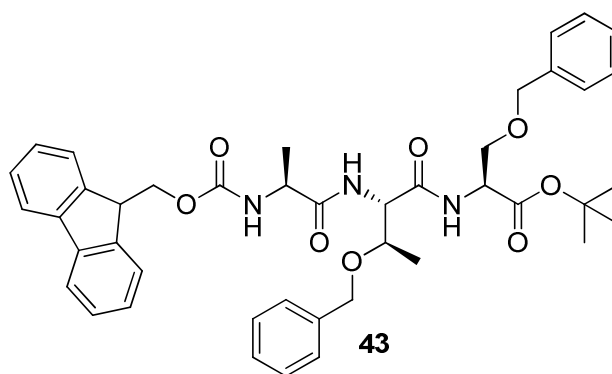
L'amine **42** a été également synthétisée en suivant la procédure générale 1.b, à partir du dipeptide **41** (374 mg, 0,56 mmol). Le solide jaune pâle obtenu (200 mg, 0,45 mmol, rdt 81 %) est utilisé directement dans la réaction suivante.



Rf 0,70 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,29 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,34-7,20 (m, 10H, CH<sub>ar</sub>), 4,62 (dt, 1H, J = 3,2, 8,4 Hz, CH<sub>Thr</sub>), 4,52 (d, 1H, J = 11 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 4,46 (d, 1H, J = 12 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 4,42 (d, 1H, J = 11 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 4,34 (d, 1H, J = 12 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 4,17 (qd, 1H, J = 2,8, 6,4 Hz, OCH<sub>Thr</sub>), 3,84 (dd, 1H, J = 3,6, 9,6 Hz, CH<sub>2</sub>Ser), 3,58 (dd, 1H, J = 3,2, 9,6 Hz, CH<sub>2</sub>Ser), 3,25 (di, 1H, J = 2,0 Hz, CH<sub>Ser</sub>), 1,42 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,11 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>Thr). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 169,3 (C=O), 165,1 (C=O), 138,5, 137,8, 128,3, 127,6, 127,5, 82,1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 73,2 (OCH<sub>Thr</sub>), 71,4 (CH<sub>2</sub>Bn), 71,3 (CH<sub>2</sub>Bn), 70,3 (CH<sub>2</sub>Ser), 59,3 (CH<sub>Ser</sub>), 53,1 (CH<sub>Thr</sub>), 28,0 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 17,0 (CH<sub>3</sub>). SM *m/z* 443,3 [M+H]<sup>+</sup>.

***N*-Fmoc-Ala-Thr(OBn)-Ser(OBn)-OtBu 43.** Le tripeptide **43** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.a, à partir de l'amine **42** (1,10 g, 1,98 mmol) et de la *N*-Fmoc-(L)-alanine **37** (860 mg, 1,66 mmol). Le solide jaune obtenu est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 99/1) pour fournir le tripeptide **43** sous la forme d'un solide blanc (0,49 g, 0,66 mmol, rdt 40 %).

Le tripeptide **43** a également été synthétisé en suivant la procédure générale 2.b à partir de l'amine **42** (98,0 mg, 0,22 mmol) et de la *N*-Fmoc-(L)-alanine **37** (82,0 mg, 0,18 mmol). L'huile orange obtenue est adsorbée sur silice puis purifiée par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt, 98/2 -> 50/50) pour fournir le tripeptide **43** sous la forme d'un solide blanc (53,0 mg, 0,72 mmol, rdt 40 %).

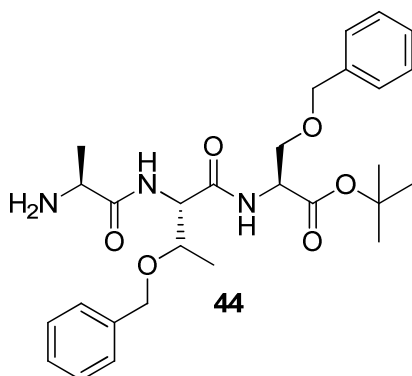


Rf 0,57 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,73 (d, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,56 (d, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,40-7,17 (m, 15H, CH<sub>ar</sub> et NH), 6,81 (di, 1H, J = 7,6 Hz, NH), 5,36 (di, 1H, J = 7,2 Hz, NH), 4,66-4,55 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Bz, CH<sub>Thr</sub> et CH<sub>Ser</sub>), 4,48-4,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Bz et CH<sub>2</sub>Fmoc), 4,25 (qi, 1H, J = 6,4 Hz, CH<sub>Ala</sub>), 4,18 (t, 1H, J = 7,2 Hz, CH<sub>Fmoc</sub>), 4,15-4,12 (m, 1H, OCH<sub>Thr</sub>), 3,63 (dd, 1H, J = 3,2, 9,6 Hz, CH<sub>2</sub>Ser), 3,57 (dd, 1H, J = 3,2, 9,6 Hz, CH<sub>2</sub>Ser), 1,41 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,18

(d, 3H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3_{\text{Thr}}$ ), 1,08 (d, 3H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3_{\text{Ala}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169,4 (C=O), 169,0 (C=O), 168,7 (C=O), 157,3 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 146,5, 143,9, 141,4, 133,1, 128,5, 127,8, 127,7, 127,2, 125,2, 120,1, 82,4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 74,3 ( $\text{OCH}_{\text{Thr}}$ ), 73,4 ( $\text{CH}_2_{\text{Bn}}$ ), 71,7 ( $\text{CH}_2_{\text{Bn}}$ ), 70,0 ( $\text{CH}_2_{\text{Ser}}$ ), 67,3 ( $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$ ), 58,5 ( $\text{CH}_{\text{Ser}}$ ), 53,5 ( $\text{CH}_{\text{Thr}}$ ), 47,3 ( $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 46,9 ( $\text{CH}_{\text{Ala}}$ ), 28,1 ( $\text{CH}_3)_3$ ), 19,1 ( $\text{CH}_3_{\text{Thr}}$ ), 9,6 ( $\text{CH}_3_{\text{Ala}}$ ). SM  $m/z$  736,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 758,3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**H-Ala-Thr(OBn)-Ser(OBn)-OtBu 44.** L'amine **44** est synthétisée en suivant la procédure générale 1.a, à partir du tripeptide **43** (200 mg, 0,27 mmol). L'huile jaune pâle obtenue (138 mg, 0,27 mmol, rdt 100 %) est utilisée directement dans la réaction suivante.

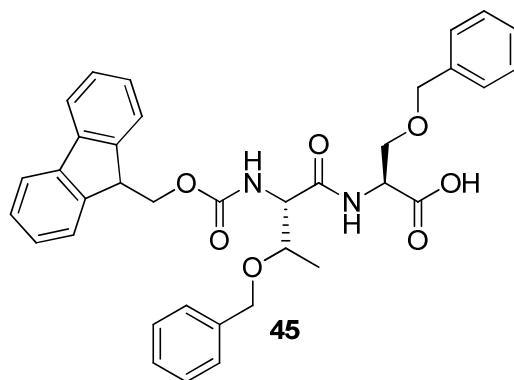
L'amine **44** a été également synthétisée en suivant la procédure générale 1.c, à partir du tripeptide **43** (47,5 mg, 60,0  $\mu\text{mol}$ ). L'huile blanchâtre obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1  $\rightarrow$  0/1) pour fournir l'amine **44** sous la forme d'une huile incolore (23,5 mg, 45,6  $\mu\text{mol}$ , rdt 76 %).



Rf 0,22 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95/5). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,90 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz), 7,40 (d, 1H,  $J = 7,6$  Hz), 7,34-7,18 (m, 10H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 4,66-4,56 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Thr}}$ ,  $\text{CH}_{\text{Ala}}$ ,  $\text{CH}_2_{\text{Bz}}$ ), 4,48-4,33 (m, 2H,  $\text{CH}_2_{\text{Bz}}$ ), 4,13 (qd, 1H,  $J = 2,8, 6,4$  Hz,  $\text{OCH}_{\text{Thr}}$ ), 3,82 (dd, 1H,  $J = 3,6, 9,6$  Hz,  $\text{CH}_2_{\text{Ser}}$ ), 3,63 (dd, 1H,  $J = 3,2, 9,6$  Hz,  $\text{CH}_2_{\text{Ser}}$ ), 3,53 (s<sub>l</sub>, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ser}}$ ), 1,40 (s, 9H, ( $\text{CH}_3)_3$ ), 1,19 (d, 3H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3_{\text{Thr}}$ ), 1,10 (d, 3H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3_{\text{Ala}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169,3 (C=O), 169,2 (C=O), 168,8 (C=O), 138,1, 137,6, 128,3, 127,6, 127,5, 82,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 74,5 ( $\text{OCH}_{\text{Thr}}$ ), 73,2 ( $\text{CH}_2_{\text{Bn}}$ ), 71,5 ( $\text{CH}_2_{\text{Bn}}$ ), 70,0 ( $\text{CH}_2_{\text{Ser}}$ ), 56,0 ( $\text{CH}_{\text{Ser}}$ ), 55,8 ( $\text{CH}_{\text{Ala}}$ ), 53,4 ( $\text{CH}_{\text{Thr}}$ ), 28,0 ( $\text{CH}_3)_3$ ), 21,6 ( $\text{CH}_3$ ), 15,3 ( $\text{CH}_3$ ). SM  $m/z$  514,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**N-Fmoc-Thr(OBn)-Ser(OBn)-OH 45.** Le TFA (0,4 mL, 0,54 mmol, 2,0 eq) est ajouté goutte à goutte à un mélange de dipeptide **41** (180 mg, 0,27 mmol, 1,0 eq) dans du dichlorométhane (3,0 mL) refroidi par un bain de glace. Le mélange jaune est agité pendant 30 min à 0 °C, puis

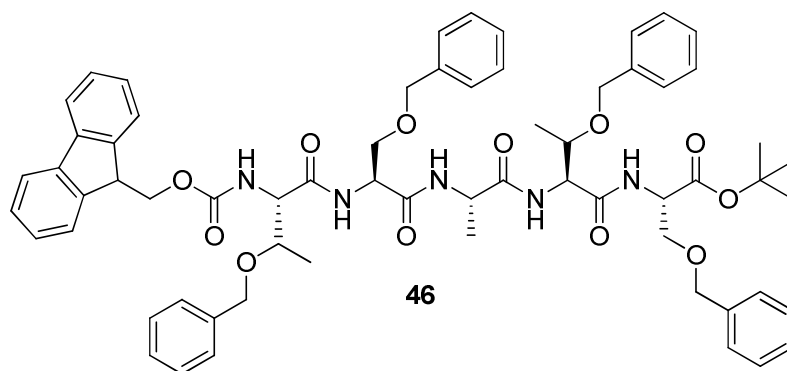
2 h à 20 °C. Le milieu réactionnel est lavé avec de l'eau (5 mL) et une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 5 mL), séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtré puis évaporé sous pression réduite pour donner un solide jaune pâle (132 mg, 0,22 mmol, rdt 80 %) directement engagé dans la réaction suivante.



Rf 0,37 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,71 (d, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,54 (d, 2H, J = 7,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,37-7,17 (m, 14H, CH<sub>ar</sub>), 6,82 (di, 1H, J = 7,2 Hz, NH), 5,37 (di, 1H, J = 7,2 Hz, NH), 4,60-4,56 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Bz et CH<sub>Thr</sub>), 4,41-4,33 (m, 5H, CH<sub>2</sub>Bz, CH<sub>2</sub>Fmoc et CH<sub>Ser</sub>), 4,18-4,08 (m, 2H, CH<sub>Fmoc</sub> et OCH<sub>Thr</sub>), 3,81 (dd, 1H, J = 3,2, 9,6 Hz, CH<sub>2</sub>Ser), 3,56 (dd, 1H, J = 3,2, 9,6 Hz, CH<sub>2</sub>Ser), 1,17 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>Thr). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 169,0 (C=O), 168,7 (C=O), 155,9 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 146,5, 144,1, 141,5, 141,4, 128,6, 127,9, 127,8, 127,3, 127,1, 125,3, 120,2, 74,5 (OCH<sub>Thr</sub>), 73,4 (CH<sub>2</sub>Bn), 71,7 (CH<sub>2</sub>Bn), 70,1 (CH<sub>2</sub>Ser), 67,3 (CH<sub>2</sub>Fmoc), 58,6 (CH<sub>Ser</sub>), 53,4 (CH<sub>Thr</sub>), 47,2 (CH<sub>Fmoc</sub>), 19,1 (CH<sub>3</sub>). SM *m/z* 609,3 [M+H]<sup>+</sup>, 631,3 [M+Na]<sup>+</sup>.

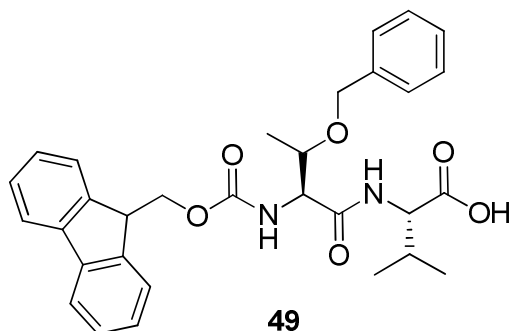
**N-Fmoc-Thr(OBn)-Ser(OBn)-Ala-Thr(OBn)-Ser(OBn)-OtBu 46.** Le pentapeptide **46** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.a, à partir de l'amine **44** (140 mg, 0,27 mmol) et de l'acide **45** (87,0 mg, 0,17 mmol). Le solide jaune obtenu est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt, 98/2 -> 50/50) pour fournir le pentapeptide **46** sous la forme d'un solide blanc (37,5 mg, 34,0 µmol, rdt 20 %).

Le pentapeptide **46** a été également synthétisé en suivant la procédure générale 2.b, à partir de l'amine **44** (19,5 mg, 38 µmol) et de l'acide **45** (23,1 mg, 38 µmol). Le solide jaune obtenu est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt, 98/2 -> 50/50) pour fournir le pentapeptide **46** sous la forme d'un solide blanc (16,3 mg, 30,4 µmol, rdt 40 %).



Rf 0,87 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,73 (d, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,56 (dd, 2H, J = 3,2, 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,40-7,12 (m, 31H, CH<sub>ar</sub> et NH), 7,11 (dl, 1H, J = 7,2 Hz, NH), 7,05 (dl, 1H, J = 6,4 Hz, NH), 6,89 (dl, 1H, J = 7,6 Hz, NH), 5,72 (dl, 1H, J = 7,2 Hz, NH), 4,65-4,30 (m, 15H), 4,18 (t, 1H, J = 7,2 Hz, CH<sub>Fmoc</sub>), 4,12-4,07 (m, 2H, OCH<sub>Thr</sub>), 3,88-3,78 (m, 2H, CH<sub>2 Ser</sub>), 3,66-3,46 (m, 2H, CH<sub>2 Ser</sub>), 1,40 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,16-1,06 (m, 9H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 169,2, 169,1, 168,8, 167,9, 167,5, 158,5 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143,8, 143,6, 143,4, 142,4, 141,3, 137,4, 128,5, 128,4, 128,3, 127,9, 127,8, 127,7, 127,6, 127,2, 127,0, 125,0, 120,1, 82,2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 73,4, 73,3 (OCH<sub>Thr</sub>), 73,2, 71,6, 71,5, 71,4 (CH<sub>2 Bn</sub>), 70,0, 69,9 (CH<sub>2 Ser</sub>), 67,3 (CH<sub>2 Fmoc</sub>), 58,2, 58,1 (CH<sub>Ser</sub>), 53,7, 53,4 (CH<sub>Thr</sub>), 49,4 (CH<sub>Fmoc</sub>), 45,3 (CH<sub>Ala</sub>), 28,0 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 18,7, 17,6, 15,0 (CH<sub>3</sub>). CLHP Rt = 8,233 min (98 %). SM *m/z* 1105,2 [M+H]<sup>+</sup>.

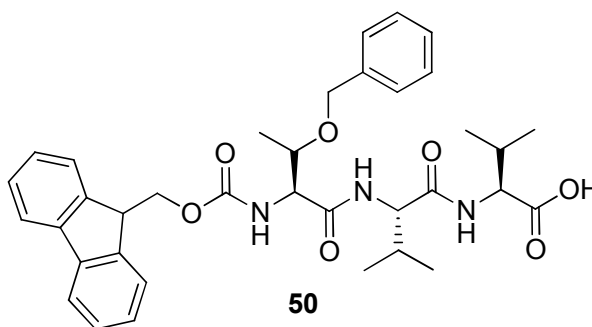
***N*-Fmoc-Thr(OBn)-Val-OH 49.** Le dipeptide **49** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.c. à partir de la *N*-Fmoc-*O*-benzyl-(*L*)-thréonine (1,23 g, 2,86 mmol) et de la (*L*)-valine (683 mg, 5,72 mmol). Le dipeptide **49** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (1,21 g, 2,29 mmol, rdt 80 %).



Rf 0,52 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 7,85 (d, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,72 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,42-7,24 (m, 10H, CH<sub>ar</sub> et NH), 6,61 (d, 1H, J = 8,0 Hz, NH), 4,64 (d, 1H, J = 11,6 Hz, CH<sub>2 Bz</sub>), 4,56 (d, 1H, J = 11,6 Hz, CH<sub>2 Bz</sub>), 4,47 (dd, 1H, J = 4,8, 8,4 Hz, NCH<sub>Val</sub>), 4,41 (dd,

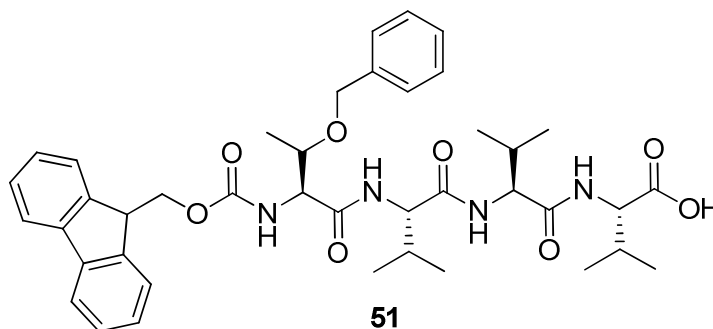
$^1\text{H}$ ,  $J = 3,2, 8,4$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Thr}}$ , 4,39-4,34 (m, 2H,  $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$ ), 4,25 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 4,17-4,11 (m, 1H,  $\text{OCH}_{\text{Thr}}$ ), 2,23-2,15 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{Val}}$ ), 1,24 (d, 3H,  $J = 6,0$  Hz,  $\text{CH}_3_{\text{Thr}}$ ), 0,94 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_3_{\text{Val}}$ ), 0,90 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_3_{\text{Val}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  173,0 (C=O), 170,7 (C=O), 157,3 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 145,1, 142,2, 139,7, 129,1, 128,6, 128,3, 128,2, 128,0, 126,2, 120,9, 76,2 ( $\text{OCH}_{\text{Thr}}$ ), 72,0 ( $\text{CH}_2_{\text{Bn}}$ ), 67,5 ( $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$ ), 59,5 ( $\text{CH}_{\text{Thr}}$ ), 58,1 ( $\text{NCH}_{\text{Val}}$ ), 48,2 ( $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 31,6 ( $\text{CH}_{\text{Val}}$ ), 19,5 ( $\text{CH}_3_{\text{Val}}$ ), 18,1 ( $\text{CH}_3_{\text{Val}}$ ), 16,2 ( $\text{CH}_3_{\text{Thr}}$ ). CLHP Rt = 6,077 min (99 %). SM (ESI)  $m/z$  531,2 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 553,2 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>. SMHR  $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$  calc : 530,61146 ; trouvé : 530,25036.

**N-Fmoc-Thr(OBn)-Val-Val-OH 50.** Le tripeptide **50** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.c, à partir du dipeptide **49** (1,97 g, 1,75 mmol) et de la (L)-valine (420 mg, 3,50 mmol). Le tripeptide **50** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (880 mg, 1,40 mmol, rdt 80 %).



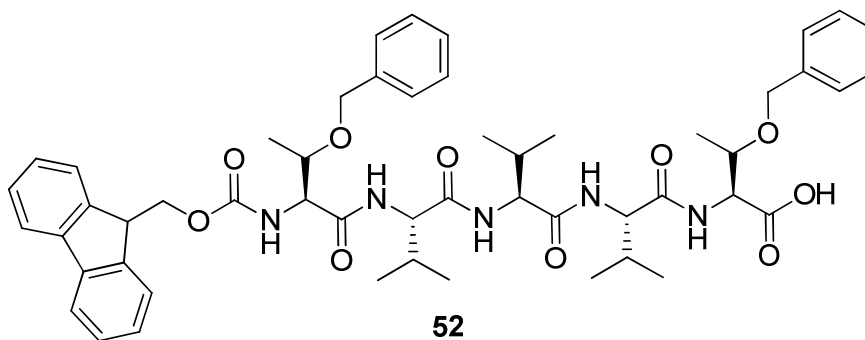
Rf 0,07 (cyclohexane/AcOEt, 7/3). RMN  $^1\text{H}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,85 (d, 2H,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7,72 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7,44-7,24 (m, 11H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  et NH), 6,62 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, NH), 4,63 (d, 1H,  $J = 11,6$  Hz,  $\text{CH}_2_{\text{Bz}}$ ), 4,54 (d, 1H,  $J = 11,6$  Hz,  $\text{CH}_2_{\text{Bz}}$ ), 4,50 (dd, 1H,  $J = 4,8, 8,4$  Hz,  $\text{NCH}_{\text{Val}}$ ), 4,44-4,33 (m, 4H,  $\text{NCH}_{\text{Val}}$ ,  $\text{CH}_{\text{Thr}}$  et  $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$ ), 4,25 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 4,17-4,09 (m, 1H,  $\text{OCH}_{\text{Thr}}$ ), 2,24-2,10 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Val}}$ ), 1,20 (d, 3H,  $J = 6,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,93 (d, 9H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,88 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  173,0 (C=O), 172,0 (C=O), 170,5 (C=O), 157,2 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 145,0, 142,1, 139,7, 129,0, 128,5, 128,2, 128,0, 126,2, 120,8, 76,1 ( $\text{OCH}_{\text{Thr}}$ ), 72,0 ( $\text{CH}_2_{\text{Bn}}$ ), 67,4 ( $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$ ), 59,6 ( $\text{CH}_{\text{Thr}}$ ), 58,8, 58,1 ( $\text{NCH}_{\text{Val}}$ ), 48,1 ( $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 32,1, 31,3 ( $\text{CH}_{\text{Val}}$ ), 19,7, 19,5, 18,3, 18,2, 16,2 ( $\text{CH}_3$ ). CLHP Rt = 4,905 (98 %). SM (ESI)  $m/z$  406,2 [ $\text{M}-\text{Fmoc}$ ]<sup>-</sup>, 652,2 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>. SMHR calc : 629,74252 ; trouvé : 629,31639.

**N-Fmoc-Thr(OBn)-Val-Val-Val-OH 51.** Le térapeptide **51** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.c, à partir du tripeptide **50** (1,21 g, 1,93 mmol) et de la (L)-valine (460 mg, 3,87 mmol). Le térapeptide **51** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (1,26 g, 1,74 mmol, rdt 90 %).



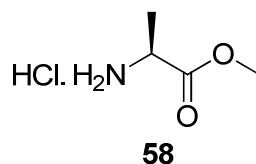
Rf 0,10 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 7,97 (d, 1H, J = 9,2 Hz, NH), 7,92-7,87 (m, 3H, CH<sub>ar</sub> et NH), 7,84 (d, 1H, J = 8,8 Hz, NH), 7,74 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,45 (d, 1H, J = 8,8 Hz, NH), 7,41 (t, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,32-7,22 (m, 7H, CH<sub>ar</sub>), 4,54-4,09 (m, 9H), 3,91-3,82 (m, 1H, OCH<sub>Thr</sub>), 2,06-1,91 (m, 3H, CH<sub>Val</sub>), 1,09 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,87-0,79 (m, 18H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 172,7 (C=O), 170,9 (C=O), 169,6 (C=O), 169,5 (C=O), 156,0 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143,8, 143,7, 140,6, 138,7, 138,6, 127,9, 127,6, 127,4, 127,1, 127,0, 125,3, 120,0, 75,1 (OCH<sub>Thr</sub>), 70,4 (CH<sub>2</sub> Bn), 65,8 (CH<sub>2</sub> Fmoc), 59,1 (CH<sub>Thr</sub>), 57,6, 57,5, 57,0 (NCH<sub>Val</sub>), 46,6 (CH<sub>Fmoc</sub>), 30,8, 30,3, 29,6 (CH<sub>Val</sub>), 19,3, 19,0, 18,1, 18,0, 17,8, 17,5, 16,4 (CH<sub>3</sub>). CLHP Rt = 4,778 min (95 %). SM (ESI) *m/z* 505,2 [M-Fmoc]<sup>-</sup>, 751,2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**N-Fmoc-Thr(OBn)-Val-Val-Val-Thr(OBn)-OH 52.** Le pentapeptide **52** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.c, à partir du térapeptide **51** (175 mg, 0,24 mmol) et de la *O*-benzyl-(L)-thréonine (89,0 mg, 0,42 mmol). Le pentapeptide **52** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (176 mg, 0,19 mmol, rdt 80 %).



