HAL
open science

Utilisation de la stratégie du cheval de Troie pour lutter contre Pseudomonas aeruginosa : synthèses et propriétés biologiques de conjugués sidérophores-antibiotiques

Aurélie Paulen

To cite this version:

Aurélie Paulen. Utilisation de la stratégie du cheval de Troie pour lutter contre Pseudomonas aeruginosa : synthèses et propriétés biologiques de conjugués sidérophores-antibiotiques. Chimie thérapeutique. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ021 . tel-01720436

HAL Id: tel-01720436

https://theses.hal.science/tel-01720436

Submitted on 1 Mar 2018

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 SANTE

Biotechnologie et Signalisation Cellulaire

THÈSE présentée par :

Aurélie PAULEN

soutenue le : **7 avril 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Utilisation de la stratégie du cheval de Troie pour lutter contre *Pseudomonas aeruginosa* : Synthèses et propriétés biologiques de conjugués sidérophores-antibiotiques

THÈSE dirigée par :

Dr. MISLIN Gaëtan	Chargé de recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. MICHAUD-SORET Isabelle	Directrice de recherches, CEA Grenoble
Pr. SONNET Pascal	Professeur, Université de Picardie

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. SEEMANN Myriam	Directrice de recherches, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont en premier lieu à l'ensemble des membres du jury, au Pr Pascal Sonnet et au Dr Isabelle Michaud-Soret pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et d'avoir accepté de le juger, ainsi qu'au Dr Myriam Seemann de me faire l'honneur de l'examiner.

Je tiens également à remercier le Dr Isabelle Schalk pour m'avoir accueillie dans le laboratoire « Transport Membranaire Bactérien » où j'ai eu l'opportunité d'effectuer ma thèse.

Je voudrais particulièrement exprimer mes remerciements au Dr Gaëtan Mislin, pour son encadrement lors de ma thèse. Merci pour tes conseils scientifiques, d'avoir toujours su m'aiguiller dans les moments difficiles, mais aussi d'avoir apporté un environnement de travail agréable que ce soit en décorant le bureau avec de belles orchidées, ou grâce à tes anecdotes et tes blagues (spécialement celle avec l'accent belge, inoubliable !).

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe : Valérie, Karl, Béata, Pierre, Mathilde, Sébastien et Nicolas avec qui j'ai pu partager les joies de la vie en labo, souvent autour de gâteaux, grâce à une mafia redoutable. Je tiens plus particulièrement à remercier Véronique, Quentin et Béatrice pour les tests biologiques de mes molécules.

Je tiens également à remercier Olivier et Géraldine pour les bons moments que nous avons passés ensemble et spécialement nos pauses thé et chocolat. Grâce à vous j'ai pu redécouvrir toutes ces belles citations de Kaamelott.

Ma pequeña Ana, merci de m'avoir donné tous tes conseils pour faire une excellente tortilla, et d'essayer de m'apprendre les bases de l'espagnol. Merci pour les week-ends qu'on a pu faire ensemble ; j'ai hâte qu'un jour tu me fasses visiter ta région !

Un remerciement spécial pour mes collègues chimistes. Je voudrais remercier Françoise, avec qui j'ai pu partager tout d'abord un bureau puis un labo. Merci d'avoir choisi de rejoindre la petite troupe de chimie. Merci pour nos discussions au labo et pour les produits que tu as pu fournir en quantité industrielle.

Un grand merci à Etienne pour les mois que nous avons partagés au labo et ceux qui suivent encore. Merci pour tout ce que tu m'as appris ;), et surtout de toujours me remonter le moral quand je me sens (définitivement) comme une bamba triste. Merci à toi, Cécile et Anouck pour les comptages de dodos, de toujours nous accueillir la porte grande ouverte quand on est de passage à Paris, et de venir nous voir régulièrement en Alsace. J'espère que le projet de revenir en Alsace se concrétisera.

Je voudrais remercier également toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ces années et qui ont rendu le quotidien sympathique au sein de l'ESBS. En particulier, mes collègues du comité des fêtes, ainsi que les doctorants, stagiaires et post-docs qui ont participé aux différents apéros et restos qui ont pu s'organisés au cours de ces années.

Merci aux copains de plus ou moins longues dates qui m'ont toujours soutenue, encouragée et ont rarement hésité pour sortir : Rémy, Mélanie, Elodie, Alexis, Guillaume, Carol, Maxime, Céline et Cyril.

Un grand merci à ma famille, en particulier à ma mère, et également à Yannick, Stéphane, Guillaume, Maxime et Quentin, ainsi qu'à mes grands-parents pour leur soutien. Une pensée également à la famille Lang, qui a toujours porté un grand intérêt à mon travail.

Pour finir, je voudrais remercier Jean. Merci d'avoir été mon oxygène pendant la rédaction. Merci d'avoir été là tous les jours, dans les moments de bonheur, comme dans les moments plus difficiles…

Abréviations

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ABC	:	ATP binding cassette
ARNm	:	Acide ribonucléique messager
ARNt	:	Acide ribonucléique transport
ATP	:	Adénosine triphosphate
BCS	:	Sidérophore Bis-Catécholé
BCV	:	Vecteur Bis-Catécholé
Boc	:	*tert*-Butoxycarbonyle
CAA	:	Casaminoacide
CCCP	:	Carbonylcyanure *m*-chlorophénylhydrazone
CMI	:	Concentration minimale Inhibitrice
CuAAC	:	Copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition
Da	:	Dalton
DCC	:	*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide
DCI	:	1,1'-Carbonyldiimidazole
DIPEA	:	*N, N*-Diisopropyléthylamine
DMAP	:	4-Diméthylaminopyridine
DMF	:	*N,N*-Diméthylformamide
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DO	:	Densité optique
EDCI	:	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Ent	:	Entérobactine
GTP	:	Guanosine triphosphate
HATU	:	(1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate)
HBTU	:	(2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméhyluronium hexafluorophosphate)
HRMS	:	Spectrométrie de Masse Haute Résolution
MCS	:	Sidérophore Mono-Catécholé

MCV	:	Vecteur Mono-Catécholé
MH	:	Mueller-Hinton
MS	:	Spectrométrie de Masse
NAG	:	*N*-acétyl-glucosamine
NAM	:	Acide *N*-acétyl-muramique
NBD	:	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diaxole
PBP	:	Penicilin Binding Protein
Pch	:	Pyochéline
Proton Sponge	:	1,8-Bis(diméthylamino)naphthalene
PVD	:	Pyoverdine
qRT-PCR	:	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
quant.	:	Quantitatif
Rdt	:	Rendement
RMN	:	Résonnance Magnétique Nucléaire
TBTA	:	Tris-(benzyltriazolylméthyl)amine
TCV	:	Vecteur Tris-Catécholé
TFA	:	Acide trifluoroacétique
THF	:	Tétrahydrofurane
TME	:	Transporteur de la membrane externe
TMSOK	:	Triméthylsilanolate de potassium

Table des matières

DES BACTERIES ET DES HOMMES **15**

I. LES BACTERIES **17**

A. GENERALITES 17

B. STRUCTURE CELLULAIRE 17

II. LES ANTIBIOTHERAPIES **19**

A. HISTORIQUE 19

B. CIBLES ET MODES D'ACTIONS DES ANTIBIOTIQUES 21

1. Inhibitions de la synthèse de la paroi bactérienne 22

a) β-lactames 22

b) Glycopeptides 24

2. Inhibition de la synthèse protéique 25

3. Inhibition de la réplication ou de la transcription de l'ADN 28

4. Dépolarisation de la membrane 30

5. Inhibiteur du métabolisme de l'acide folique 30

C. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES 31

1. Modification de la cible 33

2. Inactivation de l'antibiotique 34

3. Réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique 35

DU FER ET DES BACTERIES **39**

I. LE FER : UN NUTRIMENT ESSENTIEL POUR LES BACTERIES **41**

II. SYSTEMES D'ACQUISITION DU FER CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* **42**

A. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* : GENERALITES 42

B. ACQUISITION DU FER FERREUX 44

C. IMPORT DU FER HEMINIQUE 44

D. ACQUISITION DU FER FERRIQUE SIDEROPHORE-DEPENDANT 46

1. Les sidérophores endogènes de Pseudomonas aeruginosa 47

a) La pyoverdine 47

b) La pyochéline 49

2. Les sidérophores exogènes : le cas de l'entérobactine et du ferrichrome 52

a) Entérobactine 53
b) Ferrichrome 54
III. LES STRATEGIES DE TYPE CHEVAL DE TROIE BASEES SUR LES SIDEROPHORES 55
A. PRINCIPE GENERAL 55
B. LES SIDEROMYCINES : DES CHEVAUX DE TROIE NATURELS 57
1. Albomycine 57
2. Microcine E492 58
C. LES SIDEROMYCINES SYNTHETIQUES OU HEMI-SYNTHETIQUE : ETAT DE L'ART 59
1. Sidéromycines fondées sur les sidérophores endogènes de P. aeruginosa 60
2. Les sidéromycines contenant des hydroxamates 63
3. Les sidéromycines basées sur les catéchols 64
4. Sidéromycines synthétiques développées par l'industrie 66

VECTORISATION D'ANTIBIOTIQUES PAR DES SIDEROPHORES CATECHOLES 71

I. SYNTHESE DE L'AZOTOCHELINE 62, DE L'AMINOCHELINE 63 ET DES VECTEURS MCV 65 ET BCV 64 75
II. ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'AMINOCHELINE 63, DE L'AZOTOCHELINE 62 ET DES VECTEURS MCV 65 ET BCV 64 80
A. TRANSPORT DU FER 80
B. INDUCTION DE L'EXPRESSION DU TRANSPORTEUR DE MEMBRANE EXTERNE PFEA 83
C. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU TRANSPORTEUR PFEA 85
III. SYNTHESE DES CONJUGUES SIDEROPHORES-ANTIBIOTIQUES 89
A. SYNTHESE D'OXAZOLIDINONES MUNIES DE FONCTIONS AZOTURES 90
1. Synthèse du linézolide 90
2. Synthèse des oxazolidinones **77** et **78** 92
3. Synthèse des oxazolidinones **79**, **80** et **81** à partir de la pipérazine 93
B. CONJUGAISON ENTRE VECTEURS ET BLOCS ANTIBIOTIQUES-BRAS ESPACEURS 98
1. Conjugaison par chimie click 99
2. Conjugaison par une liaison amide 102
IV. PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CONJUGUES MCV-OXAZOLDIDINONES ET BCV-OXAZOLIDINONES 103
V. EPILOGUE 111
VI. CONCLUSION 113