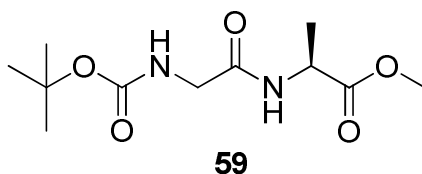
Rf 0,16 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone, 95/5). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 8,05 (d, 1H, J = 9,0 Hz, NH), 7,96 (d, 1H, J = 8,8 Hz, NH), 7,89 (d, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,87-7,82 (m, 2H, NH), 7,74 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,48 (d, 1H, J = 8,6 Hz, NH), 7,41 (t, 2H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,35-7,23 (m, 12H, CH<sub>ar</sub>), 4,56-4,21 (m, 12H), 4,11-4,01 (m, 1H, OCH<sub>Thr</sub>), 3,92-3,83 (m, 1H, OCH<sub>Thr</sub>), 2,04-1,92 (m, 3H, CH<sub>Val</sub>), 1,14-1,07 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 0,87-0,76 (m, 18H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 171,5 (C=O), 171,2 (C=O), 170,5 (C=O), 169,5 (C=O), 169,4 (C=O), 156,0 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143,7, 143,6, 140,6, 138,6, 138,5, 138,3, 127,9, 127,8, 127,5, 127,4, 127,3, 127,2, 127,1, 126,9, 125,2, 120,0, 75,1, 74,4 (OCH<sub>Thr</sub>), 70,4, 70,1 (CH<sub>2</sub> Bn), 65,7 (CH<sub>2</sub> Fmoc), 59,2, 59,1 (CH<sub>Thr</sub>), 57,5, 57,4, 55,9 (NCH<sub>Val</sub>), 46,6 (CH<sub>Fmoc</sub>), 30,5, 30,3, 30,0 (CH<sub>Val</sub>), 19,3, 19,0, 18,0, 17,8, 17,7, 17,4, 16,3, 15,9 (CH<sub>3</sub>). CLHP Rt = 4,679 min (90 %). SM (ESI) *m/z* 696,2 [M-Fmoc]<sup>-</sup>, 918,4 [M-H]<sup>-</sup>, 942,2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Chlorhydrate de l'ester méthylique de (L)-alanine 58.**<sup>318</sup> La (L)-alanine (1,00 g, 11,3 mmol, 1,0 eq) est ajoutée à -10 °C à un mélange de chlorure de thionyle (3,00 mL, 40,8 mmol, 3,6 eq) dans du méthanol (9,0 mL). Le mélange réactionnel est agité à 20 °C pendant 24 h, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est trituré avec de l'éther diéthylique pour conduire à l'ester **58** sous la forme d'un solide blanc (1,58 g, 11,3 mmol, rdt 100 %).



RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 4,21 (q, 1H, J = 7,2 Hz, CH), 3,85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1,57 (d, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>).  
 RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) δ 171,2 (C=O), 53,5, 48,8, 15,1.

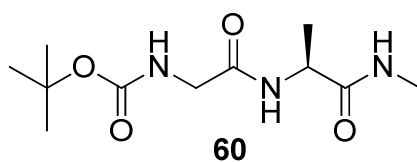
**Boc-Gly-Ala-OMe 59.** Le dipeptide **59** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.b à partir de *N*-Boc-glycine (1,72 g, 9,60 mmol) et de chlorhydrate **58** (1,61 g, 11,5 mmol). L'huile marron est purifiée par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 100/0 -> 99/1) pour conduire au dipeptide **59** (2,37 g, 9,12 mmol, rdt 95 %) sous la forme d'une huile incolore.





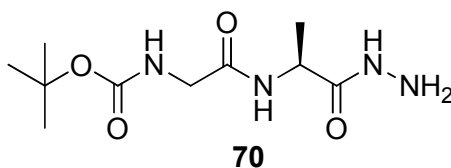
Rf 0,70 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,69 (s, 1H, NH), 5,19 (s, 1H, NH), 4,56 (quint, 1H, J = 7,2 Hz, CH), 3,78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1,41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,37 (d, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,3 (C=O), 169,1 (C=O), 156,1 (C=O), 80,4, 52,6, 48,0, 44,3, 28,4, 18,4. SM *m/z* 283,1 [M+Na<sup>+</sup>].

**Boc-Gly-Ala-NHMe 60.** Le dipeptide **59** (1,23 g, 4,72 mmol, 1,0 eq) est dissous dans une solution alcoolique de méthylamine à 33 % (50 mL), puis le mélange est agité à 20 °C pendant 3 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour donner l'amide sous la forme d'un solide blanc (1,22 g, 4,72 mmol, rdt 100 %).



Rf 0,16 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,68 (di, 1H, J = 6,1 Hz, NH), 6,43 (s, 1H, NH), 5,21 (s, 1H, NH), 4,45 (quint, 1H, J = 7,2 Hz, CH), 3,76 (di, 2H, J = 5,3 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,77 (d, 3H, J = 4,8 Hz, NCH<sub>3</sub>), 1,43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,36 (d, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 172,6 (C=O), 169,5 (C=O), 156,4 (C=O), 80,8, 58,6, 48,9, 44,7, 28,4, 18,2. SM *m/z* 260,1 [M+H<sup>+</sup>].

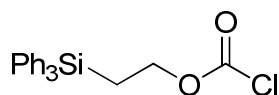
**Boc-Gly-Ala-NHNH<sub>2</sub> 70.** L'hydrazide **70** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (205 mg, 0,79 mmol, rdt 100 %) en suivant la procédure générale 3, à partir de l'ester **59** (205 mg, 0,79 mmol).



Rf 0,34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 4,48 (q, 1H, J = 5,6 Hz, CH), 3,79 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,37 (d, 3H, J = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 172,8 (C=O), 169,9 (C=O), 150,6 (C=O), 80,1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47,8 (CH), 28,5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27,1 (CH<sub>2</sub>), 18,1 (CH<sub>3</sub>). SM *m/z* 283,0 [M+Na<sup>+</sup>].

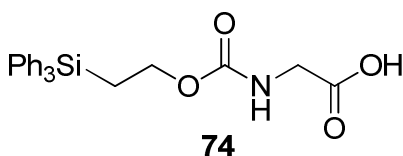
**Chloroformiate de 2-(triphénylsilyl)éthoxycarbonate 73.** Le triphosgène (1,00 g, 3,37 mmol, 1,2 eq) est dissous dans du THF anhydre (16 mL). Ce mélange est refroidi à 5 °C avant d'ajouter goutte à goutte de la pyridine anhydre (375 μL, 4,65 mmol, 1,6 eq). Après 5 min,

un mélange de 2-triphénylsilyléthanol (885 mg, 2,91 mmol, 1,0 eq) dans du THF anhydre (10 mL) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à 5 °C pendant 1 h avant d'être dilué avec de l'éther diéthylique (50 mL) puis lavé avec une solution aqueuse d'HCl 0,2 N (30 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (30 mL) puis une solution aqueuse saturée de NaCl (30 mL), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite pour fournir le chloroformiate **73** sous la forme d'un solide blanc (1,05 g, 2,85 mmol, rdt 98 %).

**73**

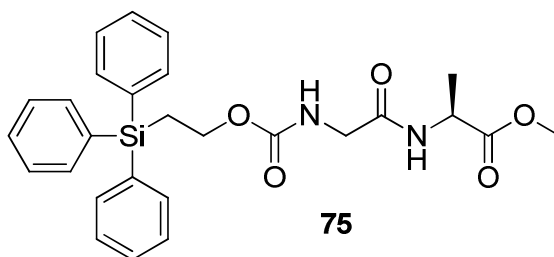
T<sub>f</sub> 81-83°C. Rf 0.84 (cyclohexane/AcOEt 2/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,57-7,60 (m, 6H), 7,42-7,52 (m, 9H), 4,54-4,60 (m, 2H), 2,04-2,10 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 150,52, 135,5 (6C), 133,2 (3C), 130,1 (3C), 128,3 (6C), 70,7, 14,7. SM *m/z* 77, 105, 154, 181, 217, 259, 289.

**N-Tpseoc-glycine 74.** La glycine (1,00 g, 13,3 mmol, 4,7 eq) est dissoute dans une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (30 mL). Cette solution est ajoutée goutte à goutte à un mélange de chloroformiate **73** (1,05 g, 2,85 mmol, 1,0 eq) dans du THF anhydre (75 mL). Le milieu réactionnel est agité vigoureusement à 20 °C avant d'être évaporé sous pression réduite. Le résidu est resuspendu dans de l'eau MilliQ (200 mL), puis de l'acide citrique est ajouté jusqu'à ce que le pH soit de 2-3. La suspension est extraite avec du dichlorométhane (2 x 150 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite pour fournir la *N*-Tpseoc-glycine **74** sous la forme d'un solide blanc (1,05 g, 2,60 mmol, rdt 91 %).

**74**

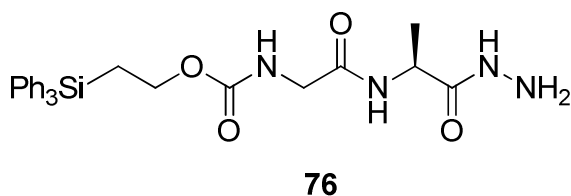
Rf 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,39-7,50 (m, 15H, CH<sub>ar</sub>), 7,30 (t, 1H, J = 6.0 Hz, NH), 4,06-4,10 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3,61 (d, 2H, J = 6.0 Hz, NCH<sub>2</sub>), 1,82-1,87 (m, 2H, SiCH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 171,5, 156,5, 135,0 (6C), 133,7 (3C), 129,6 (3C), 128,1 (6C), 61,5, 42,0, 14,1. SM *m/z* 428,2 [M+Na]<sup>+</sup>.

***N*-Tpseoc-Gly-Ala-OMe 75.** Le dipeptide **75** est synthétisé en suivant la procédure générale 2.b à partir de *N*-Tpseoc-glycine **74** (1,00 g, 2,47 mmol) et de chlorhydrate **58** (4,15 g, 2,96 mmol). L'huile marron est purifiée par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone, 100/0 -> 98/2) pour conduire au dipeptide **75** (1,21 g, 2,47 mmol, rdt 100 %) sous la forme d'une huile incolore.



Rf 0,79 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,58-7,56 (m, 6H), 7,46-7,39 (m, 9H), 6,25 (s, 1H, NH), 4,45 (quint, 1H, J = 7,2 Hz, CH), 4,24-4,20 (m, 2H), 3,75 (s, 2H), 3,65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,92-1,88 (m, 2H), 1,33 (d, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>).

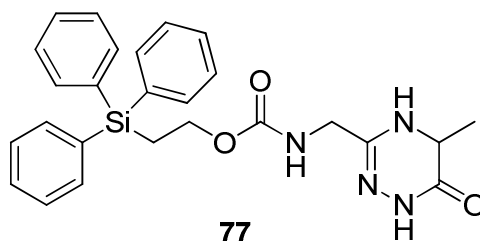
***N*-Tpseoc-Gly-Ala-NHNH<sub>2</sub> 76.** L'hydrazide **76** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (98,0 mg, 0,20 mmol, rdt 100 %) en suivant la procédure générale 3, à partir de l'ester **75** (100 mg, 0,20 mmol).



Rf 0,43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,57-7,55 (m, 6H), 7,45-7,39 (m, 9H), 4,48 (quint, 1H, J = 7,2 Hz, CH), 4,24-4,18 (m, 2H), 3,76 (s, 2H), 1,92-1,88 (m, 2H), 1,28 (d, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 172,8 (C=O), 169,9 (C=O), 150,6 (C=O), 80,1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47,8 (CH), 28,5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27,1 (CH<sub>2</sub>), 18,1 (CH<sub>3</sub>). SM *m/z* 491,2 [M+H]<sup>+</sup>.

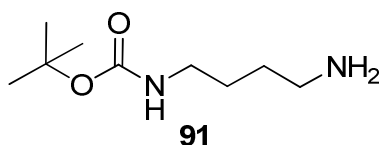
**2-(triphénylsilyl)éthyl ((5-méthyl-6-oxo-1,4,5,6-tétrahydro-1,2,4-triazin-3-yl)méthyl)carbamate 77.** Un ballon contenant un mélange d'hydrazide **76** et d'acide *p*-toluènesulfonique dans du benzène est surmonté d'un appareil de Dean-Stark. Le mélange est chauffé à reflux pendant 8 h. Le milieu réactionnel revient naturellement à température ambiante puis est évaporé sous pression réduite. Le résidu est resuspendu dans de l'eau MilliQ (10 mL) puis

extrait avec du dichlorométhane (20 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20 mL), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le solide blanc obtenu est composé d'un mélange d'hydrazide **76** (30 %), d'un produit non identifié (30 %) et de la 1,2,4-triazinone **76** désirée (40 %). Le produit n'a pas été isolé.



Rf 0.62 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 95/5). SM *m/z* 473,2 [M+H]<sup>+</sup>.

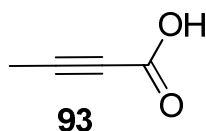
**(4-Aminobutyl)carbamate de *tert*-butyle 91.** Le di-*tert*-butyl dicarbonate (2,40 mL, 10,0 mmol, 1,0 eq) dans du 1,4-dioxane anhydre (40 mL) est ajouté goutte à goutte à un mélange de diaminobutane (5,10 mL, 50,0 mmol, 5,0 eq) dans du 1,4-dioxane anhydre (40 mL) placée sous atmosphère d'argon. La suspension blanche est agitée à 25 °C pendant 12 h. Le solvant est évaporé, le résidu est resuspendu dans de l'eau MilliQ (50 mL) et le sous-produit diprotégé est éliminé par filtration sur fritté. Le filtrat est extrait avec du dichlorométhane (5 x 50 mL), les phases organiques sont combinées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite pour fournir le (4-aminobutyl)carbamate de *tert*-butyle **91** sous la forme d'une huile incolore (1,88 g, 10,0 mmol, rdt 100 %).



Rf 0,32 (MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 98/2). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 4,78 (s<sub>r</sub>, 1H, NH), 3,03 (q<sub>r</sub>, 2H, J = 6,0 Hz, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,62 (t, 2H, J = 6,8 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 1,47-1,37 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,07 (s<sub>r</sub>, 2H, NH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 156,1 (C=O), 79,0, 42,0, 40,5, 31,1, 28,5, 27,6. SM *m/z* 133,2 [M-*t*Bu]<sup>+</sup>, 189,2 [M+H]<sup>+</sup>.

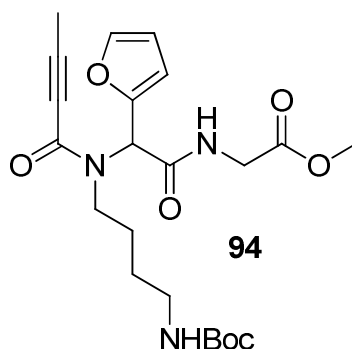
**Acide but-2-ynoïque 93.** Le 2-butynoate d'éthyle (0,59 mL, 5,00 mmol, 1,0 eq) est ajouté à un mélange d'éthanol (75 mL) et de NaOH<sub>aq</sub> 1 M (25 mL, 25 mmol, 5,0 eq). La solution est agitée à 20 °C sous atmosphère d'argon pendant 30 min, puis l'éthanol est évaporé sous

pression réduite. Le résidu est dilué avec de l'eau (25 mL) puis acidifié à pH 1,0 avec une solution aqueuse de HCl 1 M. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 75 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite pour donner l'acide but-2-ynoïque **93** sous la forme d'un solide blanc (0,42 g, 5,00 mmol, rdt 100 %).



Rf 0,16 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 157,8 (C=O), 88,6, 72,1, 4,1.

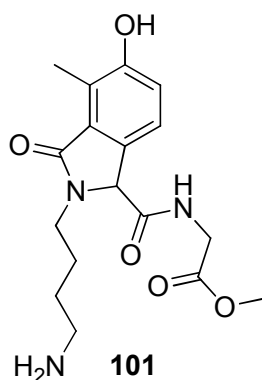
**Methyl 10-(but-2-ynoyl)-11-(furan-2-yl)-2,2-dimethyl-4,12-dioxo-3-oxa-5,10,13-triazapentadecan-15-oate 94.** Le composé **94** est synthétisé en suivant la procédure générale 4, à partir de 2-furaldéhyde (84,0 µL, 1,00 mmol), d'acide 2-butynoïque **93** (87,0 mg, 1,01 mmol), de *tert*-butyl 4-aminobutylcarbamate **92** (193 mg, 1,00 mmol) et d'isocynoacétate de méthyle (96,0 µL, 1,00 mmol). L'huile marron obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 1/0 -> 8/2) pour donner le produit **94** désiré sous la forme d'une huile marron (136 mg, 0,30 mmol, rdt 30 %).



Rf 0,51 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 7,76 (t<sub>1</sub>, 1H, J = 6,4 Hz, NH), 7,64 (t<sub>1</sub>, 1H, J = 5,2 Hz, NH), 7,60 (dd, 1H, J = 1,2, 8,8 Hz, OCH<sub>fur</sub>), 6,67 (dd, 1H, J = 3,2, 6,4 Hz, CCH<sub>fur</sub>), 6,49-6,46 (m, 1H, CH<sub>fur</sub>), 6,19 (s, 1H, CH), 4,08-3,96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,70 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>), 3,68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,64-3,49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,97-2,89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,98 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1,39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,36-1,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 170,8 (C=O), 168,4 (C=O), 155,6 (C=O), 144,3 (C=O), 144,1 (OCH<sub>fur</sub>), 112,6 (C<sub>fur</sub>), 112,2 (CCH<sub>fur</sub>), 111,8 (CH<sub>fur</sub>), 90,0 (CH<sub>3</sub>C), 81,0

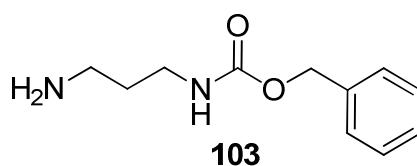
(C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 74,4 (COC), 55,3 (CH), 52,3 (COCH<sub>2</sub>), 52,2 (OCH<sub>3</sub>), 47,9, 41,7, 40,7 (CH<sub>2</sub>), 28,8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27,6 (CH<sub>2</sub>), 3,6 (CCH<sub>3</sub>). SM  $m/z$  350,2 [M-Boc]<sup>+</sup>, 472,2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**2-(2-(4-Aminobutyl)-5-hydroxy-4-methyl-3-oxoisindoline-1-carboxamido)acétate de méthyle 101.** L'isoindolinone **101** est synthétisée en suivant la procédure générale 5, à partir du composé **94** (86,6 mg, 0,19 mmol) L'huile marron obtenue (74,6 mg) contient 30 % d'isoindole **101**. Le produit n'a pas été isolé.



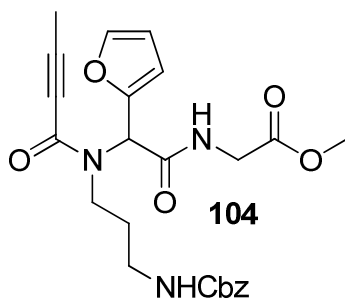
Rf 0,03 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5). SM (ESI)  $m/z$  350,2 [M+H]<sup>+</sup>, 372,2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**(3-Aminopropyl)carbamate de benzyle 103.** Le chloroformiate de benzyle (0,75 mL, 5,00 mmol, 1,0 eq) dans du 1,4-dioxane anhydre (50 mL) est ajouté goutte à goutte à une solution de diaminopropane (4,3 mL, 50,0 mmol, 10 eq) dans du 1,4-dioxane anhydre (100 mL) placée sous atmosphère d'argon. La suspension blanche est agitée à 25 °C pendant 12 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu est resuspendu dans de l'eau MilliQ (50 mL), puis le sous-produit diprotégé est éliminé par filtration sur fritté. Le filtrat est extrait avec de l'éther diéthylique (4 x 50 mL), les phases organiques sont combinées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite pour fournir le (3-aminopropyl)carbamate de benzyle **103** sous la forme d'une huile incolore (415 mg, 1,99 mmol, rdt 42 %).



Rf 0,09 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,33-7,24 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>), 5,32 (s, 1H, NH), 5,06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Bz), 3,26 (q<sub>l</sub>, 2H, J = 6,0 Hz, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,74 (t, 2H, J = 6,8 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 1,60 (quint, 2H, J = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,42 (s, 2H, NH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 156,5 (C=O), 136,7, 128,5 (2C), 128,1 (2C), 66,6, 39,8, 39,2, 33,0. SM *m/z* 209,2 [M+H]<sup>+</sup>.

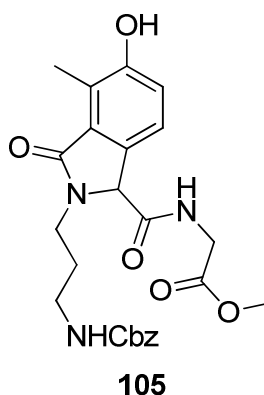
**8-(But-2-ynoyl)-9-(furan-2-yl)-3,10-dioxo-1-phenyl-2-oxa-4,8,11-triazatridecan-13-oate de méthyle 104.** Le composé **104** est synthétisé en suivant la procédure générale 4, à partir de 2-furaldéhyde (140 µL, 1,62 mmol), d'acide 2-butynoïque **93** (139 mg, 1,62 mmol), de (3-aminopropyl)carbamate de benzyle **103** (345 mg, 1,62 mmol) et d'isocynoacétate de méthyle (160 µL, 1,61 mmol). L'huile marron obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 1/0 → 8/2) pour donner le produit **104** désiré sous la forme d'une huile marron (227 mg, 0,48 mmol, rdt 30 %).



Rf 0,44 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 7,81 (t<sub>l</sub>, 1H, J = 4,4 Hz, NH), 7,68 (t<sub>l</sub>, 1H, J = 4,8 Hz, NH), 7,57 (dd, 1H, J = 1,2, 8,8 Hz, OCH<sub>fur</sub>), 7,36-7,33 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>), 6,66 (t, 1H, J = 3,6 Hz, CCH<sub>fur</sub>), 6,45-6,43 (m, 1H, CH<sub>fur</sub>), 6,19 (s, 1H, CH), 5,03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Bz), 4,08-3,94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,70 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>), 3,68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,59-3,49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,05-3,00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,98 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 170,8 (C=O), 168,3 (C=O), 154,5 (C=O), 149,4, 144,4 (C=O), 144,3 (OCH<sub>fur</sub>), 129,3, 128,6, 112,7 (C<sub>fur</sub>), 112,4 (CCH<sub>fur</sub>), 111,8 (CH<sub>fur</sub>), 89,8 (CH<sub>3</sub>C), 74,2 (COC), 66,4 (CH<sub>2</sub>Bz), 55,3 (CH), 52,3 (COCH<sub>2</sub>), 52,2 (OCH<sub>3</sub>), 45,9, 42,5, 41,7 (CH<sub>2</sub>), 3,5 (CCH<sub>3</sub>). SM *m/z* 470,2 [M+H]<sup>+</sup>.

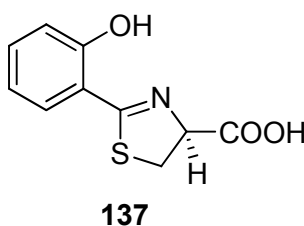
**2-(2-(3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)propyl)-5-hydroxy-4-methyl-3-oxoisindoline-1-carboxamido)acétate de méthyle 105.** L'isoinдолinone **105** est synthétisée en suivant la procédure générale 5, à partir du composé **104** (172 mg, 0,37 mmol). L'huile marron obtenue est dissoute dans de l'acétate d'éthyle (20 mL), lavée avec une solution aqueuse d'HCl 0,5 N (20 mL), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (20 mL), et de l'eau (20 mL),

séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite pour fournir l'isoindole **105** sous la forme d'une huile orange (75 mg, 0,16 mmol, rdt 45 %).



Rf 0,31 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 8,54 (s, 1H, OH), 7,90 (t, 1H, J = 5,2 Hz, NH), 7,32-7,29 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>), 7,21 (d, 1H, J = 8,4 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,99 (d, 1H, J = 8,4 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,43 (t, 1H, J = 4,0 Hz, NH), 5,07 (s, 1H, CH), 5,02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Bz), 4,04-3,99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,91-3,82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,32-3,17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,85 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>), 2,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) δ 170,8 (C=O), 170,7 (C=O), 169,7 (C=O), 157,0 (C=O), 138,5, 133,9, 132,0, 130,7, 129,3, 128,6, 123,9, 121,2, 118,9, 66,5, 63,5, 52,2, 55,3, 41,7, 39,5, 39,0, 9,6. SM (ESI) *m/z* 470,2 [M+H]<sup>+</sup>. SMHR calc : 469,18490 ; trouvé : 469,19039.

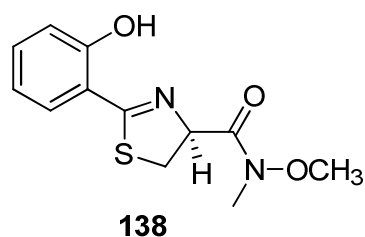
**Acide 2-(2-hydroxy-phényl)-4,5-dihydro-thiazole-4-carboxylique 137.**<sup>413</sup> À une solution de 2-hydroxybenzonnitrile (2,00 g, 16,8 mmol, 1,0 eq) dans le méthanol (75 mL) sont additionnées la D-cystéine (5,90 g, 33,6 mmol, 2,0 eq) et la solution de tampon phosphate pH 6,4 (75 mL). Le pH de la solution est ajusté à 6,4 par ajout de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et le milieu réactionnel est agité et chauffé à 60 °C pendant 12 h. Le mélange est évaporé sous pression réduite, puis le résidu jaune est dilué dans de l'eau MilliQ. Le pH de cette solution est ajusté à 2,0 par ajout d'acide citrique. La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3 x 100 mL), les phases organiques sont combinées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite pour conduire au composé 137 sous la forme d'un solide jaune pâle (3,50 g, 15,8 mmol, rdt 94 %).





Rf 0,15 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,39 (dd, 1H, J = 0,8, 7,9 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,33 (td, 1H, J = 1,0, 7,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,67 (d<sub>l</sub>, 1H, J = 8,5 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,85 (t<sub>i</sub>, 1H, J = 7,5 Hz, CH<sub>ar</sub>), 5,31 (t, 1H, J = 8,7 Hz, CH), 3,65 (dd, 1H, J = 8,0, 11,3 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,59 (t<sub>i</sub>, 1H, J = 9,5 Hz, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 174,2 (C=O), 172,3, 159,1, 133,7, 130,9, 119,2, 117,3, 116,2, 76,9, 33,9. SM *m/z* 223 [M+H]<sup>+</sup>.

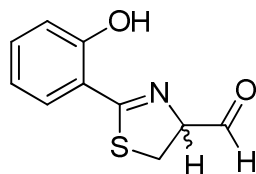
**Méthoxy-méthylamide de l'acide 2-(2-Hydroxy-phenyl)-4,5-dihydro-thiazole-4-carboxylique 138.** À un mélange de l'acide carboxylique **137** (1,20 g, 5,38 mmol, 1,0 eq) dans du dichlorométhane (75 mL) est additionné l'EDCI (1,26 g, 6,46 mmol, 1,2 eq), suivi de l'ajout d'un mélange composé du *N,O*-diméthylhydroxylamine (0,64 g, 6,46 mmol, 1,2 eq) et de DIPEA (1,2 mL, 6,87 mmol, 1,3 eq) dans du dichlorométhane (75 mL). Le mélange est laissé sous agitation et sous argon à température ambiante pendant 12 h. Le milieu réactionnel est ensuite adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/Et<sub>2</sub>O, 9/1 -> 8/2) pour conduire à l'amide de Weinreb **138** sous la forme d'un solide blanc (0,84 g, 3,17 mmol, rdt 59 %).



Rf 0,76 (Et<sub>2</sub>O). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,40 (dd, 1H, J = 1,2, 8,0 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,33 (td, 1H, J = 1,2, 7,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,96 (d<sub>l</sub>, 1H, J = 8,4 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,85 (t<sub>i</sub>, 1H, J = 7,6 Hz, CH<sub>ar</sub>), 5,67 (t<sub>i</sub>, 1H, J = 8,4 Hz, CH), 3,81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,76 (t<sub>i</sub>, 1H, J = 10,0 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,45 (dd, 1H, J = 9,6, 10,8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 174,3 (C=O), 159,2, 133,5 (CH), 130,6 (CH), 119,0 (CH), 117,2, 116,2, 74,7 (CH), 61,9 (CH<sub>3</sub>), 32,9 (CH<sub>2</sub>), 32,6 (CH<sub>3</sub>). SM *m/z* 267,0 [M+H]<sup>+</sup>.

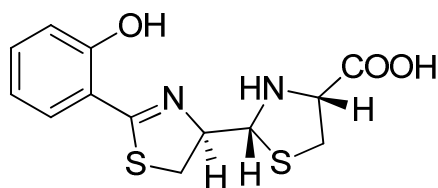
**2-(2-Hydroxy-phényl)-4,5-dihydro-thiazole-4-carbaldéhyde 139.**<sup>414</sup> À une solution de composé **138** (250 mg, 0,95 mmol, 1,0 eq) dans du THF anhydre (18 mL), placée sous atmosphère d'argon et refroidie à -50 °C, est additionné une solution de LiAlH<sub>4</sub> 1 M dans le THF (1,00 mL, 1,05 mmol, 1,1 eq) goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min à -20 °C. Le mélange est ensuite hydrolysé par une solution aqueuse de NH<sub>4</sub>Cl saturée (9,5 mL) et une solution aqueuse de KHSO<sub>4</sub> 1 M (3,75 mL), puis agité jusqu'à ce que

la température du milieu réactionnel atteint 10 °C. La solution est ensuite extraite avec du dichlorométhane (2 x 30 mL), les phases organiques sont combinées, séchées rapidement sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est directement mise en réaction dans l'étape suivante. Rf 0,92 (Et<sub>2</sub>O).



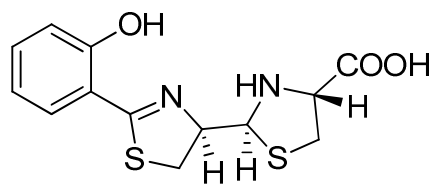
139

**Nor-pyochéline 134.** À un mélange d'aldéhyde **139** (197 mg, 0,95 mmol, 1,0 eq) dans l'éthanol (36 mL) sont additionnés du chlorhydrate de (L)-cystéine (328 mg, 2,09 mmol, 2,2 eq), de l'eau (12 mL) et de l'acétate de potassium (652 mg, 6,64 mmol, 7,0 eq). Une fois le pH de la solution vérifié à 6,0, la solution jaune pâle est laissée sous agitation et sous atmosphère d'argon, à l'abri de la lumière et à 20 °C pendant 12 h. L'éthanol est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est dilué dans de l'eau. Le pH de la solution est ajusté à 5,0 par ajout d'acide citrique. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 60 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite. La *nor*-pyochéline **134** (241 mg, 0,78 mmol, rdt 82 %) est obtenue dans un mélange composé de trois diastéréoisomères **134a** (4'R, 2''R, 4''R), **134b** (4'R, 2''S, 4''R), **134c** (4'S, 2''S, 4''R) dans des proportions 50/40/10. Ce solide jaune ne peut être purifié. SM *m/z* 311,4 [M+H]<sup>+</sup>.

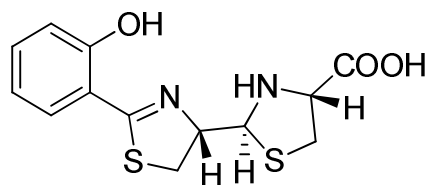


134a

Rf 0,33 (BuOH/H<sub>2</sub>O/MeOH/cyclohexane 2/2/1/1). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 7,46-7,38 (m, 2H), 6,99-6,91 (m, 2H), 5,04-5,00 (m, 1H), 4,58 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 3,73 (dd, J = 8,4, 11,2 Hz, 1H), 3,67-3,55 (m, 2H), 3,49-3,28 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 174,2 (C=O), 172,4 (C=N), 159,9, 134,3, 131,4, 119,9, 117,8, 117,1, 82,8, 72,4, 68,0, 38,0, 35,1.

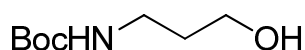
**134b**

Rf 0,31 (BuOH/H<sub>2</sub>O/MeOH/cyclohexane 2/2/1/1). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 7,46-7,38 (m, 2H), 6,99-6,91 (m, 2H), 4,86 (q, J = 4,0 Hz, 1H), 4,56 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 3,73 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,67-3,55 (m, 2H), 3,06-2,97 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 174,2 (C=O), 172,7 (C=N), 159,9, 134,3, 131,4, 119,9, 117,8, 117,1, 83,1, 72,7, 64,9, 38,1, 34,2.

**134c**

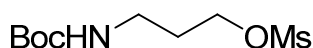
Rf 0,28 (BuOH/H<sub>2</sub>O/MeOH/cyclohexane 2/2/1/1). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 7,46-7,38 (m, 2H), 6,99-6,91 (m, 2H), 5,08 (td, J = 5,2, 8,8 Hz, 1H), 5,00 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,00 (dd, J = 6,8, 8,8 Hz, 1H), 3,67-3,55 (m, 2H), 3,49-3,28 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 174,2 (C=O), 173,4 (C=N), 159,9, 134,3, 131,4, 119,9, 117,8, 117,1, 78,0, 73,3, 66,0, 38,5, 35,6.

***N*-t-butoxycarbonyl-3-amino-1-propanol 141.**<sup>415</sup> À un mélange de 3-aminopropan-1-ol (3,00 g, 40,0 mmol, 1,0 eq) dans du dichlorométhane (25 mL) refroidi à 0 °C, est additionné le Boc<sub>2</sub>O (8,70 g, 40,0 mmol, 1,0 eq) goutte à goutte. Le mélange est agité à 20 °C pendant 6 h. Le milieu réactionnel est lavé avec de l'eau (20 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (20 mL). La phase organique est isolée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Et<sub>2</sub>O/cyclohexane 8/2) pour conduire au dérivé protégé 141 sous la forme d'une huile incolore (5,30 g, 30,0 mmol, rdt 76 %).

**141**

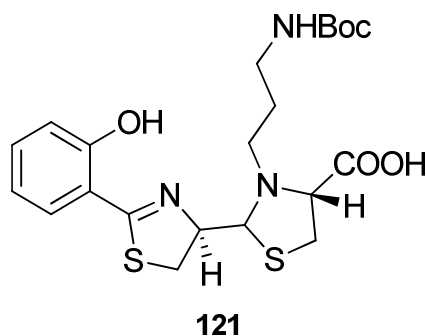
Rf 0,65 (Et<sub>2</sub>O). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 4,87 (si, 1H, NH), 3,60 (m, 2H), 3,25-3,19 (m, 3H, CH<sub>2</sub> et OH), 1,67-1,57 (m, 2H), 1,40 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 157,3, 79,7, 59,4, 37,1, 33,0, 28,5. SM *m/z* 175,1 [M+H]<sup>+</sup>, 198 [M+Na]<sup>+</sup>.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-3-amino-1-propanol-mésylate 135.**<sup>415</sup> À un mélange de Boc-aminopropanol **141** (3,00 g, 17,1 mmol, 1,0 eq) dans du dichlorométhane (150 mL) est ajouté le chlorure de mésyle (1,47 mL, 19,0 mmol, 1,1 eq) goutte à goutte. Le mélange est refroidi à 0 °C puis la triéthylamine (2,65 mL, 19,0 mmol, 1,1 eq) est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à 20 °C pendant 1 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est dilué dans de l'acétate d'éthyle (100 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse de KHSO<sub>4</sub> 1 M (60 mL), de l'eau (60 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (60 mL). La phase organique est isolée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire au dérivé mésylé **135** sous la forme d'une huile blanche qui cristallise à froid (4,60 g, 17,1 mmol, rdt 100 %).

**135**

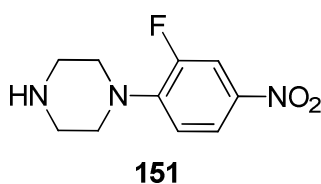
Rf 0,68 (Et<sub>2</sub>O). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 4,70 (si, 1H, NH), 4,27 (t, 2H, J = 6,0 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,28-3,20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,91 (quint, 2H, J = 6,0 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 156,1 (C=O), 79,7, 67,5, 37,6, 36,9, 29,9, 28,5. SM *m/z* 254,0 [M+H]<sup>+</sup>.

**Pyochéline fonctionnalisée 121.** À un mélange de *nor*-pyochéline **134** (158 mg, 0,51 mmol, 1,0 eq) dans de l'acétonitrile (10 mL) sont additionnés le dérivé mésylé **135** (194 mg, 0,7 mmol, 1,5 eq), du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (106 mg, 0,77 mmol, 1,5 eq) et de l'éther couronne 18-6 (pointe de spatule). Le mélange est chauffé à 85 °C pendant 8 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est dilué dans du dichlorométhane (100 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (80 mL), une solution aqueuse d'HCl 0,5 N (80 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (80 mL). La phase organique est isolée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice démétaillée (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone, 95/5) pour conduire à la pyochéline fonctionnalisée **121** (59,5 mg, 0,13 mmol, rdt 25 %) sous la forme d'une huile jaune et d'un diastéréoisomère très majoritaire.



Rf 0,40 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 95/5). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 12,5 (s, 1H), 7,45-7,38 (m, 2H), 6,98-6,90 (m, 2H), 6,03 (s, 1H, NH), 5,21-4,95 (m, 1H, H4'), 4,90-4,87 (m, 1H, H2''), 4,25-4,16 (m, 3H, H4'' + NCH<sub>2</sub>), 3,67-3,42 (m, 2H, H5'), 3,37-3,33 (m, 1H, H5''), 3,24-3,15 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 3,01-2,96 (m, 1H, H5''), 1,87-1,81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,26 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 173,5 (C=O), 171,9 (C=N), 160,2, 157,3, 134,2, 131,4, 119,8, 117,8, 117,1, 83,1, 72,6, 65,2, 63,6, 38,5, 38,0, 35,5, 34,1, 28,7. SM *m/z* 468,1 [M+H]<sup>+</sup>. SMHR C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>: calc : 467,15486, trouvé : 467,15483.

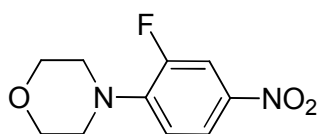
**1-(2-Fluoro-4-nitrophényl)pipérazine 151.** Le composé **151** est préparé en suivant la procédure générale 5, à partir de pipérazine (2,10 g, 24,0 mmol). L'huile jaune obtenue est reprise dans du *tert*-butyl-méthyl-éther, entraînant la précipitation de l'excès de pipérazine. La pipérazine est éliminée par filtration et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner le produit désiré sous la forme d'un solide jaune (2,70 g, 12,0 mmol, rdt 100 %).



Rf 0,06 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 99/1). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,94 (dd, 1H, J = 2,0, 9,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,85 (dd, 1H, J = 2,8, 13,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,87 (t, 1H, J = 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 3,24-3,22 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,02-3,00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) δ -118,72 (1F, J = 3,8, 5,6 Hz). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 146,2, 140,7, 121,2, 117,2, 112,9, 112,6, 51,1, 50,9. SM *m/z* 226,0, 227,0 [M+H]<sup>+</sup>.

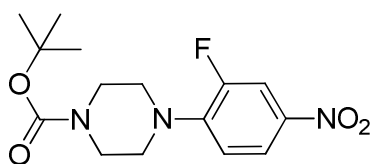
**4-(2-Fluoro-4-nitro-phényl)-morpholine 145.** Le composé **145** est préparé en suivant la procédure générale 5, à partir de morpholine (6,0 mL) et de 3,4-difluoronitrobenzène (840 µL, 7,74 mmol). Le résidu obtenu est redissous dans du dichlorométhane (100 mL) avant d'être lavé successivement par de l'eau (100 mL) et une solution aqueuse saturée de

NaCl (100 mL). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis adsorbée sur silice. Une chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/ $\text{Et}_2\text{O}$ , 7/3) permet d'isoler le composé **145** (1,65 g, 7,30 mmol, rdt 94 %) sous la forme d'un solide jaune.

**145**

Rf 0,63 (cyclohexane/ $\text{AcOEt}$ , 50/50). RMN  $^1\text{H}$  (acétone- $\text{d}_6$ )  $\delta$  8,02 (d, 1H,  $J = 8,8$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7,93 (d, 1H,  $J = 13,6$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7,19 (d, 1H,  $J = 8,8$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 3,82 (t, 4 H,  $J = 4,4$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 3,33 (t, 4 H,  $J = 4,4$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ). RMN  $^{19}\text{F}$  (acétone- $\text{d}_6$ )  $\delta$  -120,4 (1F,  $J = 9,0, 13,5$  Hz). RMN  $^{13}\text{C}$  (acétone- $\text{d}_6$ )  $\delta$  157,7, 155,3, 154,4, 152,7, 137,9, 136,3, 135,6, 129,4, 129,0, 120,2, 107,9, 107,6, 67,6, 67,0, 52,2. SM  $m/z$  227,0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

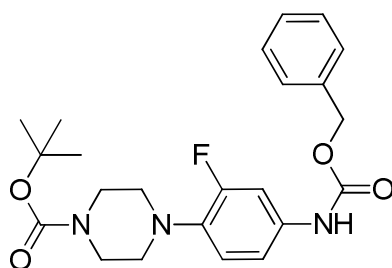
**4-(2-Fluoro-4-nitro-phényl)pipérazine-1-carboxylate de tert-butyle 144.** À une solution d'amine **151** (3,79 g, 16,8 mmol, 1,0 eq) dans du THF (150 mL) sont ajoutés successivement du di-*tert*-butyl-dicarbonat (4,78 mL, 20,2 mmol, 1,2 eq), une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (75 mL) et de l'eau (75 mL). Le milieu réactionnel est agité à 20 °C pendant 2h30 avant d'être extrait avec du dichlorométhane (2 x 150 mL). Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl (200 mL), séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le carbamate **144** est obtenu après trituration dans de l'éther diéthylique sous la forme d'un solide jaune (4,79 g, 14,7 mmol, rdt 88 %).

**144**

Rf 0,88 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  99/1). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,96 (ddd, 1H,  $J = 0,8, 2,4, 9,2$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7,89 (dd, 1H,  $J = 2,8, 13,2$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6,89 (t, 1H,  $J = 8,8$  Hz,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 3,58 (t, 4H,  $J = 5,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,21 (t, 4H,  $J = 5,0$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 1,46 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ). RMN  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -118,71 (1F,  $J = 3,4, 5,4$  Hz). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  154,6 (C=O), 145,5, 141,0, 121,0, 117,3, 112,8, 112,5, 80,3, 49,6, 49,5, 28,4. SM  $m/z$  226,2  $[\text{M}-\text{Boc}]^+$ , 270,0  $[\text{M}-\text{tBu}]^+$ .

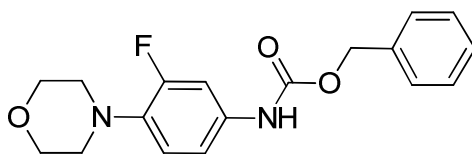
**4-(4-Benzyloxycarbonylamino-2-fluoro-phényl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle 147.**

Le carbamate **147** est préparé en suivant la procédure générale 7, à partir du composé nitré **144** (2,39 g, 7,35 mmol). Le résidu est trituré avec de l'éther diéthylique pour fournir le carbamate **147** attendu sous la forme d'un solide blanc (2,15 g, 5,00 mmol, rdt 68 %).

**147**

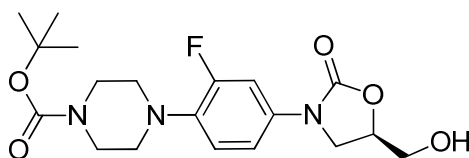
Rf 0,43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,38-7,24 (m, 6H, CH<sub>ar</sub>), 6,94 (dd, 1H, J = 1,6, 9,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,83 (t, 1H, J = 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,58 (s<sub>i</sub>, 1H, NH), 5,17 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3,55 (t, 4H, J = 5,0 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,94 (t, 4H, J = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) δ -120,93. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 154,9 (C=O), 153,4 (C=O), 136,1, 128,9, 128,6, 128,5, 119,9, 114,7, 108,3, 104,6, 80,1, 67,4, 51,1, 28,7. SM *m/z* 330,2 [M-Boc]<sup>+</sup>, 374,2 [M-tBu]<sup>+</sup>, 430,2 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-(4-Benzyloxycarbonylamino-2-fluoro-phényl)-morpholine 148.** Le carbamate **148** est préparé en suivant la procédure générale 7, à partir du composé nitré **145** (1,00 g, 4,42 mmol). Le résidu est adsorbé sur silice. Une chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, puis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 8/2) permet de purifier le carbamate **148** (1,07 g, 3,26 mmol, rdt 74 %), isolé sous la forme d'un solide blanc.

**148**

Rf 0,86 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone, 95/5). RMN <sup>1</sup>H (acétone-d<sub>6</sub>) δ 8,76 (s<sub>i</sub>, 1H), 7,31-7,49 (m, 6H), 7,21 (d, 1H, J = 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,98 (t, 1H, J = 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 5,17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Bz), 3,76 (t<sub>i</sub>, 4 H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,98 (t<sub>i</sub>, 4 H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>19</sup>F (acétone-d<sub>6</sub>) δ -122,9 (1F, J = 10,1, 14,7 Hz). RMN <sup>13</sup>C (acétone-d<sub>6</sub>) δ 155,2, 152,7, 146,7, 141,5, 121,9, 118,6, 113,1, 112,9, 67,2, 50,9. SM *m/z* 331,2 [M+H]<sup>+</sup>.

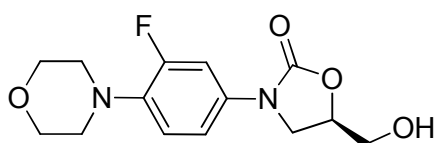
**4-(2-fluoro-4-(5-(hydroxyméthyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)phényl)pipérazine-1-carboxylate de (R)-tert-butyle 149.** L'oxazolidinone **149** est préparée en suivant la procédure générale 8, à partir du carbamate **147** (860 mg, 2,00 mmol). Elle est obtenue sous la forme d'un solide blanc (566 mg, 1,44 mmol, rdt 72 %).



**149**

Rf 0,05 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,43 (dd, 1H, J = 2,4, 14 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,10 (ddd, 1H, J = 0,8, 1,6, 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,93 (t, 1H, J = 9,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 4,75-4,69 (m, 1H, CH), 4,00-3,90 (m, 3H), 3,73 (di, 1H, J = 12Hz), 3,57 (ti, 4H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,97 (ti, 4H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,46 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) δ -120,27. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 157,0 (C=O), 154,7, 154,5, 119,6, 114,0, 107,8, 107,6, 80,1, 72,9, 63,0, 50,9, 46,6, 28,6. SM m/z 296,0 [M-Boc]<sup>+</sup>, 340,2 [M-tBu]<sup>+</sup>, 418,2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**(R)-3-(3-fluoro-4-morpholinophényl)-5-(hydroxyméthyl)oxazolidin-2-one 150.** L'oxazolidinone **150** est préparée en suivant la procédure générale 8, à partir du carbamate **148** (640 mg, 1,94 mmol). Elle est obtenue sous la forme d'un solide blanc (410 mg, 1,38 mmol, rdt 71 %).

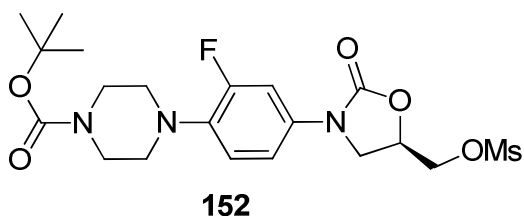


**150**

Rf 0,05 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,43 (dd, 1H, J = 2,8, 14Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,10 (dd, 1H, J = 1,6, 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,93 (t, 1H, J = 9,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 4,74-4,69 (m, 1H, CH), 4,00-3,90 (m, 3H), 3,85 (t, 4H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,75 (di, 1H, J = 12 Hz), 3,04 (t, 4H, J = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) δ -120,27. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 157,0 (C=O), 154,7, 154,5, 136,5, 136,4, 133,6, 133,5, 119,2, 114,1, 107,8, 107,6, 72,9, 67,1, 63,0, 51,3, 46,6. SM m/z 297,0 [M+H]<sup>+</sup>.