VECTORISATION D'ANTIBIOTIQUES PAR LA PYOCHELINE 117

I. DONNEES ANTERIEURES OBTENUES AU LABORATOIRE 119
II. SYNTHESE DES VECTEURS PYOCHELINES 122
A. SYNTHESE DE PYOCHELINE **119** FONCTIONNALISEE EN N3'' 123

B. SYNTHESE DES VECTEURS PYOCHELINE **122**, **123** ET **124** 126

III. SYNTHESE DES CONJUGUES PYOCHELINE-ANTIBIOTIQUES PAR CHIMIE CLICK 129

A. SYNTHESE DE β-LACTAMES UTILISABLES EN CHIMIE CLICK 129

B. TENTATIVES DE CONJUGAISON DE LA PYOCHELINE **124** ET DU β-LACTAME **142** 132

C. TENTATIVES DE CONJUGAISON DES PYOCHELINES **122** ET **123** AVEC DES OXAZOLIDINONES 133

D. CONJUGAISON DE LA PYOCHELINE ET D'OXAZOLIDINONES PAR LIAISON PEPTIDIQUE 135

1. Synthèse des blocs bras espaceur-oxazolidinone 136

2. Formation des conjugués pyochéline-oxazolidinone 138

E. ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CONJUGUES **163**, **165** ET **166** 141

1. Activité antibiotique 141

2. Transport du ^{55}Fe 141

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 143

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES 147

PARTIE EXPERIMENTALE 159

I. PROCEDURES GENERALES 161

II. PROTOCOLES ET CARACTERISATION DES PRODUITS 163

BIBLIOGRAPHIE 215

DES BACTERIES ET DES HOMMES

I. Les bactéries

A. Generalites

Les bactéries sont l'une des premières formes de vie apparue sur notre planète. De ce fait les hommes et les bactéries ont toujours co-évolué. Les bactéries sont présentes dans l'environnement comme dans les sols où elles jouent un rôle important dans la décomposition des végétaux ou dans l'eau où elles servent de nourriture aux protozoaires. Les bactéries jouent également un rôle important dans l'organisme humain. Le microbiome est ainsi essentiel à des processus biologiques comme l'assimilation des nutriments.

La première observation des bactéries a été effectuée en 1676 par Antoine Van Leeuwenhoek.[1] A l'époque elles sont appelées animacules, le terme bactérie n'a été utilisé qu'à partir de 1838 après la publication des travaux de Christian Gottfried Ehrenberg. Le terme bactérie a été par la suite redéfini en 1962 par Roger Stanier et Cornelis van Niel pour définir tout organisme ne présentant pas d'organite membré. De ce fait, les bactéries ne possèdent pas de noyau.

Les bactéries ont été regroupées sous différentes familles en fonction de leur morphologie. On retrouve par exemple les coques en forme de sphère, les bacilles en forme de bâtonnet ou les *Helicobacter* de forme hélicoïdale. Elles sont également discriminées par rapport à leur besoin en oxygène, les bactéries n'ayant pas besoin d'oxygène pour se développer sont dites anaérobie, tandis que celles qui en requièrent sont dites aérobies.

L'amélioration des instruments d'observation, mais aussi le développement de la microbiologie ont permis de mieux connaître les différences structurelles entre ces organismes.

B. Structure cellulaire

En plus de la distinction des bactéries par leur morphologie et par leur capacité à se développer en présence ou non d'oxygène, les bactéries peuvent être divisé en deux grandes familles : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. La discrimination des bactéries a été faite au travers d'un test colorimétrique appelé coloration de Gram. La coloration, ou non, des bactéries reflète une différence structurelle de l'enveloppe bactérienne. Les bactéries Gram-négatives sont constituées de deux membranes lipidiques : la membrane

externe et la membrane interne. Ces membranes sont séparées par le périplasme contenant un peptidoglycane fin. Les bactéries à Gram-positif ne comportent qu'une membrane lipidique, qui est recouverte d'une épaisse couche de peptidoglycane. (**Figure 1**)

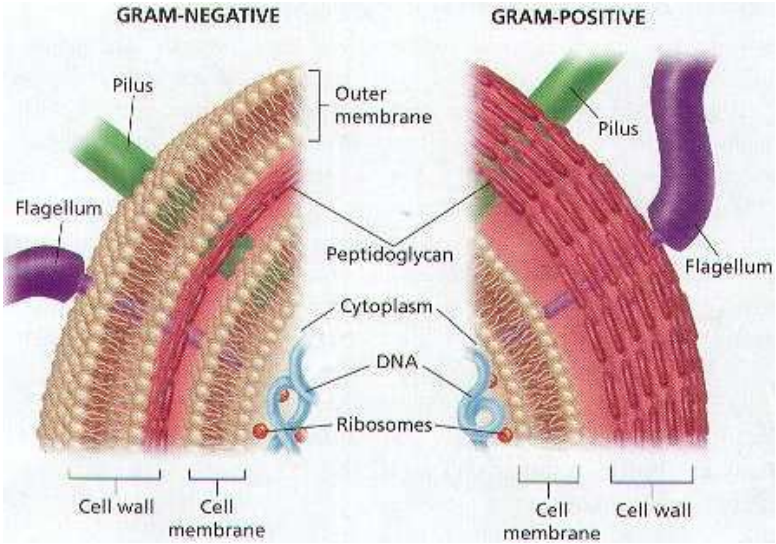


Figure 1 : Comparaison de la structure de l'enveloppe bactérienne chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. (source : https://microbewiki.kenyon.edu/images/1/1b/Gram.jpg)

Le peptidoglycane est un polymère constitué de sucre et d'acides aminés permettant à la bactérie de maintenir son intégrité et sa structure en particulier vis-à-vis de la pression osmotique. La structure du peptidoglycane est un enchainement alterné de *N*-acétylglucosamine (NAG ou Glc*N*Ac) et d'acide *N*-acétylmuramique (NAM ou Mur*N*Ac) lié par une liaison β-1→4 et d'un tétrapeptide (**Figure 2**).

Les bactéries ne comportent ni organites, ni de noyau, le matériel génétique, sous forme chromosomique circulaire et sous forme de plasmides, se trouve directement dans le cytoplasme. Les protéines nécessaires aux processus métaboliques, notamment les ribosomes, nécessaires à la traduction de l'ADN, sont également localisées dans le cytoplasme. Cette organisation cytoplasmique est commune aux bactéries Gram-positives et aux bactéries Gram-négatives. Ainsi, la différence principale entre les bactéries à Gram positif et négatif se situe au niveau de l'envoloppe. Cette caractéristique expliquer pourquoi le spectre de certains antibiotiques peut être différent et affecter soit spécifiquement les bactéries Gram-positives, soit présenter un spectre élargi aux bacilles Gram-négatifs. Les cibles biologiques étant identiques chez les deux types bactériens, l'étroitesse du spectre d'un antibiotique est souvent liée à la capacité de la molécule active à traverser l'enveloppe bactérienne. L'enveloppe

bactérienne étant le premier obstacle rencontré par un xénobiotique, la complexité de l'enveloppe des bactéries Gram négatives les prémunit contre de nombreux antibiotiques.

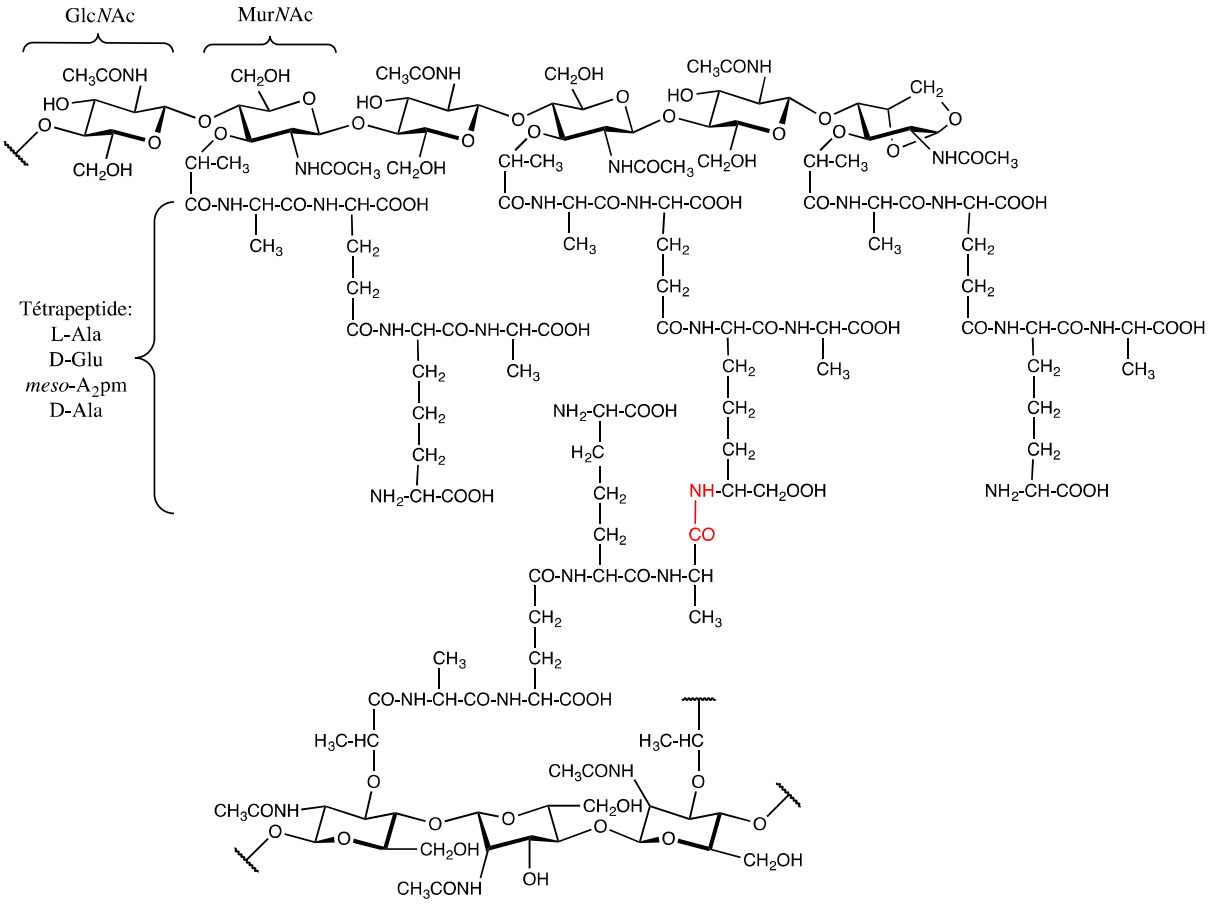


Figure 2 : Structure du peptidoglycane. En rouge, liaison crée par la réaction de transpeptidation. Adaptée de Vollmer *et al.*[2]