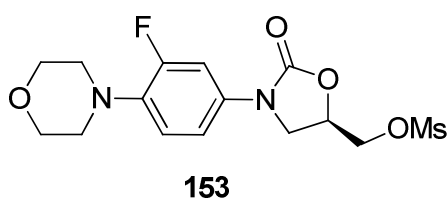


**4-(2-Fluoro-4-(5-(((méthylsulfonyl)oxy)méthyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)phényl)pipérazine-1-carboxylate de (*R*)-*tert*-butyle 152.** Le mésylate **152** est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle (608 mg, 1,28 mmol, rdt 94 %) en suivant la procédure générale 9, à partir de l'alcool **149** (550 mg, 1,36 mmol).



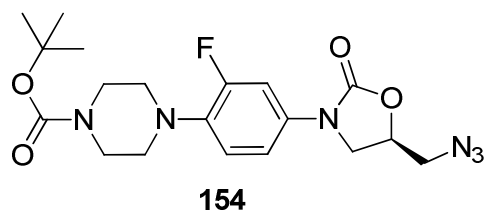
Rf 0,91 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,43 (dd, 1H, J = 2,4, 14 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,07 (dd, 1H, J = 1,6, 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,97 (t, 1H, J = 9,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 4,92-4,86 (m, 1H, CH), 4,47 (dd, 1H, J = 3,6, 12 Hz, CH<sub>2</sub>), ), 4,39 (dd, 1H, J = 4,0, 12 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,09 (t, 1H, J = 9,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,90 (dd, 1H, J = 6,0, 9,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,59 (t, 4H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,99 (t, 4H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,46 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>19</sup>F (DMSO-d<sub>6</sub>) δ -119,67. RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157,0 (C=O), 154,7, 153,7, 120,0, 114,2, 108,0, 107,8, 69,6, 68,1, 50,9, 46,6, 38,1, 28,6. SM *m/z* 374,0 [M-Boc]<sup>+</sup>, 418,0 [M-*t*Bu]<sup>+</sup>, 496,2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Méthanésulfonate de (*R*)-(3-(3-fluoro-4-morpholinophényl)-2-oxooxazolidin-5-yl)méthyle 153.** Le mésylate **153** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (282 mg, 0,75 mmol, rdt 83 %) en suivant la procédure générale 9, à partir de l'alcool **150** (275 mg, 0,91 mmol).



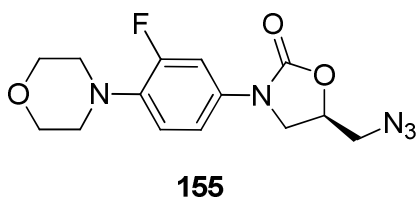
Rf 0,80 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 9/1). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,49 (dd, 1H, J = 2,8, 14Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,20 (dd, 1H, J = 1,6, 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,07 (t, 1H, J = 9,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 5,02-4,96 (m, 1H, CH), 4,48 (dd, 1H, J = 3,2, 12 Hz, CH<sub>2</sub>), ), 4,39 (dd, 1H, J = 5,2, 12 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,15 (t, 1H, J = 9,6 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,80 (dd, 1H, J = 6,0, 9,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,73 (t, 4H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,96 (t, 4H, J = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>19</sup>F (DMSO-d<sub>6</sub>) δ -121,23 (1F, J = 4,2, 16 Hz). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 155,7 (C=O), 153,6, 153,3, 135,6, 133,1, 119,2, 114,1, 106,8, 106,6, 69,9, 69,6, 66,1, 50,6, 45,9, 36,7. SM *m/z* 375,0 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-(4-(5-(Azidométhyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-fluorophényl)pipérazine-1-carboxylate de (R)-tert-butyle 154.** L'azoture **154** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (85 mg, 0,20 mmol, rdt 98 %) en suivant la procédure générale 10, à partir du mésylate **152** (100 mg, 0,21 mmol).



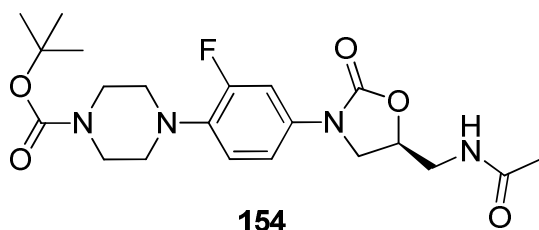
Rf 0,56 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone, 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,42 (dd, 1H, J = 2,4, 14 Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,09 (dd, 1H, J = 1,6, 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,93 (t, 1H, J = 9,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 4,78-4,72 (m, 1H, CH), 4,02 (t, 1H, J = 9,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,79 (dd, 1H, J = 6,0, 8,8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,67 (dd, 1H, J = 4,8, 13 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,59-3,54 (m, 5H), 2,98 (t, 4H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,46 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) δ -119,96. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 157,1 (C=O), 154,9, 154,0, 119,8, 114,2, 107,9, 107,7, 80,2, 70,8, 53,3, 50,9, 47,7, 28,6. SM *m/z* 421,2 [M+H]<sup>+</sup>.

**(R)-5-(Azidométhyl)-3-(3-fluoro-4-morpholinophényl)oxazolidin-2-one 155.** L'azoture **155** est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle (86,7 mg, 0,27 mmol, rdt 100 %) en suivant la procédure générale 10, à partir du mésylate **153** (100 mg, 0,27 mmol).



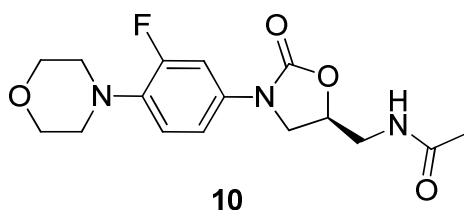
Rf 0,66 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 95/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,41 (dd, 1H, J = 2,8, 14Hz, CH<sub>ar</sub>), 7,09 (dd, 1H, J = 1,6, 8,8 Hz, CH<sub>ar</sub>), 6,92 (t, 1H, J = 9,2 Hz, CH<sub>ar</sub>), 4,78-4,72 (m, 1H, CH), 4,02 (t, 1H, J = 9,6 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,84 (t, 4H, J = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,79 (dd, 1H, J = 6,0, 8,8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,67 (dd, 1H, J = 4,4, 13 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,55 (dd, 1H, J = 4,4, 13 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,03 (t, 4H, J = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) δ -120,13. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 156,9 (C=O), 154,5, 154,0, 133,1, 119,2, 114,1, 107,8, 107,6, 70,7, 67,1, 53,2, 51,2, 47,7. SM *m/z* 322,2 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-(4-(5-(Acétamidométhyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-fluorophényl)pipérazine-1-carboxylate de (S)-*tert*-butyle 157.** L'analogue du linézolide **157** est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle (63,0 mg, 0,14 mmol) en suivant la procédure générale 11, à partir de l'azoture **154** (93,8 mg, 0,24 mmol). Le produit n'a pas été isolé.



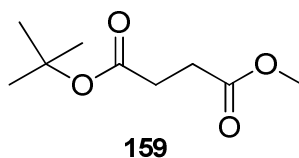
Rf 0,80 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1). SM *m/z* 437,2 [M+H]<sup>+</sup>.

**Linézolide 10.** Le linézolide **10** est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle (30,0 mg, 0,09 mmol) en suivant la procédure générale 11, à partir de l'azoture **155** (50,0 mg, 0,15 mmol). Le produit n'a pas été isolé.



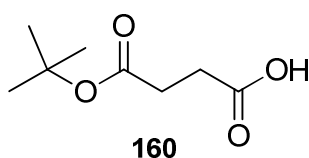
Rf 0,85 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 9/1). SM *m/z* 338,2 [M+H]<sup>+</sup>.

**Acide *tert*-butyl méthylsuccinique 159.** Un mélange de chlorure de méthylsuccinyle (10,0 mL, 79 mmol, 1,0 eq), de *tert*-butanol (15,0 mL, 157 mmol, 2,0 eq) et de pyridine (10,0 mL, 118 mmol, 1,5 eq) dans du chloroforme (20 mL) est chauffé à 65 °C pendant 12 h. Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante et dilué avec de l'éther diéthylique (200 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'HCl 1 N (150 mL), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/Et<sub>2</sub>O, 3/1) pour conduire au diester **159** sous la forme d'un liquide incolore (10,9 g, 58,0 mmol, rdt 74 %).



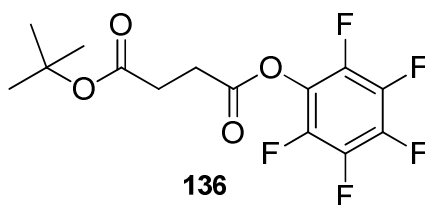
Rf 0,88 (Et<sub>2</sub>O/cyclohexane, 8/2). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 3.64 (s, 3H), 2.55-2.47 (m, 4H), 1.40 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,0, 171,6, 80,9, 51,8, 30,5, 29,3, 28,2.

**tert-Butylhémisuccinate 160.** À un mélange du diester **159** (5,0 g, 26,6 mmol, 1,0 eq) dans du THF (135 mL) est ajoutée une solution aqueuse de NaOH 0,6 M (55 mL, 33, mmol, 1,2 eq). Le milieu réactionnel est agité à 22 °C pendant 12 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 × 100 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite pour conduire au *tert*-butylhémisuccinate **160** sous la forme de cristaux blancs (4,4 g, 23,4 mmol, rdt 88 %).



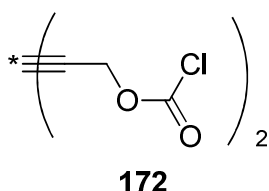
Rf 0,42 (AcOEt/cyclohexane, 5/5). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,60-2,51 (m, 4H), 1,41 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 177,2, 172,7, 81,3, 30,1, 29,6, 28,3.

**Ester *tert*-butyl-pentafluorophényle de l'acide succinique 136.** Un mélange de *tert*-butylhémisuccinate **160** (790 mg, 4,54 mmol, 1,1 eq), de pentafluorophénol (750 mg, 4,07 mmol, 1,0 eq) et d'EDCI (990 mg, 5,16 mmol, 1,2 eq) dans du THF (50 mL) est agité à 22 °C pendant 12 h. Le milieu réactionnel est adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/Et<sub>2</sub>O, 9/1) pour conduire à l'ester activé **136** (1,23 g, 3,60 mmol, rdt 80 %) sous la forme d'une huile blanche qui cristallise à froid.



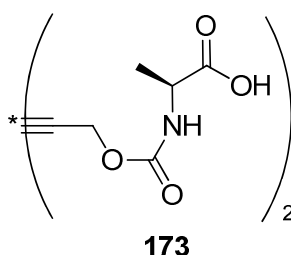
Rf 0.52 (AcOEt/cyclohexane, 2/8). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,91 (t, J = 4,0 Hz, 2H), 2,66 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 170,7, 168,7, 142,6, 140,1, 139,3, 136,8, 125,5, 121,8, 81,6, 30,3, 28,8, 28,2. RMN <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>) δ -152,5 - -152,6 (2F), -158,1 (1F, J = 23,4 Hz), -162,4 - -162,5 (2F, m). SM *m/z* 340,1 [M+H]<sup>+</sup>.

**Bichloroformiate de but-2-ynyl (BbcCl) 172.**<sup>422</sup> La pyridine anhydre (0,77 mL, 9,60 mmol, 3,2 eq) est ajoutée goutte à goutte à une solution de triphosgène (2,00 g, 6,60 mmol, 2,2 eq) dans du THF (15 mL) placée sous atmosphère d'argon et refroidie à 0 °C par un bain de glace. À cette suspension jaune pâle est ajoutée goutte à goutte une solution de 1,4-dihydroxybutyne (0,26 g, 3,00 mmol, 1,0 eq) dans du THF. La suspension blanche est agitée pendant 1h30 à 0-5 °C, puis le milieu réactionnel est dilué avec de l'éther diéthylique (40 mL). Une solution aqueuse d'HCl 0,2 N (40 mL) est ajoutée avec précaution, puis la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (40 mL). La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner le chloroformiate **172** sous la forme d'un liquide jaune pâle (0,64 g, 3,00 mmol, rdt 100 %).



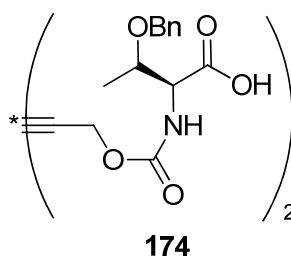
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 4,90 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 150,6 (C=O), 81,2, 58,3.

**N-Bbc-alanine 173.** La *N*-Bbc-alanine **173** est préparée en suivant la procédure générale 12, à partir de (L)-alanine (180 mg, 2,00 mmol) et de BbcCl **172** (211 mg, 1,00 mmol). La *N*-Bbc-alanine **173** (250 mg, 0,79 mmol, rdt 79 %) est obtenue sous la forme d'un solide blanc.



Rf 0,03 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone, 95/5). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 6,57 (di, 1H, J = 6,0 Hz, NH), 4,64-4,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,13 (quint, 1H, J = 8,0 Hz, CH), 1,29 (d, 3H, J = 7,6 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 174,5 (C=O), 156,0 (C=O), 82,0, 67,8, 52,8, 50,3, 18,0. SM *m/z* 317,0 [M+H]<sup>+</sup>.

**N-Bbc-O-benzylthréonine 174.** La *N*-Bbc-*O*-benzylthréonine **174** est préparée en suivant la procédure générale 12, à partir de la *O*-benzyl-(L)-thréonine (1,30 g, 6,03 mmol) et de BbcCl **172** (0,64 g, 3,02 mmol). La *N*-Bbc-*O*-benzylthréonine **174** (1,68 g, 3,02 mmol, rdt 100 %) est obtenue sous la forme d'une huile incolore.



Rf 0,07 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone, 95/5). RMN <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 7,34-7,22 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>), 4,77-4,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,55 (dd, 2H, J = 11,9, 62 Hz, CH<sub>2</sub>Bz), 4,35-4,33 (m, 1H, CH<sub>Thr</sub>), 4,23 (qd, 1H, J = 2,8, 6,4 Hz, OCH), 1,24 (d, 6H, J = 6,3 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 172,0 (C=O), 156,8 (C=O), 139,6, 129,0, 128,3, 128,2, 82,0, 75,6 (OCH), 71,6 (CH<sub>2</sub>Bz), 59,6 (CH<sub>Thr</sub>), 53,1 (CH<sub>2</sub>), 16,7 (CH<sub>3</sub>). SM *m/z* 557,2, 558,2 [M+H]<sup>+</sup>.

### III. Matériels et méthodes biologiques

#### A. ITC

**Interaction TonB-boîte TonB de FpvA.** La protéine 6His-TonB<sub>pp</sub> a été exprimée et purifiée comme décrit précédemment.<sup>231</sup> Le peptide contenant la boîte TonB du transporteur FpvA, ADSSVDLGATMITSN, a été fourni par GeneCust. Les mesures ont été réalisées sur un calorimètre MicroCalVP-ITC. Le fragment peptidique de FpvA (100 μM, Tp Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M) est ajouté à 6His-TonB<sub>pp</sub> (1,0 μM, Tp Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M) par injections de 10 μL toutes les 4 min pendant 24 min, puis par injections de 30 μL pendant 28 min, à 25 °C. Les données ont été traitées avec Origin.

#### B. Polarisation de fluorescence

**Souches et conditions de culture.** Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont listés dans le tableau 6. Le milieu Luria-Bertani (Difco) et agar (Difco) ont été employés comme milieu riche de culture. L'antibiotique ampicilline (100 μg/mL) a été ajouté au milieu de culture quand cela était nécessaire. Les produits chimiques ont été achetés au fournisseur Sigma.

Souche ou plasmide	Caractéristiques	Source ou référence
<b>Souche de <i>P. aeruginosa</i></b>		
PAO1	Souche sauvage	433
<b>Souches d'<i>E. coli</i></b>		
TOP10	<i>supE44 DlacU169 (ϕ80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Invitrogen
<b>Plasmides</b>		
pET19b	Vecteur d'expression pour <i>E. coli</i> ; Amp <sup>R</sup> , <i>LacI</i> T7-ϕ 10 <i>lacO</i> s10× His-tag	Invitrogen
pET19b-mCHE-TonB <sub>pp</sub>	Amp <sup>R</sup> , TonB(E200-STOP) dans pET19b	Cette étude

**Tableau 6** : Souches et plasmides utilisés dans cette étude.

**Construction du plasmide d'expression pET19b-mCHE-TonB<sub>pp</sub>.** Toutes les enzymes de modification proviennent de Fermentas et ont été utilisées selon les recommandations du fournisseur. La souche d'*Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) a été utilisée comme souche receveuse. L'amplification des gènes a été réalisée par PCR, en utilisant la polymérase *iProof* (BioRad). Afin d'obtenir l'expression d'une protéine TonB tronquée à partir du résidu E200 et comportant une étiquette 10 Histidines suivie du rapporteur fluorescent mCHERRY en N-terminal, la stratégie suivante a été suivie. L'ADN codant pour la partie C-terminale de TonB a été obtenue par amplification à partir de l'ADN génomique de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 à l'aide des oligonucléotides AAAAATCGATGAACCCGAGCCGAGCACG, s'hybridant au niveau du codon correspondant au résidu E200 de la protéine TonB et insérant un site de restriction *Clal* en amont, et AAAGTCGACTCAGCGGCGCTTCTCGAT, insérant un site *Sall* en aval du codon STOP. L'ADN codant pour la protéine fluorescente mCHERRY a été amplifié à partir de l'ADN circulaire correspondant (pCDNA3.1/mCHERRY) à

l'aide du couple d'oligonucléotides AAAACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG et AAAATCGATCTTGTACAGCTCGTCCAT insérant respectivement les sites de restriction *NdeI* et *Clal*. Les deux fragments ont été digérés par *Clal* puis ligaturés en proportions équimolaires. Le mélange réactionnel a ensuite été utilisé comme matrice pour une amplification avec les oligonucléotides externes (AAAAATCGATGAACCCGAGCCGAGCACG et AAAATCGATCTTGTACAGCTCGTCCAT). Le produit de PCR a été digéré par les enzymes *NdeI* et *SalI* puis ligaturé dans le vecteur pET19b linéarisé par les enzymes *NdeI* et *XhoI*.

**Expression et purification de mCHE-TonB<sub>pp</sub> étiquetée histidine.** Une culture de BL21(DE3) transformée par le plasmide pET19b-mCHE-TonB<sub>pp</sub>, en milieu riche supplémenté par de l'ampicilline, a été incubée pendant 16 h à 37 °C puis diluée au 1/50<sup>ème</sup> dans 800 mL du même milieu sélectif. Après avoir atteint une DO<sub>600</sub> de 0,6, la biosynthèse de la protéine a été induite par l'ajout de 500 µL d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Euromedex) au milieu puis l'incubation prolongée de 3 h à 37 °C. Les cellules ont été collectées par centrifugation à 5000 × *g* pendant 10 min puis resuspendues dans 50 mL d'un tampon composé de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Une tablette de Complete Protease Inhibitor (Roche) et 0,5 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle ont été ajoutés puis les cellules ont été lysées par sonication. Les débris cellulaires ainsi que les membranes ont été enlevés par centrifugation respectivement à 9,600 × *g* pendant 10 min et 113,600 × *g* pendant 90 min. Le surnageant a été appliqué sur une colonne HisTrap acide Ni-nitrilotriacétique prééquilibrée avec un tampon contenant 50 mM Tris-Cl (pH 8,0) et 10 mM d'imidazole. Les protéines liées spécifiquement à la colonne ont été éluées par un tampon composé de Tris-Cl (pH 8) à 50 mM supplémenté par 300 mM d'imidazole. La pureté de l'échantillon a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

**Interaction TonB-FpvA.** La protéine FpvA a été exprimée et purifiée comme décrit précédemment.<sup>379</sup> Les mesures de polarisation de fluorescence ont été réalisées à 22 °C dans des plaques 96 puits Costar Half Area Black avec un lecteur de plaques VICTOR3 (Perkin Elmer). Dans la première expérience, FpvA et mCHE-TonB<sub>pp</sub> ont été déposés dans la plaque à des concentrations respectives de 1 µM (~ *K<sub>D</sub>*) et 100 nM, dans une solution tampon Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, 0,8 % OPOE. Dans la seconde, une double gamme de concentration a été réalisée en fixant la concentration de FpvA à 1 µM alors que celle de



mCHE-TonB<sub>pp</sub> variait de 1 ; 4 ; 16 ; 62,5 ; 250 à 1000 nM d'une part, puis en fixant la concentration de TonB à 100 nM alors que celle de FpvA variait de 0,05 ; 0,2 ; 0,85 ; 3,4 ; 14 à 55 µM. Les barres d'erreur ont été calculées en répétant quatre fois l'expérience pour des concentrations de 62,5 nM pour mCHE-TonB<sub>pp</sub>, et à 0,85 µM pour FpvA.

## C. SPR

**Mesures d'interaction directe de GST-TonB<sub>pp</sub> avec FpvA, Pep1 et Pep2.** Les protéines GST-TonB<sub>pp</sub> (45 kDa) et FpvA (90 kDa) ont été exprimées et purifiées comme décrit précédemment.<sup>231, 379</sup> Les peptides contenant la boîte TonB du transporteur FpvA, ADSSVDLGATMITSN (Pep1, 1500 Da) et GATMITS (Pep2, 700 Da), ont été fournis par GeneCust. Les analyses SPR ont été réalisées à 25 °C en utilisant un instrument Biacore T100, sur des capteurs de surface sCM4 (BR-100534). Les anticorps anti-GST (GST Capture kit BR-10002-23) ont été immobilisés sur deux canaux du capteur de surface par leurs fonctions amine (Amine coupling kit BIACORE BR-1000-50). L'un des canaux a été utilisé pour la capture de GST-TonB<sub>pp</sub> (300 à 465 RU), alors que le second a servi de référence avec une quantité similaire de GST. Le tampon de course HBS (10 mM Hepes pH=7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, 0.005 % (v/v) tween 20) a été utilisé pour les immobilisations. Un tampon Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, OPOE 0,8 % (TNOP) a été utilisé lors des analyses d'interaction. FpvA (concentrations de 0,34 ; 0,69 ; 1,37 ; 2,75 ; 5,5 à 11 µM) a été injecté durant 120 s sur les surfaces GST-TonB<sub>pp</sub>. Les peptides Pep1 et Pep2 ont été testés aux concentrations de 0,3 ; 0,7 ; 1,5 ; 3,0 ; 6,0 ; 12 ; 25 ; 50 ; 100 µM et de 1, 10 ; 100 µM respectivement. Chaque injection d'analyte est suivie d'une phase de lavage de 300 s avec du tampon TNOP. La régénération des surfaces d'anticorps anti-GST a été effectuée entre chaque série de mesure par une injection de glycine (10 mM, pH 2,2) pendant 1 min, suivie d'une injection de GST-TonB<sub>pp</sub> pour renouveler la surface.

**Analyses des données.** Les données collectées pour la surface GST-TonB<sub>pp</sub> ont été traitées en utilisant la méthode du double référencement.<sup>434</sup> Chaque série de courbes correspondant aux injections de FpvA, Pep1 et Pep2 à différentes concentrations sur la même surface a été superposée aux courbes théoriques correspondant à un modèle de Langmuir 1:1 (logiciel BIAevaluation 3.1). Les constantes de dissociation à l'équilibre ont été déterminées en

traçant la quantité d'analyte lié à TonB à l'équilibre ( $R_{eq}$ ) en fonction de la concentration d'analyte. Les courbes expérimentales correspondaient bien au modèle d'interaction 1:1 défini par l'expression (4) :

$$R_{eq} = R_{max} \times \frac{C}{C+K_D} \quad (4)$$

où  $R_{eq}$  est la réponse à l'équilibre,  $R_{max}$  la réponse à saturation,  $C$  la concentration d'analyte et  $K_D$  la constante d'affinité.

**Simulations de tests de compétition.** Les simulations des profils de liaison de FpvA/GST-TonB<sub>pp</sub> en présence de concentrations croissantes de compétiteur ( $C = 0 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000$  nM) ont été réalisées avec le logiciel BIAevaluation grâce au modèle mathématique "*competing reactions*". 100 RU de GST-TonB<sub>pp</sub> sont immobilisés. La concentration de FpvA ( $M = 90$  kDa) est fixée à  $3 \mu\text{M}$  ( $\sim 0,5 K_D$ ). Les paramètres cinétiques de l'interaction TonB-FpvA,  $k_a$  et  $k_d$ , sont estimés à  $3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $2 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  respectivement, pour une constante d'affinité calculée à  $K_D = k_d / k_a = 6,7 \mu\text{M}$ . Les paramètres cinétiques de l'interaction TonB-compétiteur,  $k_a$  et  $k_d$ , varient de  $10^6$ ,  $10^5$  à  $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et de  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  à  $10^{-1} \text{ s}^{-1}$  respectivement. La masse moléculaire du compétiteur utilisé pour la simulation est de 900 Da, et le temps de contact de 300 s.

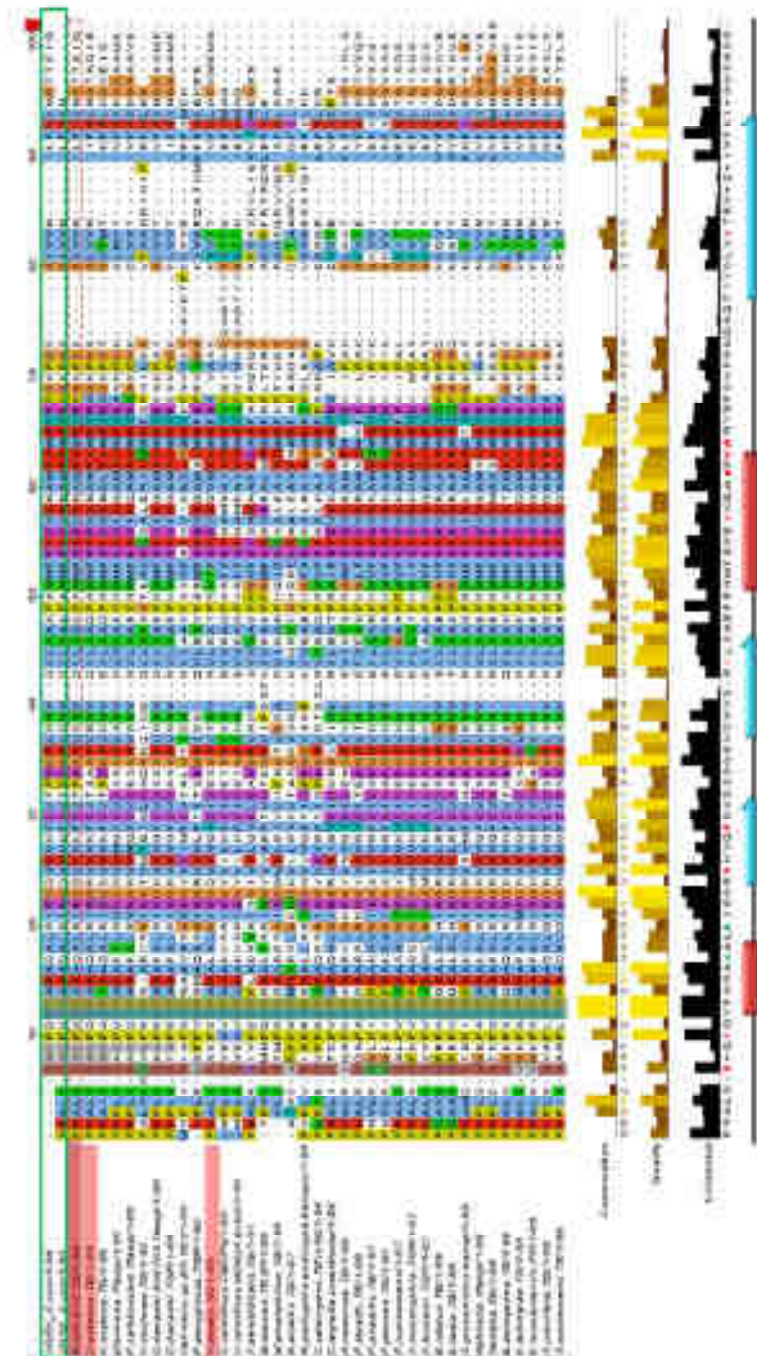
**Tests de compétition.** Des quantités croissantes de peptides Pep1 (1,5 ; 3 ; 6 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100  $\mu\text{M}$ ) ou Pep2 (1 ; 10 ; 100  $\mu\text{M}$ ) ont été mélangées avec une concentration constante de FpvA (2,25  $\mu\text{M}$ , correspondant à  $K_D/2$ ). Les mélanges FpvA-peptides ou FpvA ont été injectés sur une surface GST-TonB<sub>pp</sub> pour mesurer l'inhibition de l'interaction GST-TonB<sub>pp</sub>/FpvA par les peptides.



# **Annexes**



# Annexe 1



Alignement multiple des séquences des domaines C-terminaux des protéines TonB de divers microorganismes. Les résidus sont colorés selon le code ClustalX. La prévision de la structure secondaire a été déterminée à partir de la séquence consensus : les rectangles rouges sont les hélices  $\alpha$ , et les flèches bleues les feuillets  $\beta$ . Les résidus conservés de la poche hydrophobe identifiée dans la protéine TonB de *E. coli* sont écrits en rouge dans la séquence consensus, ceux qui seront ciblés avec les hétérocycles sont en vert.

## Annexe 2

Abréviation	Nom complet	Abréviation	Nom complet
<i>A.nasoniae</i>	<i>Arsenophonus nasoniae</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>B.cenocepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i> H111	<i>P.carotovorum</i>	<i>Pectobacterium</i> <i>carotovorum</i>
<i>Brenneria</i>	<i>Brenneria sp</i> EniD312	<i>P.luminescens</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>C.Regiiella</i> <i>insecticola</i>	<i>Candidatus Regiella</i> <i>insecticola</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>C.salexigens</i>	<i>Chromohalobacter</i> <i>salexigens</i>	<i>P.penneri</i>	<i>Proteus penneri</i>
<i>D.dadantii</i>	<i>Dickeya dadantii</i>	<i>P.stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>D.dadantii.Ech703</i>	<i>Dickeya dadantii</i> Ech703	<i>R.pachyptila.endosy</i> <i>mb</i>	<i>Endosymbiont of Riftia</i> <i>pachyptila</i>
<i>E.aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	<i>Rahnella.sp.Y9602</i>	<i>Rahnella.sp.Y9602</i>
<i>E.billigiae</i>	<i>Erwinia billingiae</i> Eb661	<i>S.enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>E.coli K12</i>	<i>Escherichia coli</i> K12	<i>S.glossinidius</i>	<i>Sodalis glossinidius</i>
<i>E.ictaluri</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>E.tarda</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>S.odorifera</i>	<i>Serratia odorifera</i>
<i>E.tasmaniensis</i>	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia</i>
<i>K.oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>T.denitrificans</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
<i>M.alcaliphilum</i>	<i>Methylomicrobium</i> <i>alcaliphilum</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>M.stanieri</i>	<i>Marinobacterium stanieri</i> S30	<i>V.vulnificus.CMCP6</i>	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6
<i>N.mobilis</i>	<i>Nitrococcus mobilis</i>	<i>V.vulnificus.MO624</i>	<i>Vibrio vulnificus</i> MO624
		<i>X.bovienii</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
		<i>X.nematophila</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
		<i>Y.pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>

Liste des espèces bactériennes utilisées pour l'alignement multiples des séquences des protéines TonB.

## Annexe 3

Transporteurs	
<b>BtuB</b>	cobalamine
<b>FecA</b>	citrate
<b>FemA</b>	mycobactine
<b>FepA</b>	entérobactine
<b>FhuA</b>	ferrichrome
<b>FptA</b>	pyochéline
<b>FpvA</b>	pyoverdine
<b>HasR</b>	hème
<b>Vbt</b>	vibriobactine
<b>Ybt</b>	yersiniabactine
<b>Cu</b>	cuivre
<b>Rec</b>	TME non défini

Espèces bactériennes	
<b>Ab</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>Bme</b>	<i>Brucella melitensis</i>
<b>Bcen</b>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
<b>Bm</b>	<i>Burkholderia mallei</i>
<b>Bmu</b>	<i>Burkholderia multivorans</i>
<b>Bp</b>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<b>Ec</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Kp</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>Pa</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Se</b>	<i>Salmonella enterica</i>
<b>Vc</b>	<i>Vibrio cholerae</i>
<b>Yp</b>	<i>Yersinia pestis</i>

Liste des transporteurs de membrane externe et des espèces bactériennes utilisées pour l'alignement multiples des séquences des boîtes TonB.





# **Références bibliographiques**



0. Altermann, W., The early earth's record of supposed extremophilic bacteria and cyanobacteria, at 3,8 to 2,5 Ga. *Cell. Origin Life Extreme Habitats Astrobiol.* **2007**, 11, 761-778.
1. Porter, J. R., Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological Reviews* **1976**, 40, (2), 260-269.
2. Nobel lectures, Physiology or Medicine 1901-1921. Amsterdam, 1967.
3. Ishige, T.; Honda, K.; Shimizu, S., Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, (2), 174-180.
4. Bardy, S. L.; Ng, S. Y. M.; Jarrell, K. F., Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **2003**, 149, (2), 295-304.
5. Nicholson, W. L.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H. J.; Setlow, P., Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2000**, 64, (3), 548-572.
6. Norris, V.; den Blaauwen, T.; Cabin-Flaman, A.; Doi, R. H.; Harshey, R.; Janniere, L.; Jimenez-Sanchez, A.; Jin, D. J.; Levin, P. A.; Mileykovskaya, E.; Minsky, A.; Saier, M.; Skarstad, K., Functional Taxonomy of Bacterial Hyperstructures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2007**, 71, (1), 230-253.
7. Denamur, E.; Matic, I., Evolution of mutation rates in bacteria. *Molecular Microbiology* **2006**, 60, (4), 820-827.
8. Davison, J., Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid* **1999**, 42, (2), 73-91.
9. O'Hara, A. M.; Shanahan, F., The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Report* **2006**, 7, (7), 688-693.
10. Slack, P., The black death past and present. 2. Some historical problems. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1989**, 83, (4), 461-463.
11. Bossi, P.; Guihot, A.; Bricaire, F., Infections émergentes ou ré-émergentes utilisables pour le bioterrorisme. *La Presse Médicale* **2005**, 34, 149-155.

12. Convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes bactériologiques (biologiques) ou à toxines et sur leur destruction, Convention de Genève, 1972.
13. Meselson, M.; Guillemin, J.; Hugh-Jones, M.; Langmuir, A.; Popova, I.; Shelokov, A.; Yampolskaya, O., The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* **1994**, 266, (5188), 1202-1208.
14. Raoult, D., Rapport de Mission sur le bioterrorisme. In 2003.
15. <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
16. Dennis, D. T.; Inglesby, T. V.; Henderson, D. A.; et al., Tularemia as a biological weapon: Medical and public health management. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **2001**, 285, (21), 2763-2773.
17. Franz, D. R.; Jahrling, P. B.; Friedlander, A. M.; et al., Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **1997**, 278, (5), 399-411.
18. Wiersinga, W. J.; van der Poll, T.; White, N. J.; Day, N. P.; Peacock, S. J., Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat Rev Micro* **2006**, 4, (4), 272-282.
19. Stone, R., Racing to Defuse a Bacterial Time Bomb. *Science* **2007**, 317, (5841), 1022-1024.
20. Waksman, S. A., What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia* **1947**, 39, (5), 565-9.
21. Schatz, A.; Bugie, E.; Waksman, S. A., Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1944**, 55, 66-9.
22. Chain, E.; Florey, H. W.; Adelaide, M. B.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A. G., Penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1993**, (295), 3-7.

23. Domagk, G., Sulfonamides in the past, present and future. *Minerva Medica* **1950**, 41, (35), 41-7.
24. Kaminsky, D.; Meltzer, R. I., Quinolone antibacterial agents. Oxolinic acid and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **1968**, 11, (1), 160-3.
25. Bryan, Nuclear Analogues of B-Lactam Antibiotics. 2. The Total Synthesis of 8-Oxo-4-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2- carboxylic Acids. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 99, (7), 2353-2355.
26. Slee, A. M.; Wuonola, M. A.; McRipley, R. J.; Zajac, I.; Zawada, M. J.; Bartholomew, P. T.; Gregory, W. A.; Forbes, M., Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1987**, 31, (11), 1791-7.
27. Walsh, C., Where will new antibiotics come from? *Nature Review Microbiology* **2003**, 1, (1), 65-70.
28. Clatworthy, A. E.; Pierson, E.; Hung, D. T., Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology* **2007**, 3, (9), 541-8.
29. Bugg, T. D. H.; Braddick, D.; Dowson, C. G.; Roper, D. I., Bacterial cell wall assembly: Still an attractive antibacterial target. *Trends in Biotechnology* **2011**, 29, (4), 167-173.
30. Zapun, A.; Contreras-Martel, C.; Vernet, T., Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews* **2008**, 32, (2), 361-85.
31. Walsh, C., Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **2000**, 406, (6797), 775-81.
32. Mingeot-Leclercq, M. P.; Glupczynski, Y.; Tulkens, P. M., Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, 43, (4), 727-37.
33. Kondo, S.; Hotta, K., Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *Journal of Infection and Chemotherapy* **1999**, 5, (1), 1-9.
34. Rodnina, M. V.; Wintermeyer, W., Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annual Review of Biochemistry* **2001**, 70, 415-35.

35. Davis, B. D., Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* **1987**, 51, (3), 341-50.
36. Francois, B.; Russell, R. J.; Murray, J. B.; Aboul-ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E., Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Research* **2005**, 33, (17), 5677-90.
37. Ritter, T. K.; Wong, C. H., Carbohydrate-Based Antibiotics: A New Approach to Tackling the Problem of Resistance. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, (19), 3508-3533.
38. Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V., Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **2000**, 407, (6802), 340-8.
39. Shaw, K. J.; Barbachyn, M. R., The oxazolidinones: past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2011**, 1241, (1), 48-70.
40. Brickner, S. J.; Barbachyn, M. R.; Hutchinson, D. K.; Manninen, P. R., Linezolid (ZYVOX), the First Member of a Completely New Class of Antibacterial Agents for Treatment of Serious Gram-Positive Infections. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51, (7), 1981-1990.
41. Renslo, A. R., Antibacterial oxazolidinones: emerging structure-toxicity relationships. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2010**, 8, (5), 565-574.
42. Koga, H.; Itoh, A.; Murayama, S.; Suzue, S.; Irikura, T., Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *Journal of Medicinal Chemistry* **1980**, 23, (12), 1358-63.
43. Sato, K.; Matsuura, Y.; Inoue, M.; Une, T.; Osada, Y.; Ogawa, H.; Mitsunashi, S., In vitro and in vivo activity of DL-8280, a new oxazine derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1982**, 22, (4), 548-53.
44. Blondeau, J. M., Gatifloxacin: a new fluoroquinolone. *Expert Opinion in Investigational Drugs* **2000**, 9, (8), 1877-95.

45. Nightingale, C. H., Moxifloxacin, a new antibiotic designed to treat community-acquired respiratory tract infections: a review of microbiologic and pharmacokinetic-pharmacodynamic characteristics. *Pharmacotherapy* **2000**, 20, (3), 245-56.
46. Berger, J. M.; Gamblin, S. J.; Harrison, S. C.; Wang, J. C., Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* **1996**, 379, (6562), 225-32.
47. Laponogov, I.; Sohi, M. K.; Veselkov, D. A.; Pan, X. S.; Sawhney, R.; Thompson, A. W.; McAuley, K. E.; Fisher, L. M.; Sanderson, M. R., Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nature Structural and Molecular Biology* **2009**, 16, (6), 667-9.
48. Lee, H.; Lee, K.; Chong, Y., Antimicrobial Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Korea. *J Bacteriol Virol* **2012**, 42, (1), 9-16.
49. Gyssens, I. C., Antibiotic policy. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2011**, 38, Supplement, 11-20.
50. Hamouda, A.; Findlay, J.; Amyes, S. G. B., Carbapenems: do they have a future? *Journal of Medical Microbiology* **2011**, 60, (9), 1229-1230.
51. Nikaido, H., Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry* **2009**, 78, (1), 119-146.
52. Falagas, M. E.; Bliziotis, I. A., Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *International Journal of Antimicrobial Agents* **2007**, 29, (6), 630-636.
53. Kuo, H.-Y.; Chang, K.-C.; Kuo, J.-W.; Yueh, H.-W.; Liou, M.-L., Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2012**, 39, (1), 33-38.
54. Master, R. N.; Clark, R. B.; Karlowsky, J. A.; Ramirez, J.; Bordon, J. M., Analysis of resistance, cross-resistance and antimicrobial combinations for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 1997 to 2009. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2011**, 38, (4), 291-295.
55. Crump, J. A.; Medalla, F. M.; Joyce, K. W.; Krueger, A. L.; Hoekstra, R. M.; Whichard, J. M.; Barzilay, E. J.; Emerging Infections Program, N. W. G., Antimicrobial Resistance among



Invasive Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, 55, (3), 1148-1154.

56. Zaidi, M. B.; Leon, V. n.; Canche, C.; Perez, C.; Zhao, S.; Hubert, S. K.; Abbott, J.; Blickenstaff, K.; McDermott, P. F., Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant bla<sub>CMY-2</sub> *Salmonella Typhimurium* in Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, 60, (2), 398-401.

57. Davies, J., Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **1994**, 264, (5157), 375-82.

58. de Jong, A.; Stephan, B.; Silley, P., Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EU. *Journal of Applied Microbiology* **2011**, 112, (2), 239-245.

59. Su, L.-H.; Chiu, C.-H.; Chu, C.; Ou, J. T., Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. *Clinical Infectious Diseases* **2004**, 39, (4), 546-551.

60. Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Page, C., The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, 1, (11), 895-910.

61. Yoneyama, H.; Katsumata, R., Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2006**, 70, (5), 1060-75.

62. Nikaido, H., Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **1994**, 264, (5157), 382-8.

63. Nikaido, H., Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Microbiologu Review* **2003**, 67, (4), 593-656.

64. Hur, J.; Jawale, C.; Lee, J. H., Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International* **2012**, 45, (2), 819-830.

65. Yasufuku, T.; Shigemura, K.; Shirakawa, T.; Matsumoto, M.; Nakano, Y.; Tanaka, K.; Arakawa, S.; Kinoshita, S.; Kawabata, M.; Fujisawa, M., Correlation of Overexpression of Efflux Pump Genes with Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Strains Clinically Isolated from Urinary Tract Infection Patients. *Journal of Clinical Microbiology* **2011**, 49, (1), 189-194.

66. Li, X.-Z.; Nikaido, H.; Poole, K., Role of MexA-MexB-OprM in Antibiotic Efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, 39, (9), 1948–1953.
67. Kotra, L. P.; Haddad, J.; Mobashery, S., Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, 44, (12), 3249-56.
68. Wright, G. D., Aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology* **1999**, 2, (5), 499-503.
69. Randall, L. P.; Cooles, S. W.; Osborn, M. K.; Piddock, L. J. V.; Woodward, M. J., Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2004**, 53, (2), 208-216.
70. Strahilevitz, J.; Jacoby, G. A.; Hooper, D. C.; Robicsek, A., Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clinical Microbiology Reviews* **2009**, 22, (4), 664-689.
71. Rice, L. B., Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to beta-Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings* **2012**, 87, (2), 198-208.
72. Hooper, D. C., Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* **2001**, 32 Suppl 1, S9-S15.
73. Wencewicz, T.; Möllmann, U.; Long, T.; Miller, M., Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin “Trojan Horse” antibiotics and synthetic desferridanoxamine-antibiotic conjugates. *BioMetals* **2009**, 22, (4), 633-648.
74. Stefani, S.; Bongiorno, D.; Mongelli, G.; Campanile, F., Linezolid Resistance in *Staphylococci*. *Pharmaceuticals* **2010**, 3, (7), 1988-2006.
75. Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J. A.; Charlier, P., The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* **2008**, 32, (2), 234-258.

76. Crichton, R. R., Iron Metabolism – From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences. 2nd Edition ed.; John Wiley & Sons, L: 2001.
77. Kvitko, B. H.; Goodyear, A.; Propst, K. L.; Dow, S. W.; Schweizer, H. P., Burkholderia pseudomallei Known Siderophores and Hemin Uptake Are Dispensable for Lethal Murine Melioidosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2012**, 6, (6), e1715.
78. Schaible, U. E.; Kaufmann, S. H., Iron and microbial infection. *Nature Review Microbiology* **2004**, 2, (12), 946-53.
79. Takase, H.; Nitandai, H.; Hoshino, K.; Otani, T., Requirement of the Pseudomonas aeruginosa tonB Gene for High-Affinity Iron Acquisition and Infection. *Infection and immunity* **2000**, 68, (8), 4498-4504.
80. Liu, P. V.; Shokrani, F., Biological activities of pyochelins: iron-chelating agents of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* **1978**, 22, (3), 878-90.
81. Frederick, R.; Mayfield, J.; DuBois, J., Iron trafficking as an antimicrobial target. *BioMetals* **2009**, 22, (4), 583-593.
82. Vauclair, S., La naissance des éléments, du Big Bang à la Terre. 2006. Édition Odile Jacob Science.
83. Chu, B.; Garcia-Herrero, A.; Johanson, T.; Krewulak, K.; Lau, C.; Peacock, R.; Slavinskaya, Z.; Vogel, H., Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *BioMetals* **2010**, 23, (4), 601-611.
84. Ciurli, S.; Musiani, F., High potential iron–sulfur proteins and their role as soluble electron carriers in bacterial photosynthesis: tale of a discovery. *Photosynthesis Research* **2005**, 85, (1), 115-131.
85. Posey, J. E.; Gherardini, F. C., Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. *Science* **2000**, 288, (5471), 1651-1653.
86. Weinberg, E. D., The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspectives in biology and medicine* **1997**, 40, (4), 578.

87. Ratledge, C.; Dover, L. G., Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology* **2000**, 54, (1), 881-941.
88. Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S., Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, (7), 3584-3588.
89. Andrews, S. C.; Robinson, A. K.; Rodríguez-Quiñones, F., Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **2003**, 27, (2-3), 215-237.
90. Braun, V.; Hantke, K., Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, 15, (2), 328-334.
91. Hantke, K., Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiology Letters* **1987**, 44, (1), 53-57.
92. Kammler, M.; Schön, C.; Hantke, K., Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **1993**, 175, (19), 6212-6219.
93. Wyckoff, E.; Mey, A.; Payne, S., Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *BioMetals* **2007**, 20, (3), 405-416.
94. Wyckoff, E. E.; Mey, A. R.; Leimbach, A.; Fisher, C. F.; Payne, S. M., Characterization of Ferric and Ferrous Iron Transport Systems in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* **2006**, 188, (18), 6515-6523.
95. Perry, R.; Mier, I.; Fetherston, J., Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth. *BioMetals* **2007**, 20, (3), 699-703.
96. Marshall, B.; Stintzi, A.; Gilmour, C.; Meyer, J.-M.; Poole, K., Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology* **2009**, 155, (1), 305-315.
97. Cartron, M. L.; Maddocks, S.; Gillingham, P.; Craven, C. J.; Andrews, S. C., Feo-transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **2006**, 19, (2), 143-157.
98. Velayudhan, J.; Hughes, N. J.; McColm, A. A.; Bagshaw, J.; Clayton, C. L.; Andrews, S. C.; Kelly, D. J., Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Molecular Microbiology* **2000**, 37, (2), 274-286.

99. Schirmer, T., General and Specific Porins from Bacterial Outer Membranes. *Journal of Structural Biology* **1998**, 121, (2), 101-109.
100. Wandersman, C.; Delepelaire, P., Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review of Microbiology* **2004**, 58, (1), 611-647.
101. Postle, K.; Larsen, R., TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *BioMetals* **2007**, 20, (3), 453-465.
102. Schauer, K.; Rodionov, D. A.; De Reuse, H., New substrates for TonB-dependent transport : do we only see the "tip of the iceberg" ? *Trends in Biochemical Sciences* **2008**, 33, (7), 330-338.
103. Crichton, R. R., Iron Metabolism – From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences. John Wiley & Sons, L: 2009.
104. Hall, D. R.; Hadden, J. M.; Leonard, G. A.; Bailey, S.; Neu, M.; Winna, M.; Lindley, P. F., The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å, respectively. *Biological Crystallography* **2002**, 58, (1), 78-80.
105. DeLano, W., *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2002.
106. Grenier, D.; Tanabe, S.-i., Transferrin as a source of iron for *Campylobacter rectus*. *Journal of Oral Microbiology* **2011**, 3, 5660.
107. Beddek, A.; Schryvers, A., The lactoferrin receptor complex in gram negative bacteria. *BioMetals* **2010**, 23, (3), 377-386.
108. Gomez, J. A.; Criado, M. T.; Ferreira, C. M., Cooperation between the components of the meningococcal transferrin receptor, TbpA and TbpB, in the uptake of transferrin iron by the 37-kDa ferric-binding protein (FbpA). *Research in Microbiology* **1998**, 149, (6), 381-387.
109. Schryvers, A. B.; Stojiljkovic, I., Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Molecular Microbiology* **1999**, 32, (6), 1117-1123.