II. Les antibiothérapies

A. Historique

Les antibiotiques sont définis comme des substances de faible poids moléculaire permettant de tuer (bactéricide) ou d'inhiber la croissance et la division cellulaire (bactériostatique) des bactéries. Avant la découverte de ces molécules, beaucoup de personnes mourraient à la suite d'infections causées par des pathogènes comme *Staphyloccucus aureus* et *Streptoccocus pyogenes*, infectant les plaies et causant des infections systémiques, *Streptococcus pneumoniae*, causant des pneumonies, ou *Mycobacterium tuberculosis*, pathogène responsable de la tuberculose. Ainsi les antibiotiques ont largement contribué à l'augmentation de l'espérance de vie de l'être humain. Les travaux d'Alexandre Fleming à la

fin des années 20, ont permis de mettre en lumière que les moisissures ont un effet délétère sur les cultures bactériennes. Cet effet délétère est attribué à une substance, produite par un champignon de la famille des *Penicilliums*, que Fleming nomma pénicilline. Plusieurs années ont été nécessaires à Florey et Chain pour extraire et purifier la pénicilline en quantité suffisante pour pouvoir l'utiliser à des fins thérapeutiques. La pénicilline a aussi pu être utilisée à partir des années 40. En parallèle de ces recherches sur les β-lactames, les chimistes et notamment Gerhard Domagk ont mis au point le premier antibiotique de synthèse, un sulfamide à la fin des années 30.[3]

Ces deux grandes découvertes ont ouvert la voie aux traitements antibiotiques, la recherche sur ces molécules connaît son âge d'or et des nouvelles classes d'antibiotiques sont découvertes entre 1949 et 1962, principalement isolé à partir de sources naturelles. La recherche de nouveaux antibiotiques a ensuite été peu récompensée entre les années 60 et les années 2000, seul des modifications structurales dans des familles déjà connues sont reportées. Pendant cette période, les carbapénèmes, qui font partis de la famille de β-lactames, ont été mis au point. Au début des années 2000, de nouvelles classes d'antibiotiques font leur apparition, comme les oxazolidinones et les lipopeptides. Aujourd'hui, peu de nouvelles classes d'antibiotiques sont en cours de développement et le nombre de nouveaux antibiotiques de familles déjà exploitées se réduit. (**Figure 3**).

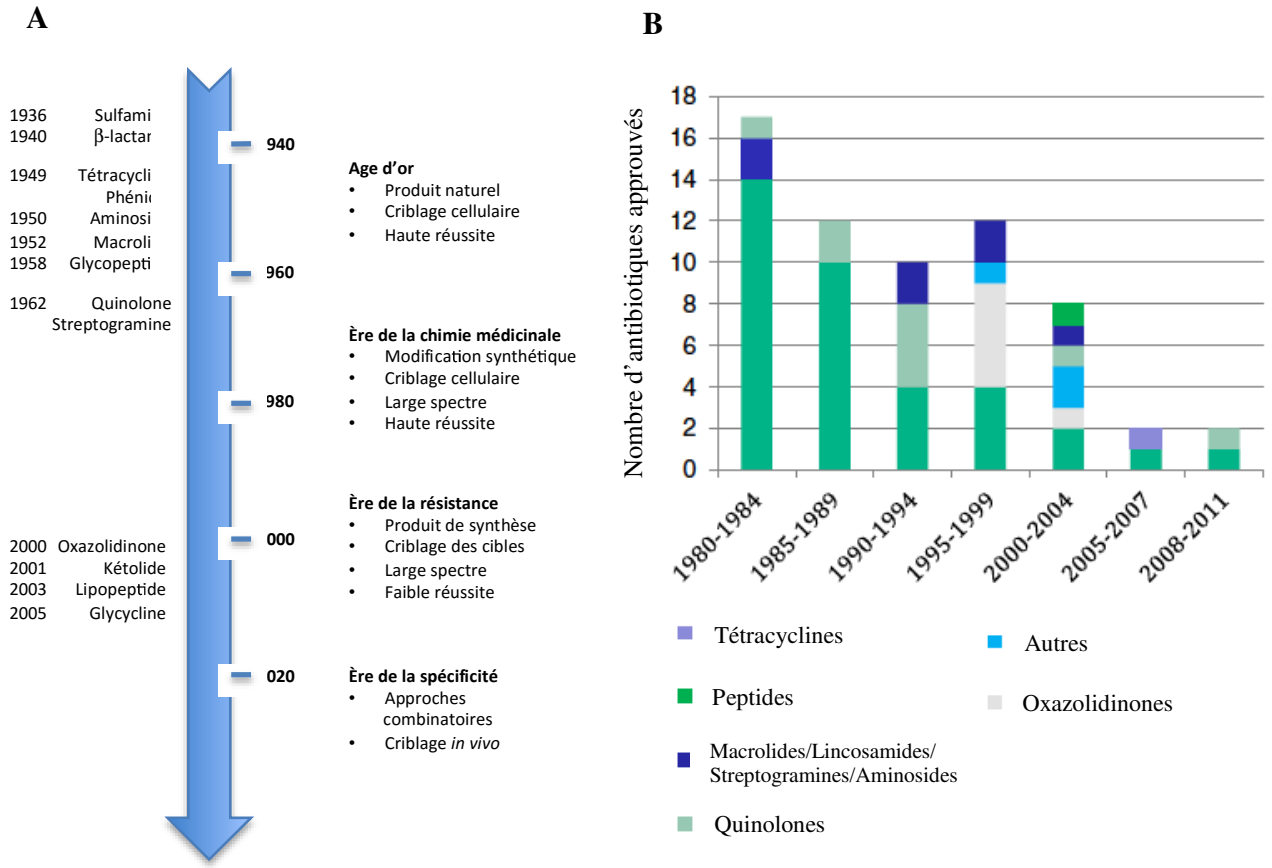


Figure 3 : a) Chronologie de l'apparition des différentes classes d'antibiotiques. Adapté de Brown & Wright (2016)[4] et Walsch *et al.* (2003)[5] b) Nombre de nouveaux antibiotiques approuvés entre 1980 et 2011. Tiré de Bassetti *et al* (2013)[6]

B. Cibles et modes d'actions des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être répartis en fonction de leur cible biologique et/ou par leur mode d'action. En compilant les données correspondant aux antibiotiques actuellement mis sur le marché, il apparait cinq principaux modes d'action :

- L'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
- L'inhibition de la synthèse des protéines
- L'inhibition de la synthèse de l'ADN
- La dépolarisation de la membrane
- L'inhibition d'une voie métabolique (exemple : le métabolisme des folates)

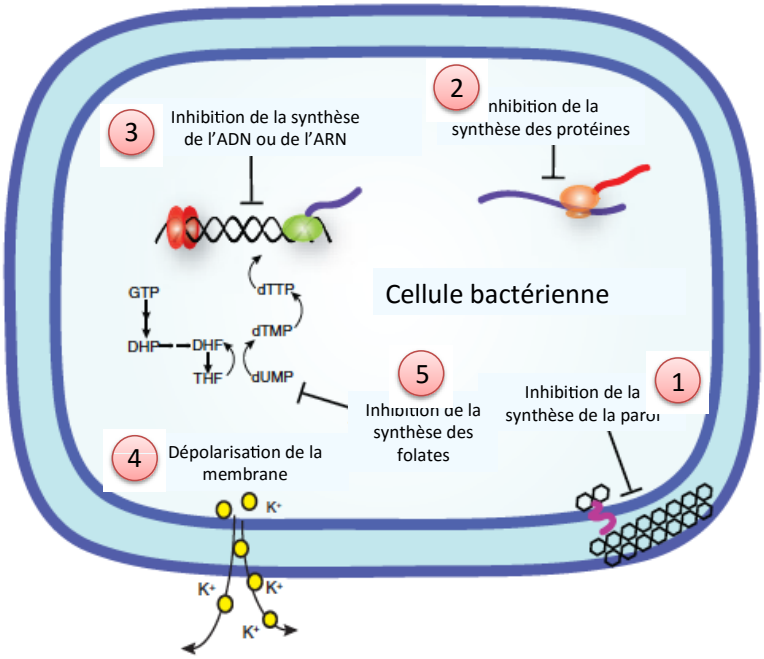


Figure 4 : Principales cibles biologiques des antibiotiques actuels. Adaptée d'après Clatworthy *et al.*[7]

1. Inhibitions de la synthèse de la paroi bactérienne

Comme nous l'avons mentionné précédemment l'enveloppe bactérienne est principalement composée de bicouches lipidiques et du peptidoglycane. Les β-lactames et les glycopeptides sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane. Les cellules eucaryotes ne contenant pas de peptidoglycane, la biosynthèse de ce biopolymère est une cible de choix pour des traitements antibiotiques présentant à priori des effets secondaires réduits sur l'hôte.[8]

a) β-lactames

Ces antibiotiques inhibent la biosynthèse du peptidoglycane. La biosynthèse de ce biopolymère débute dans le cytoplasme, l'acide *N*-acétylmuramique (NAM) est lié à un pentapeptide, composé dans la majorité des cas des acides aminés : L-alanine - Acide D-glutamique - Acide *meso*-diaminopimélique-D-alanine-D-alanine.[9] Le NAM-peptide est transporté au travers de la membrane cytoplasmique et est lié avec la *N*-acétylglucosamine (NAG). Le dérivé consitué de l'enchènement des sucres NAG et NAM, lié au peptide, est ensuite lié au peptidoglycane en croissance à l'extérieur de la membrane ou dans le périplasme. Enfin, la réticulation des chaines glycanes linéaires est catalysée par la transpeptidase. La réticulation à lieu entre l'acide carboxylique du résidu D-Ala en position 4

et de l'amine du diaminoacide en position en 3. La réaction entre ces deux fonctions forme une liaison peptidique et élimine le résidu alanine en 5ème et dernière position du petptide, conduisant à l'obtention d'un tetrapeptide. (**Figure 2** p.19 et **Figure 5**).