110. Calmettes, C.; Yu, R.-h.; Silva, L. P.; Curran, D.; Schriemer, D. C.; Schryvers, A. B.; Moraes, T. F., Structural Variations within the Transferrin Binding Site on Transferrin-binding Protein B, TbpB. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286, (14), 12683-12692.
111. Boulton, I. C.; Gorringe, A. R.; Shergill, J. K.; Joannou, C. L.; Evans, R. W., A Dynamic Model of the Meningococcal Transferrin Receptor. *Journal of Theoretical Biology* **1999**, 198, (4), 497-505.
112. Bruns, C. M.; Anderson, D. S.; Vaughan, K. G.; Williams, P. A.; Nowalk, A. J.; McRee, D. E.; Mietzner, T. A., Crystallographic and Biochemical Analyses of the Metal-Free *Haemophilus influenzae* Fe<sup>3+</sup>-Binding Protein. *Biochemistry* **2001**, 40, (51), 15631-15637.
113. Krewulak, K. D.; Vogel, H. J., Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, 1778, (9), 1781-1804.
114. Liddington, R.; Derewenda, Z.; Dodson, E.; Hubbard, R.; Dodson, G., High resolution crystal structures and comparisons of T-state deoxyhaemoglobin and two liganded T-State haemoglobins: T(alpha-oxy)haemoglobin and T(met)haemoglobin. *Journal of Molecular Biology* **1992**, 228, (2), 551-579.
115. Cornelis, P., Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, 86, (6), 1637-1645.
116. Benevides-Matos, N.; Biville, F., The Hem and Has haem uptake systems in *Serratia marcescens*. *Microbiology* **2010**, 156, (6), 1749-1757.
117. Pickett, C. L.; Auffenberg, T.; Pesci, E. C.; Sheen, V. L.; Jusuf, S. S., Iron acquisition and hemolysin production by *Campylobacter jejuni*. *Infection and immunity* **1992**, 60, (9), 3872.
118. Stoebner, J. A.; Payne, S. M., Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* **1988**, 56, (11), 2891.
119. Krieg, S.; Huche, F.; Diederichs, K.; Izadi-Pruneyre, N.; Lecroisey, A.; Wandersman, C.; Delepelaire, P.; Welte, W., Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, (4), 1045-50.

120. Perkins-Balding, D.; Ratliff-Griffin, M.; Stojiljkovic, I., Iron Transport Systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2004**, 68, (1), 154-171.
121. Létoffé, S.; Redeker, V.; Wandersman, C., Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Molecular Microbiology* **1998**, 28, (6), 1223-1234.
122. Rossi, M.-S.; Fetherston, J. D.; Létoffé, S.; Carniel, E.; Perry, R. D.; Ghigo, J.-M., Identification and Characterization of the Hemophore-Dependent Heme Acquisition System of *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity* **2001**, 69, (11), 6707-6717.
123. Smalley, J. W.; Charalabous, P.; Birss, A. J.; Hart, C. A., Detection of heme-binding proteins in epidemic strains of *Burkholderia cepacia*. *Clin Diagn Lab Immunol* **2001**, 8, (3), 509-14.
124. Arnoux, P.; Haser, R.; Izadi, N.; Lecroisey, A.; Delepierre, M.; Wandersman, C.; Czjzek, M., The crystal structure of HasA, a hemophore secreted by *Serratia marcescens*. *Nature Structural and Molecular Biology* **1999**, 6, (6), 516-520.
125. Wolff, N.; Izadi-Pruneyre, N.; Couprie, J.; Habeck, M.; Linge, J.; Rieping, W.; Wandersman, C.; Nilges, M.; Delepierre, M.; Lecroisey, A., Comparative Analysis of Structural and Dynamic Properties of the Loaded and Unloaded Hemophore HasA: Functional Implications. *Journal of Molecular Biology* **2008**, 376, (2), 517-525.
126. Huche, F.; Delepelaire, P.; Wandersman, C.; Welte, W., Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the outer membrane complex HasA-HasR from *Serratia marcescens*. *Acta Crystallographica Section F* **2006**, 62, (1), 56-60.
127. Létoffé, S.; Wecker, K.; Delepierre, M.; Delepelaire, P.; Wandersman, C., Activities of the *Serratia marcescens* Heme Receptor HasR and Isolated Plug and [beta]-Barrel Domains: the [beta]-Barrel Forms a Heme-Specific Channel. *Journal of Bacteriology* **2005**, 187, (13), 4637-4645.

128. Lefèvre, J.; Simenel, C.; Delepelaire, P.; Delepierre, M.; Izadi-Pruneyre, N., <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments of the C-terminal domain of HasB, a specific TonB like protein, from *Serratia marcescens*. *Biomolecular NMR Assignments* **2007**, 1, (2), 197-199.
129. Tong, Y.; Guo, M., Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2009**, 481, (1), 1-15.
130. Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. L., Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* **2002**, 15, (4), 325-339.
131. Hider, R. C.; Kong, X., Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* **2010**, 27, 637-657.
132. Brandel, J.; Humbert, N.; Elhabiri, M.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A.; Albrecht-Gary, A.-M., Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Transactions* **2012**, 41, (9), 2820-2834.
133. Tseng, C. F.; Burger, A.; Mislin, G. L.; Schalk, I. J.; Yu, S. S.; Chan, S. I.; Abdallah, M. A., Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *Journal of Biological and Inorganic Chemistry* **2006**, 11, (4), 419-32.
134. Hannauer, M.; Schäfer, M.; Hoegy, F.; Gizzi, P.; Wehrung, P.; Mislin, G. L. A.; Budzikiewicz, H.; Schalk, I. J., Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Letters* **2012**, 586, (1), 96-101.
135. Yeterian, E.; Martin, L.; Guillon, L.; Journet, L.; Lamont, I.; Schalk, I., Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **2010**, 38, (5), 1447-1459.
136. Hannauer, M. I.; Yeterian, E.; Martin, L. W.; Lamont, I. L.; Schalk, I. J., An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters* **2010**, 584, (23), 4751-4755.



137. Nader, M.; Dobbelaere, W.; Vincent, M.; Journet, L.; Adams, H.; Cobessi, D.; Gallay, J.; Schalk, I. J., Identification of residues of FpvA involved in the different steps of Pvd-Fe uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **2007**, 46, (42), 11707-17.
138. Greenwald, J.; Nader, M.; Celia, H.; Gruffaz, C.; Geoffroy, V.; Meyer, J.-M.; Schalk, I. J.; Pattus, F., FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Molecular Microbiology* **2009**, 72, (5), 1246-1259.
139. Brillet, K.; Reimann, C.; Mislin, G. L. A.; Noël, S.; Rognan, D.; Schalk, I. J.; Cobessi, D., Pyochelin Enantiomers and Their Outer-Membrane Siderophore Transporters in Fluorescent Pseudomonads: Structural Bases for Unique Enantiospecific Recognition. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, (41), 16503-16509.
140. Greenwald, J.; Hoegy, F.; Nader, M.; Journet, L.; Mislin, G. L.; Graumann, P. L.; Schalk, I. J., Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. *J Biol Chem* **2007**, 282, (5), 2987-95.
141. Langman, L.; Young, I. G.; Frost, G. E.; Rosenberg, H.; Gibson, F., Enterochelin System of Iron Transport in *Escherichia coli*: Mutations Affecting Ferric-Enterochelin Esterase. *Journal of Bacteriology* **1972**, 112, (3), 1142-1149.
142. Lin, H.; Fischbach, M. A.; Liu, D. R.; Walsh, C. T., In Vitro Characterization of Salmochelin and Enterobactin Trilactone Hydrolases IroD, IroE, and Fes. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (31), 11075-11084.
143. Matzanke, B. F.; Anemüller, S.; Schünemann, V.; Trautwein, A. X.; Hantke, K., FhuF, Part of a Siderophore-Reductase System *Biochemistry* **2004**, 43, (5), 1386-1392.
144. Harrington, J.; Crumbliss, A., The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. *BioMetals* **2009**, 22, (4), 679-689.
145. Schalk, I. J.; Abdallah, M. A.; Pattus, F., Recycling of pyoverdin on the FpvA receptor after ferric pyoverdin uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **2002**, 41, (5), 1663-71.

146. Yeterian, E.; Martin, L. W.; Lamont, I. L.; Schalk, I. J., An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* **2010**, 2, (3), 412-418.
147. Hannauer, M.; Barda, Y.; Mislin, G. L. A.; Shanzer, A.; Schalk, I. J., The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome. *Journal of Bacteriology* **2010**, 192, (5), 1212-1220.
148. Buchanan, S. K.; Smith, B. S.; Venkatramani, L.; Xia, D.; Esser, L.; Palnitkar, M.; Chakraborty, R.; van der Helm, D.; Deisenhofer, J., Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nature Structural and Molecular Biology* **1999**, 6, (1), 56-63.
149. Ferguson, A. D.; Hofmann, E.; Coulton, J. W.; Diederichs, K.; Welte, W., Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **1998**, 282, (5397), 2215.
150. Locher, K. P.; Rees, B.; Koebnik, R.; Mitschler, A.; Moulinier, L.; Rosenbusch, J. P.; Moras, D., Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **1998**, 95, (6), 771-778.
151. Ferguson, A. D.; Chakraborty, R.; Smith, B. S.; Esser, L.; van der Helm, D.; Deisenhofer, J., Structural Basis of Gating by the Outer Membrane Transporter FecA. *Science* **2002**, 295, (5560), 1715-1719.
152. Lukacik, P.; Barnard, T. J.; Keller, P. W.; Chaturvedi, K. S.; Seddiki, N.; Fairman, J. W.; Noinaj, N.; Kirby, T. L.; Henderson, J. P.; Steven, A. C.; Hinnebusch, B. J.; Buchanan, S. K., Structural engineering of a phage lysin that targets Gram-negative pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, 109, (25), 9857-9862.
153. Cobessi, D.; Celia, H.; Folschweiller, N.; Schalk, I. J.; Abdallah, M. A.; Pattus, F., The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution. *Journal of Molecular Biology* **2005**, 347, (1), 121-34.

154. Cobessi, D.; Celia, H.; Pattus, F., Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **2005**, 352, (4), 893-904.
155. Cobessi, D.; Meksem, A.; Brillet, K., Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: Heme binding by an induced fit mechanism. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2010**, 78, (2), 286-294.
156. Brillet, K.; Meksem, A.; Thompson, A.; Cobessi, D., Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*. *Acta Crystallographica Section F* **2009**, 65, (4), 402-405.
157. Brillet, K.; Meksem, A.; Lauber, E.; Reimann, C.; Cobessi, D., Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*. *Acta Crystallographica Section D* **2009**, 65, (4), 326-331.
158. Chimento, D., P. ; Kadner, R., J. ; Wiener, M., C. , Comparative structural analysis of TonB-dependent outer membrane transporters: Implications for the transport cycle. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2005**, 59, (2), 240-251.
159. Nader, M.; Journet, L.; Meksem, A.; Guillon, L.; Schalk, I. J., Mechanism of Ferripyoverdine Uptake by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Transporter FpvA: No Diffusion Channel Formed at Any Time during Ferrisiderophore Uptake. *Biochemistry* **2011**, 50, (13), 2530-2540.
160. Sampathkumar, P.; Lu, F.; Zhao, X.; Li, Z.; Gilmore, J.; Bain, K.; Rutter, M. E.; Gheyi, T.; Schwinn, K. D.; Bonanno, J. B.; Pieper, U.; Fajardo, J. E.; Fiser, A.; Almo, S. C.; Swaminathan, S.; Chance, M. R.; Baker, D.; Atwell, S.; Thompson, D. A.; Emtage, J. S.; Wasserman, S. R.; Sali, A.; Sauder, J. M.; Burley, S. K., Structure of a putative BenF-like porin from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 at 2.6 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2010**, 78, (14), 3056-3062.

161. Cobessi, D.; Celia, H.; Pattus, F., Crystal Structure at High Resolution of Ferric-pyochelin and its Membrane Receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology* **2005**, 352, (4), 893-904.
162. Braun, V., Energy Transfer between Biological Membranes. *ACS Chemical Biology* **2006**, 1, (6), 352-354.
163. Postle, K., Close Before Opening. *Science* **2002**, 295, (5560), 1658-1659.
164. Blanvillain, S.; Meyer, D.; Boulanger, A.; Lautier, M.; Guynet, C.; Denanc, N.; Vasse, J.; Lauber, E.; Arlat, M., Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLoS ONE* **2007**, 2, (2), e224.
165. Schauer, K.; Gouget, B.; Carrière, M.; Labigne, A.; De Reuse, H., Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Molecular Microbiology* **2007**, 63, (4), 1054-1068.
166. Neugebauer, H.; Herrmann, C.; Kammer, W.; Schwarz, G.; Nordheim, A.; Braun, V., ExbBD-Dependent Transport of Maltodextrins through the Novel MalA Protein across the Outer Membrane of *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology* **2005**, 187, (24), 8300-8311.
167. Cadieux, N.; Bradbeer, C.; Kadner, R. J., Sequence Changes in the Ton Box Region of BtuB Affect Its Transport Activities and Interaction with TonB Protein. *J. Bacteriol.* **2000**, 182, (21), 5954-5961.
168. Shirley, M.; Lamont, I. L., Role of TonB1 in Pyoverdine-Mediated Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **2009**, 191, (18), 5634-5640.
169. Cao, Z.; Warfel, P.; Newton, S. M. C.; Klebba, P. E., Spectroscopic Observations of Ferric Enterobactin Transport. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (2), 1022-1028.
170. Higgs, P. I.; Larsen, R. A.; Postle, K., Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Molecular Microbiology* **2002**, 44, (1), 271-281.
171. Kampfenkel, K.; Braun, V., Topology of the ExbB Protein in the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **1993**, 268, (8), 6050-6057.

172. Pramanik, A.; Zhang, F.; Schwarz, H.; Schreiber, F.; Braun, V., ExbB Protein in the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* Forms a Stable Oligomer. *Biochemistry* **2010**, 49, (40), 8721-8728.
173. Pramanik, A.; Hauf, W.; Hoffmann, J.; Cernescu, M.; Brutschy, B.; Braun, V., Oligomeric Structure of ExbB and ExbB-ExbD Isolated from *Escherichia coli* As Revealed by LILBID Mass Spectrometry. *Biochemistry* **2011**, 50, (41), 8950-8956.
174. Garcia-Herrero, A.; Peacock, R. S.; Howard, S. P.; Vogel, H. J., The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins. *Molecular Microbiology* **2007**, 66, (4), 872-889.
175. Kampfenkel, K.; Braun, V., Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *Journal of Bacteriology* **1992**, 174, (16), 5485-5487.
176. Karlsson, M.; Hannavy, K.; Higgins, C. F., A sequence-specific function for the N-terminal signal-like sequence of the TonB protein. *Molecular Microbiology* **1993**, 8, (2), 379-388.
177. Brewer, S.; Tolley, M.; Trayer, I. P.; Barr, G. C.; Dorman, C. J.; Hannavy, K.; Higgins, C. F.; Evans, J. S.; Levine, B. A.; Wormald, M. R., Structure and function of X-Pro dipeptide repeats in the TonB proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **1990**, 216, (4), 883-895.
178. Kohler, S. D.; Weber, A.; Howard, S. P.; Welte, W.; Drescher, M., The proline-rich domain of TonB possesses an extended polyproline II-like conformation of sufficient length to span the periplasm of Gram-negative bacteria. *Protein Science* **2010**, 19, 625-630.
179. Chang, C.; Mooser, A.; Pluckthun, A.; Wlodawer, A., Crystal Structure of the Dimeric C-terminal Domain of TonB Reveals a Novel Fold. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, (29), 27535-27540.
180. Peacock, S. R.; Weljie, A. M.; Howard, P. S.; Price, F. D.; Vogel, H. J., The Solution Structure of the C-terminal Domain of TonB and Interaction Studies with TonB Box Peptides. *Journal of Molecular Biology* **2005**, 345, (5), 1185-1197.

181. Pawelek, P. D.; Croteau, N.; Ng-Thow-Hing, C.; Khursigara, C. M.; Moiseeva, N.; Allaire, M.; Coulton, J. W., Structure of TonB in Complex with FhuA, *E. coli* Outer Membrane Receptor. *Science* **2006**, 312, (5778), 1399-1402.
182. Shultis, D. D.; Purdy, M. D.; Banchs, C. N.; Wiener, M. C., Outer Membrane Active Transport: Structure of the BtuB:TonB Complex. *Science* **2006**, 312, (5778), 1396-1399.
183. Sean Peacock, R.; Weljie, A. M.; Peter Howard, S.; Price, F. D.; Vogel, H. J., The solution structure of the C-terminal domain of TonB and interaction studies with TonB box peptides. *J Mol Biol* **2005**, 345, (5), 1185-97.
184. Higgs, P. I.; Letain, T. E.; Merriam, K. K.; Burke, N. S.; Park, H.; Kang, C.; Postle, K., TonB Interacts with Nonreceptor Proteins in the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **2002**, 184, (6), 1640-1648.
185. Kaserer, W. A.; Jiang, X.; Xiao, Q.; Scott, D. C.; Bauler, M.; Copeland, D.; Newton, S. M. C.; Klebba, P. E., Insight from TonB Hybrid Proteins into the Mechanism of Iron Transport through the Outer Membrane. *J. Bacteriol.* **2008**, 190, (11), 4001-4016.
186. Bouveret, E.; Derouiche, R.; Rigal, A.; Llobes, R.; Lazdunski, C.; Benedetti, H., Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, (19), 11071-11077.
187. Cascales, E.; Llobès, R.; Sturgis, J. N., The TolQ–TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA–MotB. *Molecular Microbiology* **2001**, 42, (3), 795-807.
188. Dubuisson, J.-F. o.; Vianney, A.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Lazzaroni, J. C., Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. *Microbiology* **2005**, 151, (10), 3337-3347.
189. Gerding, M. A.; Ogata, Y.; Pecora, N. D.; Niki, H.; De Boer, P. A. J., The trans-envelope Tol–Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Molecular Microbiology* **2007**, 63, (4), 1008-1025.

190. Lazzaroni, J. C.; Germon, P.; Ray, M.-C.; Vianney, A., The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiology Letters* **1999**, 177, (2), 191-197.
191. Levensgood, S. K.; Beyer, W. F.; Webster, R. E., TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, 88, (14), 5939-5943.
192. Webster, R. E., The tol gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **1991**, 5, (5), 1005-1011.
193. Lazdunski, C. J.; Bouveret, E.; Rigal, A.; Journet, L.; Llobès, R.; Bénédicti, H., Colicin Import into *Escherichia coli* Cells. *Journal of Bacteriology* **1998**, 180, (19), 4993-5002.
194. Lazzaroni, J.-C.; Dubuisson, J.-F. o.; Vianney, A., The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie* **2002**, 84, (5â€“6), 391-397.
195. Witty, M.; Sanz, C.; Shah, A.; Grossmann, J. G.; Mizuguchi, K.; Perham, R. N.; Luisi, B., Structure of the periplasmic domain of *Pseudomonas aeruginosa* TolA: evidence for an evolutionary relationship with the TonB transporter protein. *EMBO J* **2002**, 21, (16), 4207-4218.
196. Eick-Helmerich, K.; Braun, V., Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes, respectively. *Journal of Bacteriology* **1989**, 171, (9), 5117-5126.
197. Kampfenkel, K.; Braun, V., Membrane topologies of the *TolQ* and *TolR* proteins of *Escherichia coli*: inactivation of *TolQ* by a missense mutation in the proposed first transmembrane segment. *Journal of Bacteriology* **1993**, 175, (14), 4485-4491.
198. Bradbeer, C., The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **1993**, 175, (10), 3146-3150.
199. Braun, V., The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring *tonB*-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *Journal of Bacteriology* **1989**, 171, (11), 6387-6390.

200. Germon, P.; Ray, M.-C. I.; Vianney, A.; Lazzaroni, J. C., Energy-Dependent Conformational Change in the TolA Protein of *Escherichia coli* Involves Its N-Terminal Domain, TolQ, and TolR. *Journal of Bacteriology* **2001**, 183, (14), 4110-4114.
201. Larsen, R. A.; Thomas, M. G.; Postle, K., Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Molecular Microbiology* **1999**, 31, (6), 1809-1824.
202. Held, K. G.; Postle, K., ExbB and ExbD Do Not Function Independently in TonB-Dependent Energy Transduction. *Journal of Bacteriology* **2002**, 184, (18), 5170-5173.
203. Swayne, C.; Postle, K., Taking the *Escherichia coli* TonB Transmembrane Domain "Offline"? Nonprotonatable Asn Substitutes Fully for TonB His20. *J. Bacteriol.* **2011**, 193, (15), 3693-3701.
204. Ollis, A. A.; Manning, M.; Held, K. G.; Postle, K., Cytoplasmic membrane protonmotive force energizes periplasmic interactions between ExbD and TonB. *Molecular Microbiology* **2009**, 73, (3), 466-481.
205. Jana, B.; Manning, M.; Postle, K., Mutations in the ExbB Cytoplasmic Carboxy Terminus Prevent Energy-Dependent Interaction between the TonB and ExbD Periplasmic Domains. *Journal of Bacteriology* **2011**, 193, (20), 5649-5657.
206. Derouiche, R.; Benedetti, H.; Lazzaroni, J. C.; Lazdunski, C.; Llobes, R., Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, (19), 11078-11084.
207. Zhang, X. Y. Z.; Goemaere, E. L.; Seddiki, N.; Celia, H.; Gavioli, M.; Cascales, E.; Llobes, R., Mapping the Interactions between *Escherichia coli* TolQ Transmembrane Segments. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286, (13), 11756-11764.
208. Skare, J. T.; Ahmer, B. M.; Seachord, C. L.; Darveau, R. P.; Postle, K., Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, (22), 16302-16308.



209. Larsen, R. A.; Thomas, M. G.; Wood, G. E.; Postle, K., Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation ( $\Delta V17$ ) by a missense mutation in ExbB. *Molecular Microbiology* **1994**, 13, (4), 627-640.
210. Larsen, R. A.; Deckert, G. E.; Kastead, K. A.; Devanathan, S.; Keller, K. L.; Postle, K., His20 Provides the Sole Functionally Significant Side Chain in the Essential TonB Transmembrane Domain. *Journal of Bacteriology* **2007**, 189, (7), 2825-2833.
211. Braun, V.; Gaisser, S.; Herrmann, C.; Kampfenkel, K.; Killmann, H.; Traub, I., Energy-coupled transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: ExbB binds ExbD and TonB in vitro, and leucine 132 in the periplasmic region and aspartate 25 in the transmembrane region are important for ExbD activity. *Journal of Bacteriology* **1996**, 178, (10), 2836-45.
212. Ollis, A. A.; Postle, K., The Same Periplasmic ExbD Residues Mediate In Vivo Interactions between ExbD Homodimers and ExbD-TonB Heterodimers. *Journal of Bacteriology* **2011**, 193, (24), 6852-6863.
213. Ahmer, B. M.; Thomas, M. G.; Larsen, R. A.; Postle, K., Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *Journal of Bacteriology* **1995**, 177, (16), 4742-7.
214. Ollis, A. A.; Postle, K., ExbD Mutants Define Initial Stages in TonB Energization. *Journal of Molecular Biology* **2012**, 415, (2), 237-247.
215. Ollis, A. A.; Kumar, A.; Postle, K., The ExbD Periplasmic Domain Contains Distinct Functional Regions for Two Stages in TonB Energization. *Journal of Bacteriology* **2012**, 194, (12), 3069-3077.
216. Terashima, H.; Kojima, S.; Homma, M.; Kwang, W. J., Chapter 2 Flagellar Motility in Bacteria: Structure and Function of Flagellar Motor. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Academic Press: 2008; Vol. Volume 270, pp 39-85.
217. Brinkman, K. K.; Larsen, R. A., Interactions of the Energy Transducer TonB with Noncognate Energy-Harvesting Complexes. *Journal of Bacteriology* **2008**, 190, (1), 421-427.
218. Gresock, M. G.; Savenkova, M. I.; Larsen, R. A.; Ollis, A. A.; Postle, K., Death of the TonB shuttle hypothesis. *Frontiers in Microbiology* **2011**, 2.