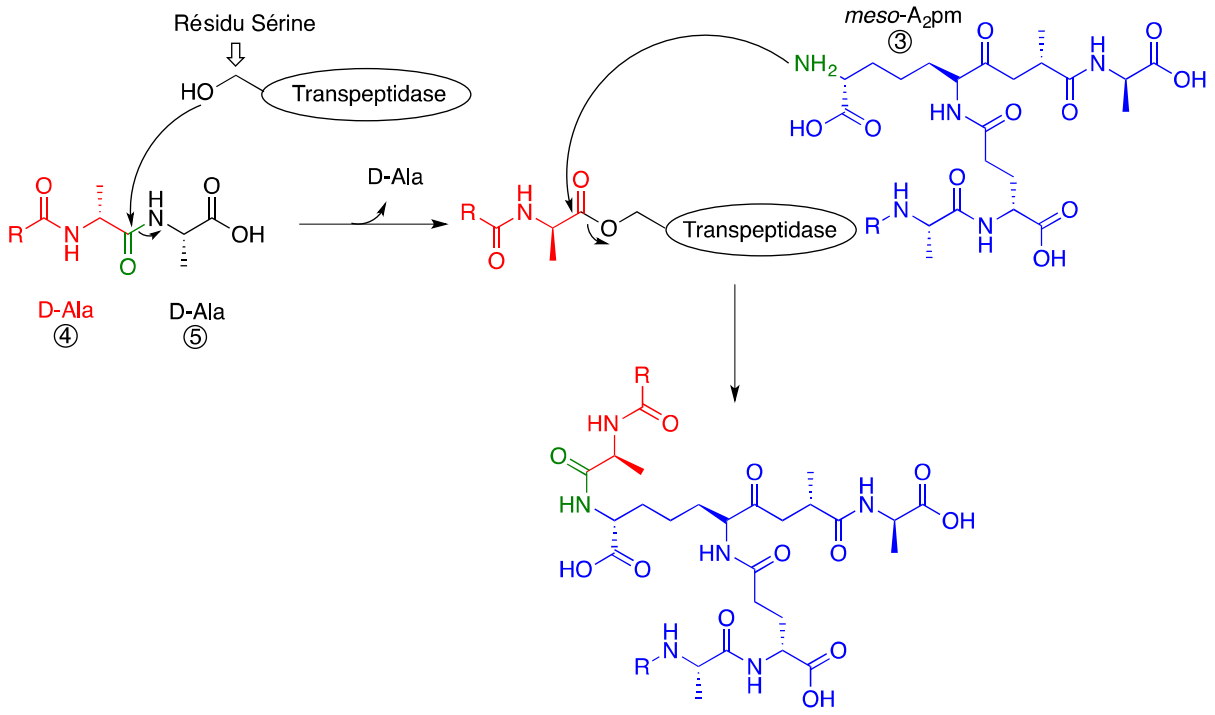


Figure 5 : Mécanisme de la réaction de transpeptidation conduisant à la réticulation du peptidoglycane. En bleu : chaîne acceptrice, en rouge chaîne donneuse, en vert : liaison crée par la réaction de.

Les β-lactames tirent leur nom du fait qu'ils contiennent un amide cyclique inclu dans un cycle à 4 chainons, appelé cycle β-lactame. Les β-lactames peuvent être regroupés en différentes familles : les pénicillines **1**, les céphalosporines **2**, les carbapénèmes **3** et les monobactames **4** (**Figure 6**).

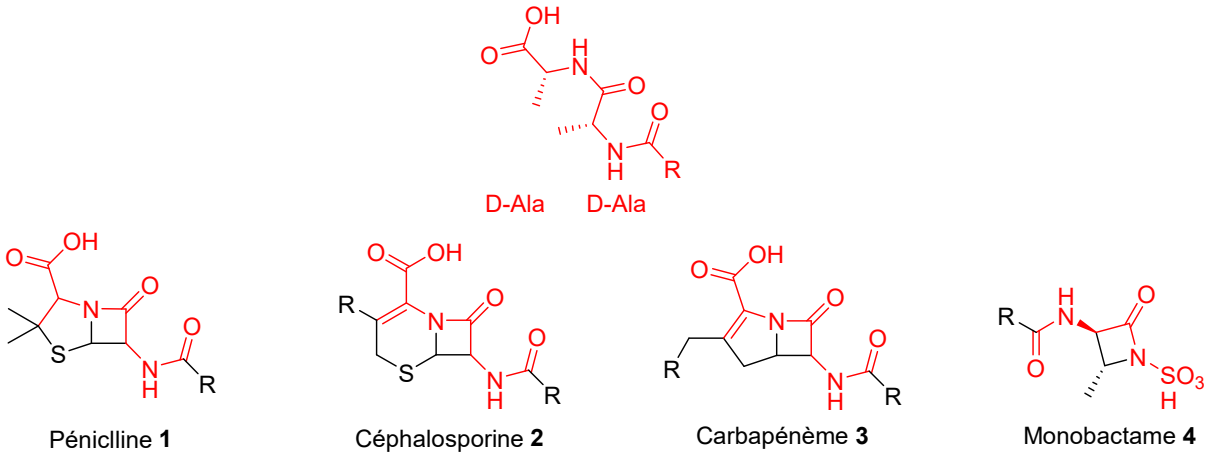


Figure 6 : Structure du motif D-Ala-D-Ala mimé par les β-lactames et structures générales des différentes familles de β-lactames.

Les β-lactames ont une structure mimant la terminaison D-Ala–D-Ala du peptide du monomère de peptidoglycane. Lorsque la transpeptidase prend pour substrat un β-lactame, la sérine du site actif de l'enzyme créer une liaison ester en réagissant avec le cycle β-lactame. Le β-lactame joue ici le rôle d'un inhibiteur suicide. L'intermédiaire acyl-enzyme ainsi formé est stable et ne s'hydrolyse que lentement, ralentissant fortement le recyclage du site actif de l'enzyme ce qui de fait ralentit, la synthèse du peptidoglycane. Ce mécanisme peut également déclencher une autolyse de la paroi, conduisant à la lyse bactérienne[10] (**Figure 7**)

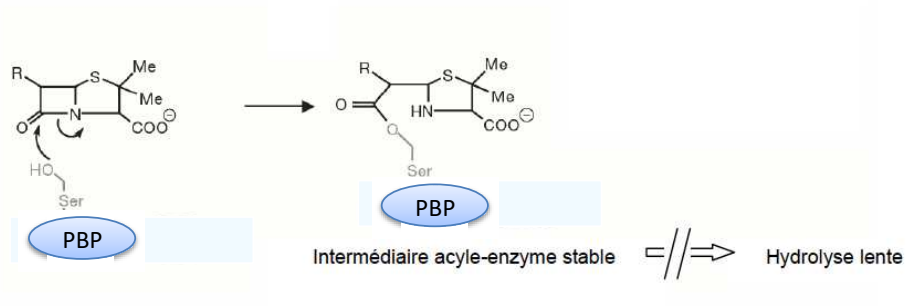


Figure 7 : Mécanisme d'action des β-lactames. Adapté de Walsh (2000) [11]. PBP (*penicilin binding protein*), ici la transpeptidase dans notre exemple.

b) Glycopeptides

Les glycopeptides sont des produits naturels ou semi-synthétique. Le premier glycopeptide à avoir été mis sur le marché est la vancomycine **5**, un peptide tricyclique, branché, glycosylé et d'origine non ribosomale (**Figure 8**). Cette molécule est obtenue par fermentation de la bactérie *Amycolatopsis orientalis*. La vancomycine a montré une activité antibiotique impressionnante sur les souches de *staphylococci* résistante aux β-lactames. Elle

a longtemps été le recours ultime contre les souches multi-résistantes de *Staphyloccocus aureus*. Des résistances contre cet antibiotique sont désormais courantes.

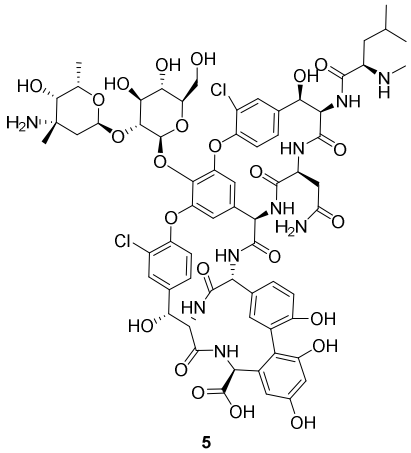


Figure 8 : Structure de la vancomycine.

Tout comme les β-lactames, les glycopeptides inhibent la synthèse du peptidoglycane, mais par un mécanisme différent. Les glycopeptides ne sont pas des inhibiteurs suicides, ils forment des liaisons hydrogènes avec le motif D-Ala–D-Ala du monomère de peptidoglycane (NAG-NAM-pentapeptide) empêchant ainsi l'étape d'élongation de la chaine glycosidique [12]. Compte tenu de son poids moléculaire, cette molécule n'est pas capable de passer la membrane externe des bactéries Gram-négatives pour atteindre le peptidoglycane localisé dans le périplasme. L'utilisation des glycopeptides est donc limitée aux bactéries Gram-positives.

2. *Inhibition de la synthèse protéique*

La biosynthèse des protéines est l'ensemble des processus biochimiques permettant à la bactérie de produire des protéines à partir de l'information génétique. Pour cela, l'ADN chromosomique est transcrit en ARN messager (ARNm) qui est traduit par le ribosome en protéine. Cette traduction se déroule en 4 étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage du ribosome.

Ce processus crucial peut être inhibé par plusieurs familles d'antibiotiques agissant sur différentes étapes de la synthèse protéique. Les tétracyclines (doxycline **6**) inhibent l'interaction de l'ARNt portant les acides aminés avec le ribosome, tandis que les phénicols (chloramphénicol **7**) inhibent la formation de liaison peptidique entre les acides aminés. Les

aminosides aussi appelés aminoglycosides (gentamycine **8**) induisent des erreurs lors du décodage de l'ARNm, les macrolides (érythromycine **9**) induisent des terminaisons prématurées. Les oxazolidinones (linézolide **10**), quant à elles, inhibent la formation du complexe d'initiation.[13–15] (**Figure 9**).

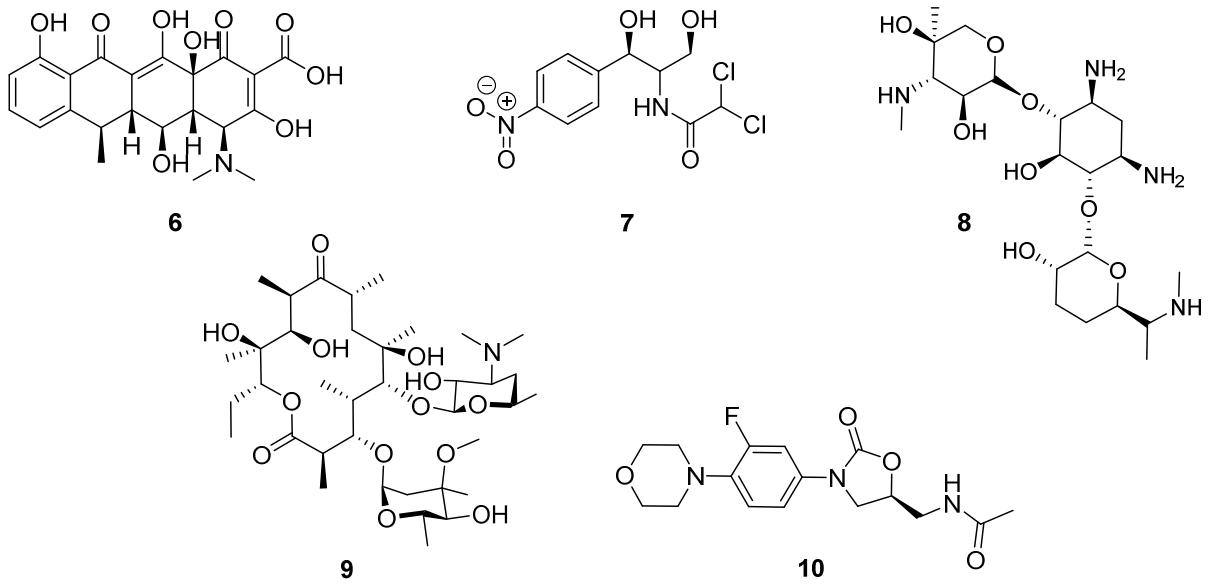


Figure 9 : Structures d'antibiotiques inhibant la synthèse protéique.

Les oxazolidinones ayant été particulièrement étudiées dans le cadre de notre projet, tout comme les antibiotiques de type β-lactame, nous avons souhaité décrire plus précisément le mode d'action de ces composés. Les oxazolidinones sont une classe d'antibiotiques obtenus par synthèse organique et comptent parmi les antibiotiques les plus récemment mis sur le marché. L'activité de ce type de molécule a été démontrée en 1987 et au cours du criblage de plusieurs milliers de structures contenant le motif oxazolidinones, le linézolide **10** s'est distingué pour son activité antibiotique *in vivo* combinée avec des propriétés pharmacocinétiques, et de solubilité compatibles avec le développement d'un antibiotique potentiel.[16,17] Le linézolide est, à ce jour, la seule oxazolidinone utilisée pour le traitement d'infections chez l'être humain. Il est notamment utilisé comme antibiotique de dernière ligne dans le traitement d'infections causées par *Staphyloccocus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et les *enteroccocci* résistant à la vancomycine.[18] Cependant les traitements par cette molécule doivent être limités dans le temps en raisons d'effets secondaires importants (myélosuppression, inhibition des monoamines oxydases, etc.).[19,20]

Le linézolide se lie de façon non covalente à la sous unité 50S du ribosome, plus exactement dans le site A. Le linézolide inhibe l'initiation de la synthèse peptidique en occupant la position que devrait prendre l'acide aminé lié à l'ARNt (**Figure 10**).[14,21,22]

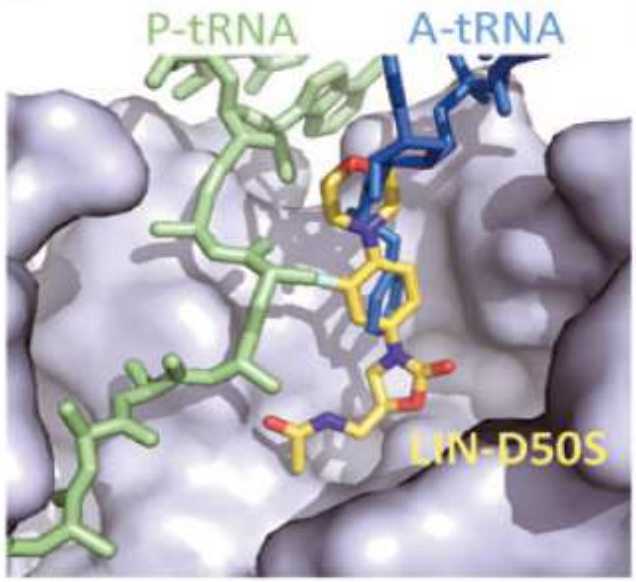


Figure 10 : Structure tridimensionnelle du ribosome montrant la position prise par le linézolide dans le site A. En vert: ARNt dans le site P, en bleu : ARNt dans le site A, en jaune : position du linézolide. Tirée de Wilson *et al.*[14]

De nouvelles oxazolidinones, le sultézolide **11**, le radézolide **12**, le tédizolide **13** ou encore le cadazolide **14**, un conjugué fluoroquinolone-oxazolidinone, sont en phases cliniques afin de pallier aux effets secondaires du linézolide, mais aussi aux phénomènes de résistances qui sont apparues dès le milieu des années 2000 (**Figure 11**).[6,23,24]

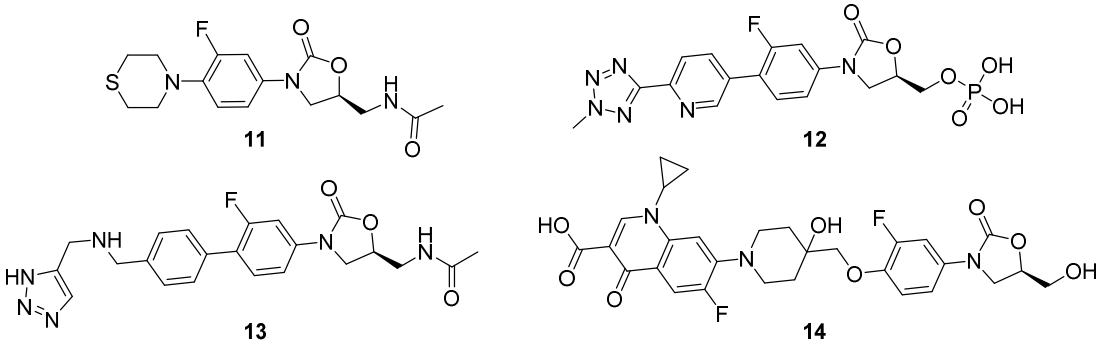


Figure 11 : Structures d'oxazolidinones en cours de développement.

Le linézolide reste un antibiotique à spectre restreint puisque son activité sur les bacilles Gram-négatifs est faible à inexistant dans les concentrations utilisables chez l'être

humain. Les nouvelles oxazolidinones **11** à **14** ne semblent pas capable d'étendre significativement ce spectre.[6] La découverte d'oxazolidinones capables d'inhiber la croissance des bactéries Gram-négatives est l'un des moteurs actuels de la recherche sur cette famille d'antibiotiques. C'est aussi l'un des ressorts du présent projet.

3. Inhibition de la réplication ou de la transcription de l'ADN

La synthèse de l'ADN est primordiale pour la division cellulaire bactérienne (réplication de l'ADN), nécessaire lors de la prolifération infectieuse. Dans ce contexte, les quinolones puis leurs dérivés, les fluoroquinolones, ont permis d'inhiber cette étape essentielle de la croissance bactérienne.

Les quinolones constituent une famille d'antibiotiques synthétiques, dont l'acide nalidixique **15** a été le premier représentant. Cette quinolone de première génération a été utilisée dans le traitement des infections urinaires, bien qu'elle présente une activité modérée et une faible absorption orale. Des modifications sur le noyau hétérocyclique, notamment la substitution du cycle aromatique par un fluor, ont permis d'accroitre l'activité de ces antibiotiques.[25] Plusieurs générations de fluoroquinolones ont ainsi été developpées. La norfloxacine **16** et la ciprofloxacine **17** font partie de la deuxième génération de fluoroquinolones, tandis que la levofloxacine **18**, l'analogue levrogyre de l'ofloxacine, appartient à la troisième génération et la moxifloxacine **19** à la quatrième (**Figure 12**).