219. Postle, K.; Larsen, R. A., TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals* **2007**, 20, (3), 453-465.
220. Larsen, R. A.; Letain, T. E.; Postle, K., In vivo evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **2003**, 49, (1), 211-218.
221. Letain, T. E.; Postle, K., TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **1997**, 24, (2), 271-283.
222. Brillet, K.; Journet, L.; Célia, H.; Paulus, L.; Stahl, A.; Pattus, F.; Cobessi, D., A [beta] Strand Lock Exchange for Signal Transduction in TonB-Dependent Transducers on the Basis of a Common Structural Motif. *Structure* **2007**, 15, (11), 1383-1391.
223. Ferguson, A. D.; Amezcua, C. A.; Halabi, N. M.; Chelliah, Y.; Rosen, M. K.; Ranganathan, R.; Deisenhofer, J., Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104, (2), 513-518.
224. Gumbart, J.; Wiener, M. C.; Tajkhorshid, E., Mechanics of Force Propagation in TonB-Dependent Outer Membrane Transport. *Biophysical Journal* **2007**, 93, (2), 496-504.
225. Günter, K.; Braun, V., In vivo evidence for FhuA outer membrane receptor interaction with the TonB inner membrane protein of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **1990**, 274, (1-2), 85-88.
226. Schöffler, H.; Braun, V., Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Molecular and General Genetics MGG* **1989**, 217, (2), 378-383.
227. Kadner, R. J., Vitamin B12 transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. *Molecular Microbiology* **1990**, 4, (12), 2027-2033.
228. Moeck, G. S.; Coulton, J. W.; Postle, K., Cell Envelope Signaling in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, (45), 28391-28397.
229. Cadieux, N.; Kadner, R. J., Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin

transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, (19), 10673-10678.

230. Ogierman, M.; Braun, V., Interactions between the Outer Membrane Ferric Citrate Transporter FecA and TonB: Studies of the FecA TonB Box. *J. Bacteriol.* **2003**, 185, (6), 1870-1885.

231. Adams, H.; Zeder-Lutz, G.; Schalk, I.; Pattus, F.; Celia, H., Interaction of TonB with the Outer Membrane Receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **2006**, 188, (16), 5752-5761.

232. Choul-Li, S.; Adams, H.; Pattus, F.; Celia, H., Visualization of interactions between siderophore transporters and the energizing protein TonB by native PAGE. *Electrophoresis* **2008**, 29, (6), 1333-1338.

233. Larsen, R. A.; Foster-Hartnett, D.; McIntosh, M. A.; Postle, K., Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions. *Journal of Bacteriology* **1997**, 179, (10), 3213-21.

234. Newton, S. M.; Trinh, V.; Pi, H.; Klebba, P. E., Direct Measurements of the Outer Membrane Stage of Ferric Enterobactin Transport. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, (23), 17488-17497.

235. Ferguson, A. D.; Deisenhofer, J., Metal Import through Microbial Membranes. *Cell* **2004**, 116, (1), 15-24.

236. Wiener, M. C., TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Current Opinion in Structural Biology* **2005**, 15, (4), 394-400.

237. James, K. J.; Hancock, M. A.; Moreau, V.; Molina, F.; Coulton, J. W., TonB induces conformational changes in surface-exposed loops of FhuA, outer membrane receptor of *Escherichia coli*. *Protein Science* **2008**, 17, (10), 1679-1688.

238. Sauter, A.; Howard, S. P.; Braun, V., In Vivo Evidence for TonB Dimerization. *J. Bacteriol.* **2003**, 185, (19), 5747-5754.

239. Khursigara, C. M.; De Crescenzo, G.; Pawelek, P. D.; Coulton, J. W., Enhanced Binding of TonB to a Ligand-loaded Outer Membrane Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, (9), 7405-7412.
240. Koedding, J.; Howard, P.; Kaufmann, L.; Polzer, P.; Lustig, A.; Welte, W., Dimerization of TonB Is Not Essential for Its Binding to the Outer Membrane Siderophore Receptor FhuA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, (11), 9978-9986.
241. Ghosh, J.; Postle, K., Disulphide trapping of an in vivo energy-dependent conformation of *Escherichia coli* TonB protein. *Molecular Microbiology* **2005**, 55, (1), 276-288.
242. Ghosh, J.; Postle, K., Evidence for dynamic clustering of carboxy-terminal aromatic amino acids in TonB-dependent energy transduction. *Molecular Microbiology* **2004**, 51, (1), 203-213.
243. Postle, K.; Kastead, K. A.; Gresock, M. G.; Ghosh, J.; Swayne, C. D., The TonB Dimeric Crystal Structures Do Not Exist In Vivo. *mBio* **2010**, 1, (5).
244. Flores Jiménez, R. H.; Cafiso, D. S., The N-Terminal Domain of a TonB-Dependent Transporter Undergoes a Reversible Stepwise Denaturation. *Biochemistry* **2012**, 51, (17), 3642-3650.
245. Mattle, D.; Zeltina, A.; Woo, J.-S.; Goetz, B. A.; Locher, K. P., Two Stacked Heme Molecules in the Binding Pocket of the Periplasmic Heme-Binding Protein HmuT from *Yersinia pestis*. *Journal of Molecular Biology* **2010**, 404, (2), 220-231.
246. Köster, W.; Braun, V., Iron-hydroxamate transport into *Escherichia coli* K12: Localization of FhuD in the periplasm and of FhuB in the cytoplasmic membrane. *Molecular and General Genetics MGG* **1989**, 217, (2), 233-239.
247. Hollenstein, K.; Dawson, R. J.; Locher, K. P., Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* **2007**, 17, (4), 412-8.
248. Koster, W., ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology* **2001**, 152, (3-4), 291-301.

249. Pinkett, H. W.; Lee, A. T.; Lum, P.; Locher, K. P.; Rees, D. C., An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* **2007**, 315, (5810), 373-7.
250. Rees, D. C.; Johnson, E.; Lewinson, O., ABC transporters: the power to change. *Nature Review in Molecular and Cellular Biology* **2009**, 10, (3), 218-227.
251. Ballouche, Iron Metabolism: A Promising Target for Antibacterial Strategies. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* **2009**, 4, (3), 190-205.
252. Tuckman, M. K.; Chopra, I.; Osburne, M. S., An assay to detect inhibitors of bacterial iron transport *The journal of antibiotics* **1993**, 47, (1), 123-125.
253. Mann, B. J.; Holroyd, C. D.; Bradbeer, C.; Kadner, R. J., Reduced activity of TonB-dependent functions in strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **1986**, 33, (2-3), 255-260.
254. Zhao, Q.; Poole, K., Differential Effects of Mutations in tonB1 on Intrinsic Multidrug Resistance and Iron Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2002**, 184, (7), 2045-2049.
255. Holden, K. M.; Browning, G. F.; Noormohammadi, A. H.; Markham, P. F.; Marendza, M. S., TonB is essential for virulence in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **2012**, 35, (2), 129-138.
256. Reeves, S. A.; Torres, A. G.; Payne, S. M., TonB Is Required for Intracellular Growth and Virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infection and Immunity* **2000**, 68, (11), 6329-6336.
257. Torres, A. G.; Redford, P.; Welch, R. A.; Payne, S. M., TonB-Dependent Systems of Uropathogenic *Escherichia coli*: Aerobactin and Heme Transport and TonB Are Required for Virulence in the Mouse. *Infection and Immunity* **2001**, 69, (10), 6179-6185.
258. Postle, K.; Kadner, R. J., Touch and go: tying TonB to transport. *Molecular Microbiology* **2003**, 49, (4), 869-882.
259. Chu, B.; Peacock, R.; Vogel, H., Bioinformatic analysis of the TonB protein family. *BioMetals* **2007**, 20, (3), 467-483.

260. Beddek, A. J.; Sheehan, B. J.; Boss, J. T.; Rycroft, A. N.; Kroll, J. S.; Langford, P. R., Two TonB Systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Their Roles in Iron Acquisition and Virulence. *Infection and Immunity* **2004**, 72, (2), 701-708.
261. Stork, M.; Di Lorenzo, M.; Mourino, S.; Osorio, C. R.; Lemos, M. L.; Crosa, J. H., Two tonB Systems Function in Iron Transport in *Vibrio anguillarum*, but Only One Is Essential for Virulence. *Infection and immunity* **2004**, 72, (12), 7326-7329.
262. Gudmundsdottir, A.; Bell, P. E.; Lundrigan, M. D.; Bradbeer, C.; Kadner, R. J., Point mutations in a conserved region (TonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B12 transport. *Journal of Bacteriology* **1989**, 171, (12), 6526-6533.
263. Nierman, W. C.; Feldblyum, T. V.; Laub, M. T.; Paulsen, I. T.; Nelson, K. E.; Eisen, J.; Heidelberg, J. F.; Alley, M. R. K.; Ohta, N.; Maddock, J. R.; Potocka, I.; Nelson, W. C.; Newton, A.; Stephens, C.; Phadke, N. D.; Ely, B.; DeBoy, R. T.; Dodson, R. J.; Durkin, A. S.; Gwinn, M. L.; Haft, D. H.; Kolonay, J. F.; Smit, J.; Craven, M. B.; Khouri, H.; Shetty, J.; Berry, K.; Utterback, T.; Tran, K.; Wolf, A.; Vamathevan, J.; Ermolaeva, M.; White, O.; Salzberg, S. L.; Venter, J. C.; Shapiro, L.; Fraser, C. M., Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, 98, (7), 4136-4141.
264. Howard, S. P.; Herrmann, C.; Stratilo, C. W.; Braun, V., In Vivo Synthesis of the Periplasmic Domain of TonB Inhibits Transport through the FecA and FhuA Iron Siderophore Transporters of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2001**, 183, (20), 5885-5895.
265. Tuckman, M.; Osburne, M. S., In vivo inhibition of TonB-dependent processes by a TonB box consensus pentapeptide. *Journal of Bacteriology* **1992**, 174, (1), 320-323.
266. Wong, A. R. C.; Pearson, J. S.; Bright, M. D.; Munera, D.; Robinson, K. S.; Lee, S. F.; Frankel, G.; Hartland, E. L., Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular Microbiology* **2011**, 80, (6), 1420-1438.
267. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **1990**, 215, (3), 403-410.
268. Edgar, R., MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **2004**, 5, (1), 113.

269. Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; Barton, G. J., Jalview Version 2: a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **2009**, 25, (9), 1189-1191.
270. Eswar, N.; Marti-Renom, M., A.; Webb, N.; Madhusudhan, M., S.; Shen, M.; Pieper, U.; Sali, A., Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* **2006**, 15.
271. Eisenberg, D.; Lüthy, R.; Bowie, J. U.; Charles W. Carter Jr, R. M. S., VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 1997; Vol. Volume 277, pp 396-404.
272. Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Merz, K. M.; Wang, B.; Pearlman, D. A.; Crowley, M.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Beroza, P.; Schafmeister, C.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Kollman, P. A., *AMBER 8*. University of California, San Fransico, 2004.
273. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **1996**, 14, (1), 33-38.
274. Gudmundsdottir, A.; Bradbeer, C.; Kadner, R. J., Altered Binding and Transport of Vitamin B12 Resulting from Insertion Mutations in the *Escherichia coli* btuB Gene. *The Journal of biological chemistry* **1988**, 263, (28), 14224-14230.
275. Vakharia-Rao, H.; Kastead, K. A.; Savenkova, M. I.; Bulathsinghala, C. M.; Postle, K., Deletion and Substitution Analysis of the *Escherichia coli* TonB Q160 Region. *Journal of Bacteriology* **2007**, 189, (13), 4662-4670.
276. Moreira, I. S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., Hot spots—A review of the protein–protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, 68, (4), 803-812.
277. Bogan, A. A.; Thorn, K. S., Anatomy of hot spots in protein interfaces. *Journal of Molecular Biology* **1998**, 280, (1), 1-9.
278. Clackson, T.; Wells, J. A., A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **1995**, 267, (5196), 383-6.

279. Honig, B.; Nicholls, A., Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* **1995**, 268, (5214), 1144-9.
280. Guerois, R.; Nielsen, J. E.; Serrano, L., Predicting Changes in the Stability of Proteins and Protein Complexes: A Study of More Than 1000 Mutations. *Journal of Molecular Biology* **2002**, 320, (2), 369-387.
281. Kortemme, T.; Baker, D., A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99, (22), 14116-14121.
282. Gohlke, H.; Kiel, C.; Case, D. A., Insights into Protein-Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS Complexes. *Journal of Molecular Biology* **2003**, 330, (4), 891-913.
283. Lafont, V.; Schaefer, M.; Stote, R. H.; Altschuh, D.; Dejaegere, A., Protein-protein recognition and interaction hot spots in an antigen-antibody complex: Free energy decomposition identifies "efficient amino acids". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, 67, (2), 418-434.
284. Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E., Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Accounts of Chemical Research* **2000**, 33, (12), 889-897.
285. Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G., Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics* **2002**, 2.
286. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E., A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology* **1982**, 161, (2), 269-88.
287. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, 25, (13), 1605-1612.
288. Lorber, D. M.; Shoichet, B. K., Hierarchical docking of databases of multiple ligand conformations. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2005**, 5, (8), 739-749



289. Guzmán, F.; Barberis, S.; Illanes, A., Peptide synthesis: chemical or enzymatic *Electronic Journal of Biotechnology* **2007**, 10, (2), 279-314.
290. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-2154.
291. Schneider, S. E.; Bray, B. L.; Mader, C. J.; Friedrich, P. E.; Anderson, M. W.; Taylor, T. S.; Boshernitzan, N.; Niemi, T. E.; Fulcher, B. C.; Whight, S. R.; White, J. M.; Greene, R. J.; Stoltenberg, L. E.; Lichty, M., Development of HIV fusion inhibitors. *Journal of Peptide Science* **2005**, 11, (11), 744-753.
292. Bruckdorfer, T.; Marder, O.; Albericio, F., From Production of Peptides in Milligram Amounts for Research to Multi-Tons Quantities for Drugs of the Future. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2004**, 5, (1), 29-43.
293. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F., Amino Acid-Protecting Groups. *Chemical Reviews* **2009**, 109, 2455–2504.
294. West, K. R.; Bake, K. D.; Otto, S., Dynamic Combinatorial Libraries of Disulfide Cages in Water. *Organic Letters* **2005**, 7, (13), 2615-2618.
295. Carpino, The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37, (22), 3404-3409.
296. Burk, R. M.; Berger, G. D.; Bugianesi, R. L.; Girotra, N. N.; Parsons, W. H.; Ponpipom, M. M., Chemoselective removal and replacement of the C-4' and C-6 acyl esters of zaragozic Acid A. *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, (6), 975-978.
297. Carpino, Tris(2-aminoethyl)amine as a Substitute for 4-AMP in the Fmoc/Polyamine Approach to Rapid Peptide Synthesis. *Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 1673.
298. Carpino, ((9-Fluorenylmethyl)oxy)carbonyl (Fmoc) Amino Acid Chlorides. Synthesis, Characterization, and Application to the Rapid Synthesis of Short Peptide Segments. *Journal of Organic Chemistry* **1986**, 51, 3732.
299. Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D., Rapid Continuous Peptide Synthesis via Fmoc Amino Acid Chloride Coupling and 4-(Aminomethyl)piperidine Deblocking. *Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 721.

300. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillissen, D., New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, (15), 1927-1930.
301. Jadhav, S. A., 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphate (HBTU). *Synlett* **2010**, 2010, (08), 1287-1288.
302. Meneses, C. I.; Nicoll, S. L.; Trembleau, L., Multigram-Scale Synthesis of Short Peptides via a Simplified Repetitive Solution-Phase Procedure. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75, (3), 564-569.
303. Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92, (19), 5748-5749.
304. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective groups in organic synthesis*. Third edition ed.; 1999.
305. Maegawa, T.; Fujiwara, Y.; Ikawa, T.; Hisashi, H.; Monguchi, Y.; Sajiki, H., Novel deprotection method of Fmoc group under neutral hydrogenation conditions. *Amino Acids* **2009**, 36, (3), 493-499.
306. Ibrahim, M. A.; Abdel-Rahman, R. M.; Abdel-Halim, A. M.; Ibrahim, S. S.; Allimony, H. A., Synthesis, chemical reactivity and fungicidal activity of pyrido[1,2-b][1,2,4]triazine derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, 20, 1275-1286.
307. El-Sayed Ali, T., Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-b]pyridine and pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives bearing 5,6-diphenyl-1,2,4-triazine moiety as potential antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44, (11), 4385-4392.
308. Abdel-Rahman, R. M.; Makki, M. S. T.; Ali, T. E.-S.; Ibrahim, M. A., 1,2,4-Triazine Chemistry Part I: Orientation of cyclization reactions of functionalized 1,2,4-triazine derivatives. 2010; Vol. 1.
309. Olson, J. P.; Gichinga, M. G.; Butala, E.; Navarro, H. A.; Gilmour, B. P.; Carroll, F. I., Synthesis and evaluation of 1,2,4-methyltriazines as mGluR5 antagonists. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, (11), 4276-4286.

310. Rusinov, V.; Egorov, I.; Chupakhin, O.; Belanov, E.; Bormotov, N.; Serova, O., Synthesis and antiviral activity of 1,2,4-triazine derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2012**, 45, (11), 655-659.
311. Irannejad, H.; Amini, M.; Khodaghali, F.; Ansari, N.; Tusi, S. K.; Sharifzadeh, M.; Shafiee, A., Synthesis and in vitro evaluation of novel 1,2,4-triazine derivatives as neuroprotective agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, (12), 4224-4230.
312. Rostamizadeh, S.; Sadeghi, K., One-pot synthesis of 1,2,4-triazines. *Synthetic Communications* **2002**, 32, (12), 1899-1902.
313. Zhao, Z.; Leister, W. H.; Strauss, K. A.; Wisnoski, D. D.; Lindsley, C. W., Broadening the scope of 1,2,4-triazine synthesis by the application of microwave technology. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, (6), 1123-1127.
314. Kidwai, M.; Sapra, P.; Bhushan, K. R.; Misra, P., Microwave assisted synthesis of novel 1,2,4-triazines in dry media. *Synthetic Communications* **2001**, 31, (11), 1639-1645.
315. Laakso, P. V.; Robinson, R.; Vandrewala, H. P., Studies in the triazine series including a new synthesis of 1:2:4-triazines. *Tetrahedron* **1957**, 1, (1-2), 103-118.
316. Le Count, D. J.; Greer, A. T., Synthesis of 6-oxo-1,2,4-benzotriazines. *Synthesis* **1976**, 459-460.
317. Ghazvini Zadeh, E. H.; El-Gendy, B. E.-D. M.; Pop, A. G.; Katritzky, A. R., Synthesis of chiral [alpha]-amino acid-derived 1H-1,2,4-triazoles and 1,2,4-triazines. *MedChemComm* **2012**, 3, (1), 52-55.
318. Dubuisson, C.; Fukumoto, Y.; Hegedus, L. S., Synthesis of Dipeptides by the Photolytic Coupling of Chromium Aminocarbene Complexes with  $\alpha$ -Amino Acid Esters. 2. Side Chain Functionalized and  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acid Esters and N-Methyl- and N-Methyl- $\alpha$ -alkyl- $\alpha$ -amino Acid Esters. *Journal of American Chemical Society* **1995**, 117.
319. Scheibye, S.; Shabana, R.; Lawesson, S. O.; Roemming, C., Studies on organophosphorus compounds. XL: Reactions of ketones with 2,4-bis(4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetane 2,4-disulfide. *Tetrahedron* **1982**, 38, (7), 993-1001.

320. Pedersen, U.; Yde, B.; Andersen, T.; Thorsen, M.; Clausen, K.; Lawesson, S. O., 2, 4-bis(4-methoxyphenyl)-1, 3, 2, 4-dithiadiphosphetane 2, 4-disulfide, Ir, as a new activation reagent in preparation of peptides, amides and esters. *Phosphorous and Sulfur and the Related Elements* **1983**, 18, (1-3), 381-384.
321. Sauv e, G.; Rao, V. S.; Lajoie, G.; Belleau, B., Backbone-modified oligopeptidic bioregulators. The synthesis and configuration of thioamide, amidoxime, cyanoamidine, and amidrazone analogs of the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-Met-Leu-Phe-OR). *Canadian Journal of Chemistry* **1985**, 63, (11), 3089-3101.
322. Ley, S. V.; Leach, A. G.; Storer, R. I., A polymer-supported thionating reagent. *Journal of the Chemical Society* **2001**, 358-361.
323. Dodd, D. S.; Martinez, R. L., One-pot synthesis of 5-(substituted-amino)pyrazoles. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, (22), 4265-4267.
324. Song, C.; Zhao, P.; Liu, Y.; Liu, H.; Li, W.; Shi, S.; Chang, J., A new method for the synthesis of 3-aryl-6-(2-pyrrolyl)pyridazines. *Tetrahedron* **2010**, 66, (29), 5378-5383.
325. Leschinsky, K. L.; Chupp, J. P., Heterocycles from substituted amides. IX. 4,5-dihydro-1,2,4-triazin-6-(1H)ones from 2-isocyanoacetates and hydrazine. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1980**, 17, (7), 1621-1622.
326. Boeglin, D.; Cantel, S.; Martinez, J.; Fehrentz, J.-A., Efficient solid-phase synthesis of 4,5-dihydro-1,2,4-triazin-6(1H)-ones. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, (3), 459-462.
327. Saito, Y. D.; Smith, M.; Sweeney, Z. K. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. United States Patent Application Publication. US 2007/0078128 A1. 2007.
328. Andersen, T. P.; Ghattas, A. B. A. G.; Lawesson, S. O., Studies on amino acids and peptides--IV : 1,2,4-triazines from thioacylated amino-acid esters. *Tetrahedron* **1983**, 39, (20), 3419-3427.
329. Nicolaou, K. C.; Hwang, C.-K.; Duggan, M. E.; Nugiel, D. A.; Abe, Y.; Bal Reddy, K.; DeFrees, S. A.; Reddy, D. R.; Awartani, R. A.; Conley, S. R.; Rutjes, F. P. J. T.; Theodorakis, E. A., Total Synthesis of Brevetoxin B. 1. First Generation Strategies and New Approaches to Oxepane Systems. *Journal of American Society* **1995**, 117, 10227-10238.

330. Varma, R. S.; Kumar, D., Microwave-Accelerated Solvent-Free Synthesis of Thioketones, Thiolactones, Thioamides, Thionoesters, and Thioflavonoids. *Organic Letters* **1999**, 1, (5), 697-700.
331. Cava, M. P.; Levinson, M. I., Thionation reactions of lawesson's reagents. *Tetrahedron* **1985**, 41, (22), 5061-5087.
332. Kudelko, A.; Zielinski, W., An efficient synthesis of new 2-aminomethyl-1,3,4-oxadiazoles from enantiomeric phenylglycine hydrazides. *Tetrahedron* **2009**, 65, (6), 1200-1206.
333. Golkowski, M.; Ziegler, T., The 2-(Triphenylsilyl)ethoxycarbonyl-("Tpsc"-) Group: A New Silicon-Based, Fluoride Cleavable Oxycarbonyl Protecting Group Highly Orthogonal to the Boc-, Fmoc- and Cbz-Groups. *Molecules* **2011**, 16, (6), 4695-4718.
334. Austin, N. E.; Avenell, K. Y.; Boyfield, I.; Branch, C. L.; Hadley, M. S.; Jeffrey, P.; Johnson, C. N.; Macdonald, G. J.; Nash, D. J.; Riley, G. J.; Smith, A. B.; Stemp, G.; Thewlis, K. M.; Vong, A. K. K.; Wood, M. D., Design and synthesis of novel 2,3-dihydro-1H-isoindoles with high affinity and selectivity for the dopamine D3 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11, (5), 685-688.
335. Subbarayappa, A.; Patoliya, P. U., An efficient method for the synthesis of 2,3-dihydro-1H-isoindole. *Indian Journal of Chemistry* **2009**, 48B, 545-552.
336. Sun, Q.; Zhou, X.; Islam, K.; Kyle, D. J., Solid-phase synthesis of isoindolines via a rhodium-catalyzed [2+2+2] cycloaddition. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, (37), 6495-6497.
337. de Sousa, S. E.; O'Brien, P., Aziridinium ions from phenylglycinol - A new approach to the synthesis of chiral diamines. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, (27), 4885-4888.
338. Clary, K. N.; Parvez, M.; Back, T. G., Preparation of 1-aryl-substituted isoindoline derivatives by sequential Morita-Baylis-Hillman and intramolecular Diels-Alder reactions. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, 7, (6), 1226-1230.
339. Portevin, B.; Tordjman, C.; Pastoureau, P.; Bonnet, J.; De Nanteuil, G., 1,3-Diaryl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole Derivatives: A New Series of Potent and Selective COX-2 Inhibitors in Which a Sulfonyl Group Is Not a Structural Requisite. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, (24), 4582-4593.