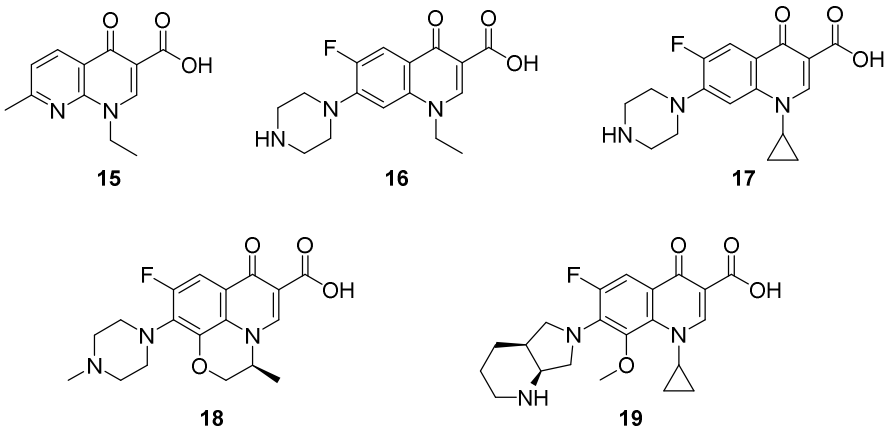


Figure 12 : Structures de quinolones et de fluoroquinolones.

La cible principale de ces antibiotiques sont les topoisomérases bactériennes, responsables de la dynamique fonctionnelle de l'ADN gyrase lors du processus de réplication.[28,29] Ces mécanismes comportent une étape où l'ADN double brin est coupé. Lors

de la coupure, chaque nouvelle terminaison 5' de l'ADN est liée de manière covalente à la topoisomérase par une tyrosine du site catalytique, formant le « complexe de clivage ».[30] Après le passage d'un second brin d'ADN au sein de la brèche, les liaisons au sein de l'ADN clivé sont reformées. Les topoisomérases lient l'ATP, dont l'hydrolyse fournie l'énergie nécessaire au cycle catalytique. [28]

Les fluoroquinolones s'insèrent dans la topoisomérase. Elles forment un pont entre une sérine et un acide aminé portant un acide carboxylique (Glu/Asp) à l'aide d'un atome de magnésium. [27,31] Cette insertion stabilise le complexe de clivage et empêche la reformation de la coupure au sein de l'ADN. [32] (**Figure 13**)

Si les fluoroquinolones n'ont pas été utilisées directement dans le cadre du présent projet, ces antibiotiques seront mentionnés dans la suite de ce manuscrit, car ils ont été pendant très longtemps l'objet d'étude du laboratoire dans des approches de type cheval de Troie utilisant les sidérophores comme vecteurs.

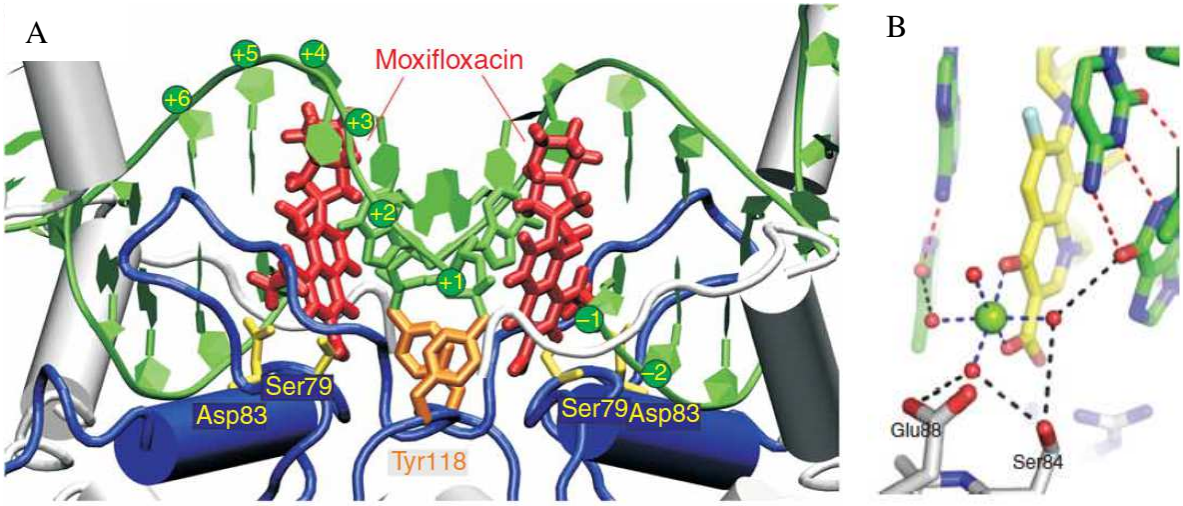
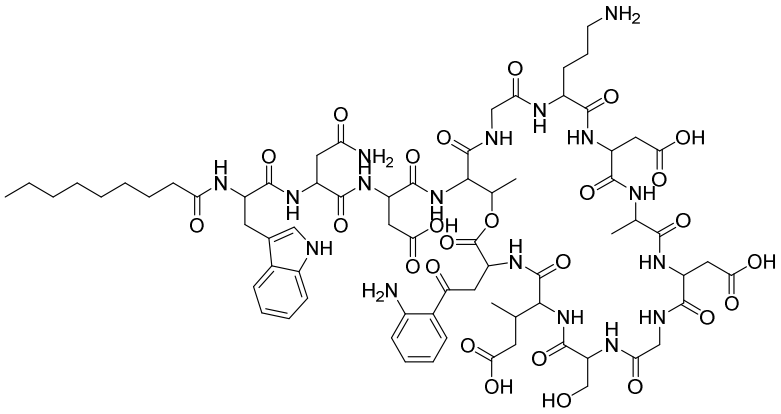


Figure 13 : A. Moxifloxacine dans le site actif de la topoisomérase. (En rouge : moxifloxacine, en vert : ADN, en bleu ; topotisomérase, en orange: résidu tyrosine formant une liaison avec l'ADN). Tiré de Laponogov et al (2009)[26] **B.** Liaison entre la moxifloxacine (en jaune) ; l'ADN (en vert), la topoisomérase (en gris) et un atome de magnésium (en vert).Tiré de Wohlkonig (2010).[27]

4. *Dépolarisation de la membrane*

Les lipopeptides font partie des antibiotiques les plus récemment mis sur le marché. Bien que le premier lipopeptide, la daptomycine **20** ait été isolé en 1986 par des chercheurs chez *Eli Lilly*, sa mise sur le marché ne date que de 2003. [33] Ces antibiotiques ont montré une activité antibiotique sur les bactéries à Gram positif mais ne sont pas efficaces sur les bactéries à Gram négatif.[34] (**Figure 14**)



20

Figure 14 : Structure de la daptomycine.

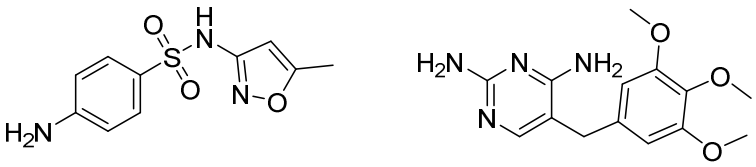
La chaine latérale alcane des lipopeptides interfère avec la bicouche lipidique et créent des canaux laissant passer les ions potassium et causant une dépolarisation de la membrane.[35] Ces évènements conduisent à une inhibition des étapes de division cellulaire et de synthèse du peptidoglycane.[36] La structure particulière de l'enveloppe des bactéries Gram-négatives est donc une bonne protection contre de telles molécules.

5. *Inhibiteur du métabolisme de l'acide folique*

L'acide folique est un précurseur nécessaire à la synthèse de certaines bases nucléiques. Chez les bactéries, l'acide folique est synthétisé à partir de l'acide *p*-aminobenzoïque (PABA) et de GTP. Cette réaction est catalysée par la dihydroptéroate synthétase pour former l'acide dihydropteroïque.[37]

Les sulfamides, comme le sulfaméthozaxole **21**, sont des analogues du PABA. Cet antibiotique inhibe de manière compétitive la dihydroptéroate synthétase. Les sulfamides ont une affinité plus forte pour leur cible que le substrat naturel. L'inhibition de cette étape du métabolisme de l'acide folique ne permet pas de former les espèces réactives nécessaires à la synthèse des bases nucléiques et inhibe donc la croissance cellulaire.[37,38]

En traitement clinique, le sulfaméthozaxole **21** est utilisé en combinaison avec le triméthoprime **22,** inhibant la dihydrofolate réductase, une enzyme également impliquée dans le métabolisme des folates. La combinaison de ces deux substances génère un effet synergique. (**Figure 15**)



21 **22**

Figure 15 : Structure du sulfaméthozaxole **21** et du triméthoprime **22**

C. La resistance aux antibiotiques

Les antibiotiques sont probablement les médicaments qui ont le plus contribués à l'allongement de l'espérance de vie des populations humaines au cours du XXe siècle. Ces composés ont permis de soigner de nombreuses infections lors de leur introduction sur le marché. Malheureusement, l'utilisation thérapeutique d'un antibiotique conduit à l'apparition de certaines sous-populations bactériennes qui ne réagissent plus efficacement au traitement : c'est le phénomène de résistance. La résistance peut être constatée quelques années après la mise sur le marché d'un antibiotique même si désormais il est admis que les premières résistances peuvent apparaitre dès les phases cliniques notamment pour les antibiotiques les plus récents. (**Figure 16**)

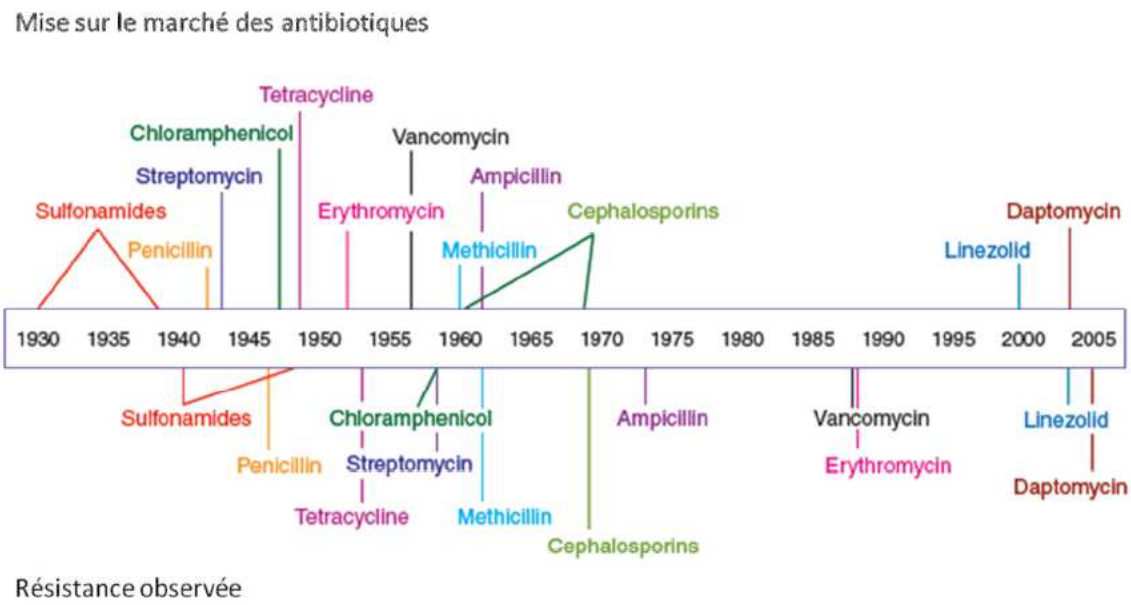


Figure 16 : Frise chronologique représentant l'entrée sur le marché des antibiotiques et l'apparition des premières résistances.

Aujourd'hui il est admis que la résistance à un antibiotique reste une question de temps plus qu'une question d'activité initiale, de spectre d'activité ou de cible biologique. La possibilité de mettre au point un antibiotique ne générant aucune résistance est de ce point de vue illusoire puisque la résistance est un processus évolutif accéléré par la pression sélective des antibiothérapies. Cette résistance peut-être naturelle, liée à la perméabilité ou au métabolisme spécifique d'une bactérie. Néanmoins des résistances peuvent aussi être acquises. Les facteurs induisant cette résistance peuvent être codés par des plasmides transmissibles entre bactéries.[39–41] Ces résistances peuvent s'appuyer sur différents mécanismes, que l'on peut regrouper en 3 catégories (**Figure 17**) :

- La diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique, soit par la diminution de l'expression des systèmes d'import, soit par l'expression des systèmes d'efflux.
- L'inactivation de l'antibiotique, soit par hydrolyse, soit par modification chimique.
- La diminution de l'affinité entre l'antibiotique et sa cible par modification de la cible ou par surexpression de la cible.

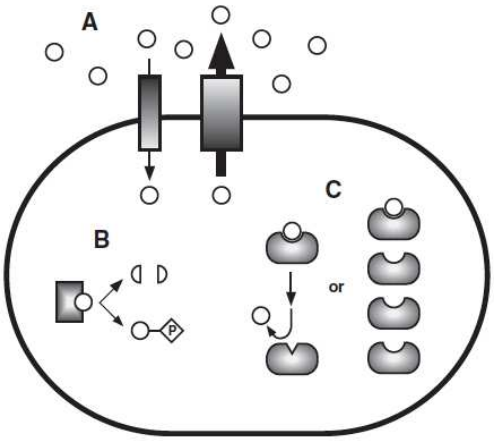


Figure 17 : Les principaux mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques. A : diminution de l'import ou augmentation de l'efflux de l'antibiotique ; B : hydrolyse ou modification chimique de l'antibiotique ; C : modification ou augmentation de la production de la cible. Les sphères blanches représentent l'antibiotique. Tirée de Yoneyama *et al.*[38]

1. Modification de la cible

La modification de la cible peut avoir lieu soit par une mutation dans le génome codant pour la cible, soit par une modification chimique post-traductionnelle sur la cible biologique. Ainsi par exemple chez les *enteroccoci* résistants à la vancomycine, le dipeptide D-Ala-D-Ala terminal du monomère de peptidoglycane est remplacé par un peptide avec une Ala-Lactate (Lac) (**Figure 18**). Cette modification fait perdre une liaison hydrogène entre la vancomycine et le peptide, faisant diminuer l'affinité d'un facteur 1000. Ce peptide est tout de même substrat de la réaction de transpeptidation.[42]

La modification de la cible est également un mécanisme de résistance courant contre les fluoroquinolones. Les acides aminés sérine et acide (Glu/Asp) nécessaires à liaison de l'antibiotique dans le site catalytique sont substitués, conduisant à une importante réduction de l'affinité de la fluoroquinolone pour le site liaison.[32,43] Dans le cas de la résistance aux aminosides, l'ARN ribosomale peut être méthylé par une méthyltransferase, conduisant à une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible sans impact sur la fonctionnalité du ribosome.[44,45] Enfin outre la modification de la cible, la surexpression de sa forme sauvage peut aussi conduire à une forme de résistance dose-dépendante, puisqu'une quantité accrue de cibles nécessite des concentrations efficaces en antibiotique plus importantes.

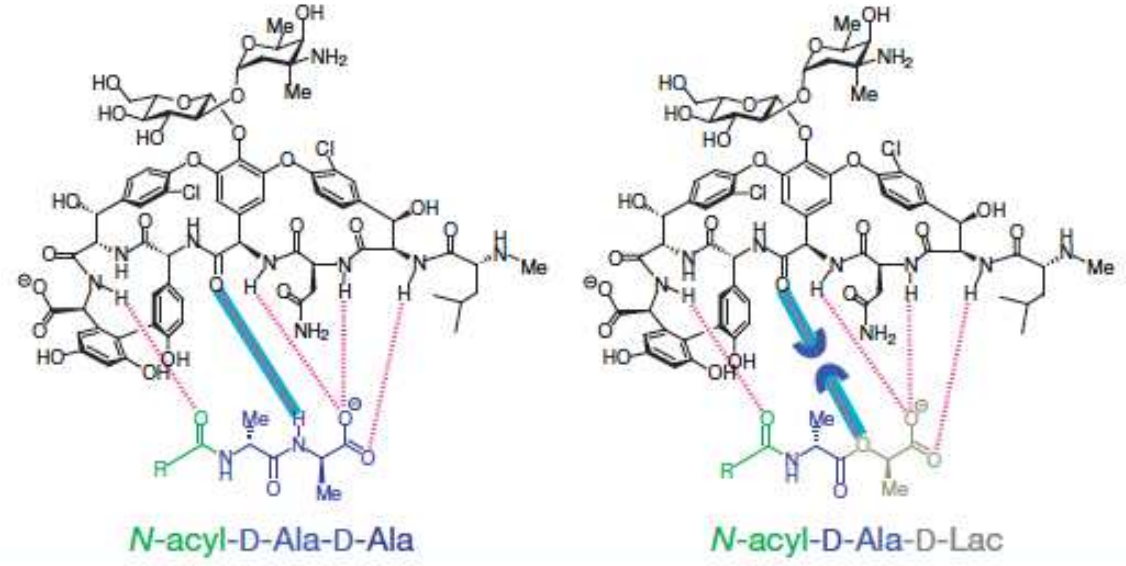


Figure 18 : Vancomycine lié au motif D-Ala-D-Ala ou D-Ala-D-Lac du peptidoglycane. Tiré de Walsh (2000)[11]

2. *Inactivation de l'antibiotique*

L'inactivation des antibiotiques est le résultat de différents mécanismes enzymatiques, soit par hydrolyse, soit par conjugaison avec une copule favorisant la métabolisation ou l'élimination (phosphorylation, acétylation…). Parmi ces mécanismes, l'hydrolyse des β-lactames est l'un des mécanismes les plus courants pour la dégradation de l'antibiotique. La bactérie produit des enzymes, appelés β-lactamases, capable d'hydrolyser le cycle des β-lactames. Les β-lactamases sont excrétées dans le milieu extracellulaire chez les bactéries à Gram positif, et dans le périplasme chez les bactéries à Gram négatif.[10] Une fois le cycle hydrolysé, l'antibiotique n'est plus capable d'inhiber la transpeptidase.[46] (**Figure 19**)

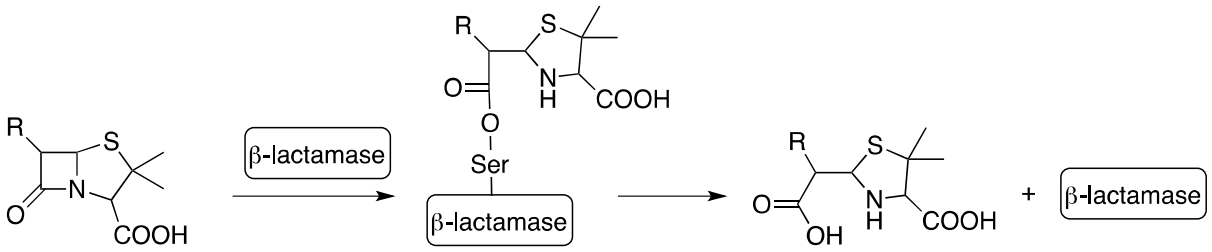


Figure 19 : Mécanisme d'hydrolyse des β-lactames par les β-lactamases

Les aminosides sont des antibiotiques qui ne sont pas sensible à l'hydrolyse, leur désactivation est due à des modifications chimiques covalentes. Il existe trois types de modifications pour les fonctions réactives de l'aminoglycoside : l'acétylation d'une amine, la phosphorylation ou l'adénylylation d'un hydroxyle. Ces mécanismes sont catalysés par différentes enzymes de type transférase au sein de la bactérie.[47] (**Figure 20**)

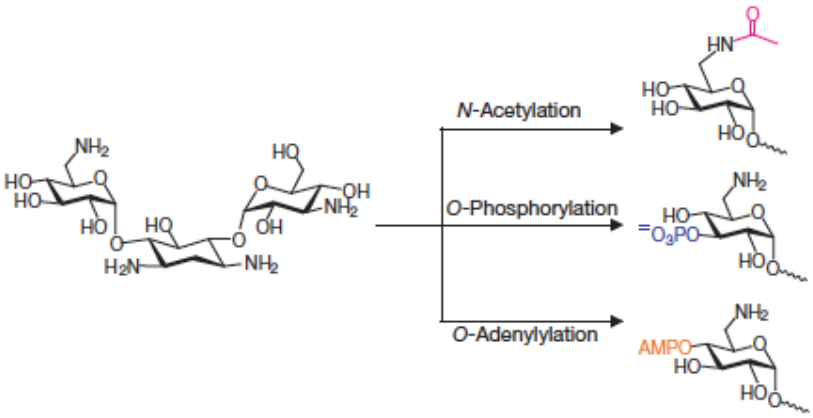


Figure 20 : Inhibition de la kanamycine par *N*-acétylation, *O*-phosphorylation ou *O*-adénylylation. Tiré de Walsh (2000)[11]

3. *Réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique*

Afin d'être efficace, l'antibiotique doit atteindre une certaine concentration au sein de la bactérie. Cette concentration une fois atteinte l'inhibition de la cible vient concurrencer l'expression des cibles néo-synthétisées. Pour diminuer la concentration efficace des antibiotiques, les bactéries peuvent diminuer l'expression des voies permettant à l'antibiotique de rentrer ou elles peuvent aussi exprimer, ou sur-exprimer des systèmes membranaires d'efflux augmentant la reexcrétion des xénobiotiques.