340. Chitanda, J. M.; Prokopchuk, D. E.; Quail, J. W.; Foley, S. R., From Pyrroles to Isoindolines: Synthesis of a gamma-Diimine Ligand for Applications in Palladium Coordination Chemistry and Catalysis. *Organometallics* **2008**, 27, (10), 2337-2345.
341. Enders, D.; Narine, A. A.; Toulgoat, F.; Bisschops, T., Asymmetric Brønsted Acid Catalyzed Isoindoline Synthesis: Enhancement of Enantiomeric Ratio by Stereoablative Kinetic Resolution. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, (30), 5661-5665.
342. Kukkola, P. J.; Bilci, N. A.; Ikeler, T. J., A novel regio- and stereoselective synthesis of isoindolines. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, (29), 5065-5068.
343. Zuman, P., Reactions of Orthophthalaldehyde with Nucleophiles. *Chemical Reviews* **2004**, 104, (7), 3217-3237.
344. Watanabe, Y.; Shim, S. C.; Uchida, H.; Mitsudo, T.; Takegami, Y., The reductive amination of phthalaldehyde by tetracarbonylhydridoferrate : Synthesis of 2-arylisoindoles. *Tetrahedron* **1979**, 35, (11), 1433-1436.
345. Watson, T. J.; Ayers, T. A.; Shah, N.; Wenstrup, D.; Webster, M.; Freund, D.; Horgan, S.; Carey, J. P., Process Improvements for the Preparation of Kilo Quantities of a Series of Isoindoline Compounds. *Organic Process Research & Development* **2003**, 7, (4), 521-532.
346. Pessoa, C.; Ferreira, P. M.; Lotufo, L. V.; de Moraes, M.; Cavalcanti, S. M.; Coêlho, L. C.; Hernandes, M.; Leite, A. C.; DeSimone, C.; Costa, V. M.; Souza, V. M., Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. *ChemMedChem* **2010**, 5, (4), 523-528.
347. Wright, D. L.; Robotham, C. V.; Aboud, K., Studies on the sequential multi-component coupling/Diels-Alder cycloaddition reaction. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, (6), 943-946.
348. Banfi, L.; Basso, A.; Riva, R., Synthesis of Heterocycles Through Classical Ugi and Passerini Reactions Followed by Secondary Transformations Involving One or Two Additional Functional Groups. *Topics in Heterocyclic Chemistry* **2010**, 23, 1-39.
349. Kalinski, C.; Umkehrer, M.; Weber, L.; Kolb, J.; Burdack, C.; Ross, G., On the industrial applications of MCRs: molecular diversity in drug discovery and generic drug synthesis. *Molecular Diversity* **2010**, 14, (3), 513-522.

350. Wessjohann, L. A.; Rhoden, C. R. B.; Rivera, D. G.; Vercillo, O. E., Cyclic Peptidomimetics and Pseudopeptides from Multicomponent Reactions. *Topics in Heterocyclic Chemistry* **2010**, *23*, 199-226.
351. Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; Salaris, M., Microwave-Assisted Synthesis of Isonitriles: A General Simple Methodology. *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 2361-2363.
352. Gulevich, A. V.; Zhdanko, A. G.; Orru, R. V. A.; Nenajdenko, V. G., Isocyanoacetate Derivatives: Synthesis, Reactivity, and Application. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, (9), 5235-5331.
353. Carney, D. W.; Truong, J. V.; Sello, J. K., Investigation of the Configurational Stabilities of Chiral Isocyanoacetates in Multicomponent Reactions. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, (24), 10279-10285.
354. Gordon, C. P.; Young, K. A.; Robertson, M. J.; Hill, T. A.; McCluskey, A., An Ugi-intramolecular Diels-Alder route to highly substituted tetrahydroepoxyisoindole carboxamides. *Tetrahedron* **2011**, *67*, (2), 554-561.
355. Chéron, N.; Ramozzi, R.; El Kaïm, L.; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P., Challenging 50 Years of Established Views on Ugi Reaction: A Theoretical Approach. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, (3), 1361-1366.
356. Mossetti, R.; Saggiorato, D. s. e.; Tron, G. C., Exploiting the Acylating Nature of the Imide-Ugi Intermediate: A Straightforward Synthesis of Tetrahydro-1,4-benzodiazepin-2-ones. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, (24), 10258-10262.
357. Tempest, P.; Ma, V.; Kelly, M. G.; Jones, W.; Hulme, C., MCC/SNAr methodology. Part 1: Novel access to a range of heterocyclic cores. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, (30), 4963-4968.
358. Tanaka, A.; Kawai, T.; Takabatake, T.; Oka, N.; Okamoto, H.; Bersohn, M., Synthesis of an azaspirane via Birch reduction alkylation prompted by suggestions from a computer program. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, (38), 6733-6737.
359. Brown, H. C.; Weissman, P. M.; Yoon, N. M., Selective Reductions. IX. Reaction of Lithium Aluminum Hydride with Selected Organic Compounds Containing Representative Functional Groups. *Journal of American Chemical Society* **1966**, *88*, (7), 1458-1463.

360. Mandal, S. B.; Giri, V. S.; Sabeena, M. S.; Pakrashi, S. C., Reduction of Lactams and Thiolactams by Sodium Borohydride: Application in the Synthesis of Some Alkaloids. *Journal of Organic Chemistry* **1988**, 53, (18), 4236-4241.
361. Brown, H. C.; Heim, P., Selective Reductions. XVIII. The Fast Reaction of Primary, Secondary, and Conversion of Amides to the Corresponding Amines. *Journal of Organic Chemistry* **1973**, 38, (5), 912-916.
362. Kornet, M. J.; Thio, P. A.; Tan, S. I., The Borane Reduction of Amido Esters. *Journal of Organic Chemistry* **1968**, 33, (9), 3637-3639.
363. Fokas, D.; Wang, Z., Facile Synthesis of 2,3,6,11-Tetrahydro-1H,5H-indolizino[8,7-b]indole-11b-Carboxylic Acid Methyl Ester via a 9-BBN-Mediated Tertiary Lactam Reduction. *Synthetic Communications* **2008**, 38, (21), 3816-3822.
364. Collins, C. J.; Lanz, M.; Singaram, B., Facile reduction of tertiary lactams to cyclic amines with 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN). *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, (19), 3673-3676.
365. Godjoian, G.; Singaram, B., Controlled reduction of tertiary amides to the corresponding aldehydes or amines using dialkylboranes. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, (10), 1717-1720.
366. Krishnamurthy, S.; Brown, H. C., Selective Reductions. 22. Facile Reduction of  $\alpha$ -Unsaturated Aldehydes and Ketones with 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane. A Remarkably Convenient Procedure for the Selective Conversion of Conjugated Aldehydes and Ketones to the Corresponding Allylic Alcohols in the Presence of Other Functional Groups. *Journal of Organic Chemistry* **1977**, 42, (7), 1197-1201.
367. Suwandi, L. S.; Agoston, G. E.; Shah, J. H.; Hanson, A. D.; Zhan, X. H.; LaVallee, T. M.; Treston, A. M., Synthesis and antitumor activities of 3-modified 2-methoxyestradiol analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, (22), 6459-6462.
368. Blanc, D. S.; Petignat, C.; Janin, B.; Bille, J.; Francioli, P., Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect* **1998**, 4, (5), 242-247.
369. Ohara, T.; Itoh, K., Significance of *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract. *Intern Med* **2003**, 42, (11), 1072-6.



370. Erol, S.; Altoparlak, U.; Akcay, M. N.; Celebi, F.; Parlak, M., Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns* **2004**, 30, (4), 357-61.
371. Meyer, J. M.; Stintzi, A.; De Vos, D.; Cornelis, P.; Tappe, R.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H., Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **1997**, 143 35-43.
372. Iglewski, B. H.; Sadoff, J.; Bjorn, M. J.; Maxwell, E. S., Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, 75, (7), 3211-5.
373. Livermore, D. M., Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases* **2002**, 34, (5), 634-640.
374. Guterman, S. K., Colicin B: mode of action and inhibition by enterochelin. *J Bacteriol* **1973**, 114, (3), 1217-24.
375. Frederico, P., Colicins. *Annual Review of Microbiology* **1957**, 11, (1), 7-22.
376. Cascales, E.; Buchanan, S. K.; Duche, D.; Kleanthous, C.; Lloubes, R.; Postle, K.; Riley, M.; Slatin, S.; Cavard, D., Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **2007**, 71, (1), 158-229.
377. Rabsch, W.; Ma, L.; Wiley, G.; Najar, F. Z.; Kaserer, W.; Schuerch, D. W.; Klebba, J. E.; Roe, B. A.; Laverde Gomez, J. A.; Schallmey, M.; Newton, S. M.; Klebba, P. E., FepA- and TonB-dependent bacteriophage H8: receptor binding and genomic sequence. *J Bacteriol* **2007**, 189, (15), 5658-74.
378. Brickman, T. J.; Armstrong, S. K., Colicins B and Ia as novel counterselective agents in interspecies conjugal DNA transfers from colicin-sensitive *Escherichia coli* donors to other Gram-negative recipient species. *Gene* **1996**, 178, (1-2), 39-42.
379. Schalk, I. J.; Kyslik, P.; Prome, D.; van Dorselaer, A.; Poole, K.; Abdallah, M. A.; Pattus, F., Copurification of the Fpva ferric pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* **1999**, 38, (29), 9357-65.

380. Lefèvre, J.; Delepelaire, P.; Delepierre, M.; Izadi-Pruneyre, N., Modulation by Substrates of the Interaction between the HasR Outer Membrane Receptor and Its Specific TonB-like Protein, HasB. *Journal of Molecular Biology* **2008**, 378, (4), 840-851.
381. <http://www.biacore.com>.
382. Braun, V.; Pramanik, A.; Gwinner, T.; Koberle, M.; Bohn, E., Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals* **2009**, 22, (1), 3-13.
383. Ji, C.; Juarez-Hernandez, R. E.; Miller, M. J., Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates. *Future Medicinal Chemistry* **2012**, 4, (3), 297-313.
384. Bickel, H.; Gäumann, E.; Nussberger, G.; Reusser, P.; Vischer, E.; Voser, W.; Wettstein, A.; Zähler, H., Stoffwechselprodukte von *Actinomyceten*. 25. Mitteilung. Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrimycine A1 und A2, neuer Antibiotika der Sideromycin-Gruppe. *Helvetica Chimica Acta* **1960**, 43, (7), 2105-2118.
385. Lorenzo, V., Isolation and characterization of microcin E 492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Microbiology* **1984**, 139, (1), 72-75.
386. Poddubnaya, N. A.; El, N. A. M.; Skvortsova, I. N.; Balandina, G. N., Chemical structure of albomycin. XXII. Formation and antimicrobial activity of iron complexes of peptides and cyclopeptides. *Zh. Obshch. Khim.* **1968**, 38, (4), 732-7.
387. Clarke, T. E.; Braun, V.; Winkelmann, G.; Tari, L. W.; Vogel, H. J., X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. *J Biol Chem* **2002**, 277, (16), 13966-72.
388. Ferguson, A. D.; Coulton, J. W.; Diederichs, K.; Welte, W.; Braun, V.; Fiedler, H.-P., Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Science* **2000**, 9, (5), 956-963.
389. Pramanik, A.; Braun, V., Albomycin Uptake via a Ferric Hydroxamate Transport System of *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journal of Bacteriology* **2006**, 188, (11), 3878-3886.
390. Pramanik, A.; Stroehrer, U. H.; Krejci, J.; Standish, A. J.; Bohn, E.; Paton, J. C.; Autenrieth, I. B.; Braun, V., Albomycin is an effective antibiotic, as exemplified with *Yersinia enterocolitica* and *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Med Microbiol* **2007**, 297, (6), 459-69.

391. Thomas, X.; Destoumieux-Garzon, D.; Peduzzi, J.; Afonso, C.; Blond, A.; Birlirakis, N.; Goulard, C.; Dubost, L.; Thai, R.; Tabet, J. C.; Rebuffat, S., Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J Biol Chem* **2004**, 279, (27), 28233-42.
392. Bieler, S.; Silva, F.; Soto, C.; Belin, D., Bactericidal Activity of both Secreted and Nonsecreted Microcin E492 Requires the Mannose Permease. *Journal of Bacteriology* **2006**, 188, (20), 7049-7061.
393. Lorenzo, V.; Pugsley, A. P., Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1985**, 27, (4), 666-669.
394. Heinisch, L.; Wittmann, S.; Stoiber, T.; Berg, A.; Ankel-Fuchs, D.; Möllmann, U., Highly Antibacterial Active Aminoacyl Penicillin Conjugates with Acylated Bis-Catecholate Siderophores Based on Secondary Diamino Acids and Related Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, (14), 3032-3040.
395. Wittmann, S.; Schnabelrauch, M.; Scherlitz-Hofmann, I.; Möllmann, U.; Ankel-Fuchs, D.; Heinisch, L., New synthetic siderophores and Their [beta]-Lactam conjugates based on diamino acids and dipeptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, 10, (6), 1659-1670.
396. Ji, C.; Miller, P. A.; Miller, M. J., Iron Transport-Mediated Drug Delivery: Practical Syntheses and In Vitro Antibacterial Studies of Tris-Catecholate Siderophore-Aminopenicillin Conjugates Reveals Selectively Potent Antipseudomonal Activity. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, (24), 9898-9901.
397. Möllmann, U.; Heinisch, L.; Bauernfeind, A.; Köhler, T.; Ankel-Fuchs, D., Siderophores as drug delivery agents: application of the "Trojan Horse" strategy. *BioMetals* **2009**, 22, (4), 615-624.
398. Ji, C.; Miller, M. J., Chemical syntheses and in vitro antibacterial activity of two desferrioxamine B-ciprofloxacin conjugates with potential esterase and phosphatase triggered drug release linkers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, 20, (12), 3828-3836.

399. Youard, Z. A.; Mislin, G. L.; Majcherczyk, P. A.; Schalk, I. J.; Reimann, C., *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *J Biol Chem* **2007**, 282, (49), 35546-53.
400. Ankenbauer, R. G.; Toyokuni, T.; Staley, A.; Rinehart, K. L., Jr.; Cox, C. D., Synthesis and biological activity of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **1988**, 170, (11), 5344-51.
401. Hare, N. J.; Soe, C. Z.; Rose, B.; Harbour, C.; Codd, R.; Manos, J.; Cordwell, S. J., Proteomics of *Pseudomonas aeruginosa* Australian Epidemic Strain 1 (AES-1) Cultured under Conditions Mimicking the Cystic Fibrosis Lung Reveals Increased Iron Acquisition via the Siderophore Pyochelin. *Journal of Proteome Research* **2012**, 11, (2), 776-795.
402. Ino, A.; Murabayashi, A., Synthetic studies of thiazoline and thiazolidine-containing natural products. 1. Phosphorus pentachloride-mediated thiazoline construction reaction. *Tetrahedron* **1999**, 55, (34), 10271-10282.
403. Rivault, F.; Schons, V.; Liébert, C.; Burger, A.; Sakr, E.; Abdallah, M. A.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A., Synthesis of functionalized analogs of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* **2006**, 62, (10), 2247-2254.
404. Zamri, A.; Schalk, I. J.; Pattus, F.; Abdallah, M. A., Bacterial siderophores: synthesis and biological activities of novel pyochelin analogues. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, 13, (6), 1147-50.
405. Mislin, G. L.; Burger, A.; Abdallah, M. A., Synthesis of new thiazole analogues of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. A new conversion of thiazolines into thiazoles. *Tetrahedron* **2004**, 60, (52), 12139-12145.
406. Schlegel, K.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H., The stereoisomers of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **2004**, 17, (4), 409-14.
407. Ino, A.; Murabayashi, A., Synthetic studies of thiazoline and thiazolidine-containing natural products. Part 3: Total synthesis and absolute configuration of the siderophore versiniabactin. *Tetrahedron* **2001**, 57, (10), 1897-1902.

408. Rivault, F.; Liebert, C.; Burger, A.; Hoegy, F.; Abdallah, M. A.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L., Synthesis of pyochelin-norfloxacin conjugates. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, (3), 640-4.
409. Yoganathan, S.; Sit, C. S.; Vederas, J. C., Chemical synthesis and biological evaluation of gallidermin-siderophore conjugates. *Organic and Biomolecular Chemistry and Biology* **2011**, 9, 2133-2141.
410. Noel, S.; Gasser, V.; Pesset, B.; Hoegy, F.; Rognan, D.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A., Synthesis and biological properties of conjugates between fluoroquinolones and a N<sup>3</sup>-functionalized pyochelin. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, (24), 8288-8300.
411. Noel, S.; Guillon, L.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A., Synthesis of Fluorescent Probes Based on the Pyochelin Siderophore Scaffold. *Organic Letters* **2011**, 13, (5), 844-847.
412. Yan, S.; Miller, M. J.; Wencewicz, T. A.; Möllmann, U., Syntheses and antibacterial activity studies of new oxazolidinones from nitroso Diels-Alder chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 20, (3), 1302-1305.
413. Bergeron, R. J.; Wiegand, J.; Dionis, J. B.; Egli-Karmakka, M.; Frei, J.; Huxley-Tencer, A.; Peter, H. H., Evaluation of desferrithiocin and its synthetic analogs as orally effective iron chelators. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1991**, 34, (7), 2072-8.
414. Fehrentz, J. A.; Castro, B., An efficient synthesis of optically active  $\hat{\pm}$ -(t-butoxycarbonylamino)-aldehydes from  $\hat{\pm}$ -amino acids. *Synthesis* **1983**, (8), 676-8.
415. Brouwer, A. J.; Liskamp, R. M. J., Synthesis of Novel Dendrimeric Systems Containing NLO Ligands. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 2005, (3), 487-495.
416. Yoo, S.-e.; Lee, S.-h., Reduction of Organic Compounds with Sodium Borohydride-Copper(II) Sulfate System. *Synlett* **1990**, 419-420.
417. Manninen, P. R.; Brickner, S. J., Preparation of N-aryl-5R-hydroxymethyl-2-oxazolidinones from N-aryl carbamates: N-phenyl-(5R)-hydroxymethyl-2-oxazolidinone [2-Oxazolidinone, 5-(hydroxymethyl)-3-phenyl-, (5R)-]. *Organic Syntheses* **2005**, 81, 112-120.
418. Holletz, T.; Cech, D., A facile procedure for the reduction of azido nucleosides to amines using polymer bound triphenylphosphine. *Synthesis* **1994**, (8), 789-91.

419. Carter, D. M.; Gagnon, J.-N.; Damlaj, M.; Mandava, S.; Makowski, L.; Rodi, D. J.; Pawelek, P. D.; Coulton, J. W., Phage Display Reveals Multiple Contact Sites between FhuA, an Outer Membrane Receptor of *Escherichia coli*, and TonB. *Journal of Molecular Biology* **2006**, 357, (1), 236-251.
420. Carter, D. M.; Miousse, I. R.; Gagnon, J.-N.; Martinez, E.; Clements, A.; Lee, J.; Hancock, M. A.; Gagnon, H.; Pawelek, P. D.; Coulton, J. W., Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the Periplasmic Protein FhuD. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, (46), 35413-35424.
421. James, K. J.; Hancock, M. A.; Gagnon, J.-N.; Coulton, J. W., TonB Interacts with BtuF, the *Escherichia coli* Periplasmic Binding Protein for Cyanocobalamin. *Biochemistry* **2009**, 48, 9212-9220.
422. Ramesh, R.; Chandrasekaran, S., But-2-ynylbisoxycarbonyl Chloride: A Novel C2-Symmetric Reagent for the Protection of Amines and Amino Acids. *Organic Letters* **2005**, 7, (22), 4947-4950.
423. Plewniak, F.; Bianchetti, L.; Brelivet, Y.; Carles, A.; Chalmel, F.; Lecompte, O.; Mochel, T.; Moulinier, L.; Muller, A.; Muller, J.; Prigent, V.; Ripp, R.; Thierry, J.-C.; Thompson, J. D.; Wicker, N.; Poch, O., PipeAlign: a new toolkit for protein family analysis. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, (13), 3829-3832.
424. Jones, D. T., Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* **1999**, 292, (2), 195-202.
425. Cuff, J. A.; Barton, G. J., Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins* **2000**, 40, (3), 502-11.
426. Brooks, B. R.; Brucoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M., CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, 4, (2), 187-217.
427. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.; Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, (1), 235-242.

428. Brunger, A. T.; Karplus, M., Polar hydrogen positions in proteins: empirical energy placement and neutron diffraction comparison. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1988**, 4, (2), 148-56.
429. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L., Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, (2), 926-35.
430. Davis, M. E.; Madura, J. D.; Luty, B. A.; McCammon, J. A., Electrostatics and diffusion of molecules in solution: simulations with the University of Houston Brownian dynamics program. *Comput. Phys. Commun.* **1991**, 62, (2-3), 187-97.
431. MacKerell, A. D., Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E., III; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M., All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, (18), 3586-3616.
432. Sauton, N.; Lagorce, D.; Villoutreix, B.; Miteva, M., MS-DOCK: Accurate multiple conformation generator and rigid docking protocol for multi-step virtual ligand screening. *BMC Bioinformatics* **2008**, 9, (1), 1-12.
433. Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S. L.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K. S.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R. E. W.; Lory, S.; Olson, M. V., Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Nature (London)* **2000**, 406, (6799), 959-964.
434. Myszka, D. G., Improving biosensor analysis. *Journal of Molecular Recognition* **1999**, 12, (5), 279-284.





Bénédicte PESSET



## Conception, synthèse et vectorisation d'inhibiteurs potentiels de la protéine bactérienne TonB



La multiplication des résistances aux antibiothérapies actuelles et l'utilisation potentielle de bactéries pathogènes dans le cadre d'attentats bioterroristes rendent nécessaire la recherche de nouvelles cibles biologiques et la découverte de nouvelles stratégies antibiotiques. Dans ce contexte, les mécanismes d'assimilation du fer chez les bactéries à Gram négatif sont des cibles particulièrement prometteuses. Le fer est en effet un élément essentiel à la vie, mais peu biodisponible. Les bactéries ont donc développé des mécanismes efficaces pour subvenir à leurs besoins en fer. Ces mécanismes de transport nécessitent un apport d'énergie fourni par une machinerie bactérienne complexe, la machinerie TonB. La protéine TonB, qui joue un rôle central dans le fonctionnement de cette machinerie, est la cible de notre approche. Nous souhaitons séquestrer cette protéine dans le périplasme grâce à des composés peptidiques fonctionnalisés par des hétérocycles de type isoindole ou 1,2,4-triazine. La conception et la synthèse de ces molécules sont présentées dans ce manuscrit, ainsi que leurs perspectives de vectorisation en utilisant une stratégie dite du "cheval de Troie". Notre contribution à la mise au point d'un test d'affinité *in vitro* est également abordée.

**Mots-clefs** : bioterrorisme, antibiotiques, TonB, inhibiteurs d'interaction protéine-protéine, peptides, isoindole, triazine, résonance plasmonique de surface, pyochéline, stratégie du Cheval de Troie.

The increasing resistances to the current antibiotherapies, and the potential use of pathogenic bacteria as biological weapons led us to the absolute necessity of discovering new biological targets and new antibiotic strategies. In this context, iron uptake pathways of Gram negative bacteria are promising targets. Indeed, iron is an essential nutrient, but it has a low bioavailability. Bacteria have developed efficient iron uptake pathways in order to proliferate. Iron is transported in the bacterial cell by specific outer membrane transporters and thanks to the energy provided by a complex molecular machinery, called TonB. The TonB protein, which is the keystone of this machinery, is a key target for the development of new antibiotics. We would like to sequester this protein in the periplasm thanks to molecules constituted of a peptidic moiety and a heterocyclic moiety such as isoindole or 1,2,4-triazine. The conception and the synthesis of these compounds are presented in this document, as well as their possibilities to be vectorized using a "Trojan Horse" strategy. Our contribution to the development of an *in vitro* test of affinity is presented as well.

**Key words** : bioterrorism, antibiotics, TonB, protein-protein interaction inhibitors, peptides, isoindole, triazine, surface plasmon resonance, pyochelin, Trojan horse strategy.