Ainsi par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa*, la porine OprD est, entre autres, responsable du transport des carbapénèmes. Des souches cliniques n'exprimant plus cette porine ont montré une résistance accrue à l'imipenème.[48,49] De plus *Pseudomonas aeruginosa* exprime douze pompes d'efflux de la famille des RND (Résistance-Nodulation-Division). Ces pompes permettent l'extrusion des antibiotiques contenus dans le périplasme et dans le cytoplasme vers le milieu extracellulaire.[50,51] Ces modifications des systèmes d'import et la mise en place de processus d'efflux des xénobiotiques confère une résistance à de nombreuses

classes d'antibiotiques (β-lactames, fluoroquinolones, tétracyclines, phénicols, macrolides, aminosides).[40,50]

L'une des méthodes pour contourner ce type de résistance lié à la perméabilité membranaire est d'utiliser les voies naturelles d'import des nutriments exprimés par les bactéries, pour accélérer ou promouvoir l'entrée d'antibiotique dans les compartiments internes. Cette approche consiste à utiliser des conjugués entre un nutriment et un antibiotique et miser sur la reconnaissance, le transport puis l'accumulation des conjugués par les systèmes d'acquisition de la bactérie. Pour être efficace ce type de stratégie dite du « cheval de Troie » doit être fondé sur un nutriment :

- essentiel à la bactérie
- non métaboliquement substituable
- dont les mécanismes d'import diffèrent de ceux exprimés par l'hôte

Dans ce contexte, le fer et les mécanismes d'assimilation de ce métal sont des candidats particulièrement prometteurs.

DU FER ET DES BACTERIES

I. Le fer : un nutriment essentiel pour les bactéries

Le fer est l'élément majeur qui constitue les planètes telluriques, comme notre planète. Le noyau terrestre est en effet constitué d'environ 35% de fer. Cet élément est également retrouvé en quantité importante dans la croûte terrestre où il est existe sous forme d'oxyde de fer : FeO ou Fe_2O_3.

Le fer est un métal de transition connu pour pouvoir adopter plusieurs états d'oxydation allant de -2 à +6. Néanmoins les formes les plus courantes du fer sont le Fe(II) et le Fe(III). A pH physiologique et en milieu aérobie le fer est très peu biodisponible principalement à cause de la faible solubilité des oxydes de Fe(III) dans ces conditions. La concentration en Fe(III) dans l'environnement est ainsi estimée à 10^{-9} M. Dans les fluides de l'hôte, le fer est encore moins disponible car lié à différentes protéines, comme les transferrines, les lactoferrines ou encore les protéines héminiques. De ce fait, la concentration de fer libre dans l'organisme est estimé entre 10^{-18} et 10^{-24} M.[52] La séquestration du fer par l'hôte permet de protéger l'organisme contre des espèces chimiques réactives générées par le fer par la réaction de Fenton ($Fe^{2+}_{(aq)} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}_{(aq)} + OH^-_{(aq)} + \cdot OH$) mais aussi de protéger l'organisme contre les infections en rendant ce nutriment essentiel moins disponible pour les pathogènes.

En effet, à part *Borrelia burgdorferi* et *Lactobacillus plantarum,* tous les micro-organismes ont besoin de fer pour proliférer. Une concentration de 10^{-6} M est estimée nécessaire pour une croissance bactérienne optimale.[53] Le fer est en effet présent dans le site actif de nombreuses enzymes impliquées dans les processus métaboliques, la respiration ou dans la formation des désoxyribonucléotides, nécessaires à la biosynthèse de l'ADN.[54] La différence entre les besoins bactériens en un nutriment essentiel et la biodisponibilité du fer à conduit l'évolution à doter les bactéries de systèmes efficaces d'acquisition du fer. Dans le cadre de ce projet nous nous intéresserons plus particulièrement aux systèmes de transport du fer exprimés par *Pseudomonas aeruginosa*, organisme d'intérêt du laboratoire depuis bientôt deux décennies.

II. Systèmes d'acquisition du fer chez *Pseudomonas aeruginosa*

A. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* : GENERALITES

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram-négative, aérobie, ubiquitaire. Bien que cette bactérie soit commune dans les sols et l'eau, elle est capable d'infecter les plantes, les animaux ainsi que l'Homme dans des cas particuliers. Cette bactérie est dite opportuniste, car elle infecte les personnes déjà atteintes par d'autres pathologies, en particulier les patients atteints de mucoviscidose, les personnes immunodéprimés et les grands brulés. Chez les patients atteints de mucoviscidose, la proportion d'adultes infectés peut atteindre 80%.[55] *P. aeruginosa* est intrinsèquement résistante aux antibiotiques, principalement à cause de son enveloppe peu perméable aux xénobiotiques. Sa perméabilité membranaire a ainsi été estimée 12 à 100 fois plus faible que celle d'*Escherichia coli.*[56] De plus *P. aeruginosa* peut s'organiser en biofilm. Le biofilm est une matrice extracellulaire composé d'exopolymères de polysaccharides, de protéines et d'ADN dans laquelle les bactéries sont enchâssées. [57] Cette matrice a pour but de protéger les bactéries du système immunitaire de l'hôte, notamment de la phagocytose,[58] cependant il apporte aussi une protection contre les traitements antibiotiques.[59]

Lors de l'infection, *P. aeruginosa* sécrète plusieurs facteurs de virulence. Ces molécules vont permettre à la bactérie de détériorer les protéines de l'hôte et ainsi de récupérer les nutriments libérés. Parmi ces facteurs de virulence mentionnons la pyocyanine, qui expose les cellules à un stress oxydatif [60,61], des toxines (par ex. exotoxine A), des protéases, notamment l'élastase (LasB) capable de cliver les protéines à fer,[62] pour libérer ce métal et le rendre disponible à l'usage du pathogène. [62]

P. aeruginosa fait partie du groupe de bactéries appelé ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp). Les bactéries de ce groupe font l'objet d'une attention toute particulière car elles « échappent» naturellement à de nombreux traitements antibiotiques actuels et développent des résistances multiples qui en font un challenge sanitaire pour les années à venir.[63]

Pseudomonas aeruginosa a mis en place différents systèmes d'import pour couvrir ses besoins en fer. La structure de l'enveloppe laisse peu d'opportunité à des processus d'import utilisant la diffusion passive pour l'acquisition des nutriments. Ces derniers, comme le fer, font l'objet d'un transport actif lors de leur transfert dans les compartiments internes de la bactérie. Le transport de milieu extracellulaire vers le périplasme est effectué par des transporteurs de la membrane externe (TME). L'énergie nécessaire au transport est fournie par le couplage de la machinerie TonB (complexe protéique TonB-ExbB-ExbD) avec la force proton motrice de membrane interne.[64,65] Dans le périplasme, une protéine périplasmique peut prendre en charge la source de fer pour l'amener à la membrane interne. Le transport au travers de la membrane cytoplasmique est en général lié à l'action de perméases ou de protéines ABC, c'est donc l'hydrolyse de l'ATP qui est la source d'énergie permettant le transfert terminal vers le cytoplasme (**Figure 21**).

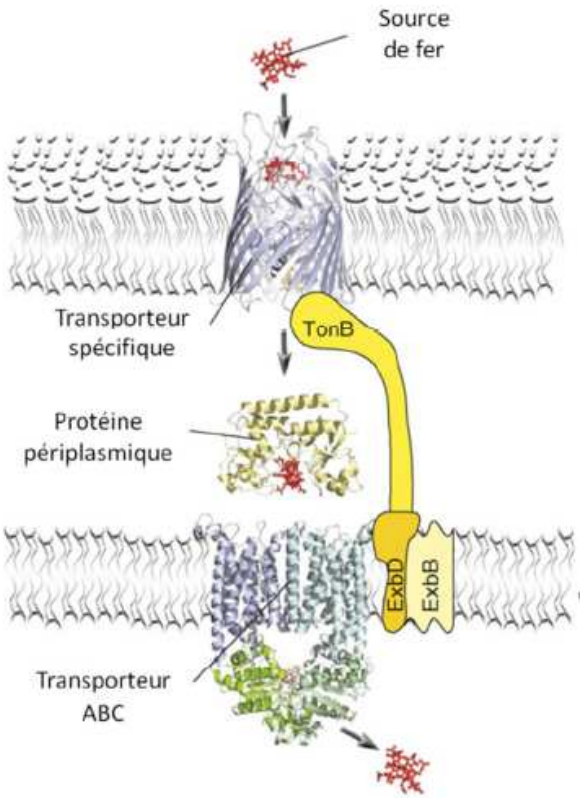


Figure 21 : Schéma général de l'assimilation du fer chez *P. aeruginosa*. Adapté de Schauer *et al.*[64]

P. aeruginosa possède de multiples systèmes d'import du fer, utilisant différentes sources de fer. Cette apparente redondance, permet à la bactérie de s'adapter rapidement à des

environnements très variés.[66] Dans la suite du manuscrit nous allons présenter ces différentes voies d'acquisition et les sources de fer accessible au pathogène en cours de prolifération.

B. Acquisition du fer ferreux

Le Fe(II) est plus soluble dans les milieux aqueux que le Fe(III), mais fortement oxydable il n'est présent que dans les milieux anaérobies ou fortement dépourvus d'oxygène.[67] *P. aeruginosa* peut se retrouver dans de telles conditions au sein d'un biofilm par exemple. De plus, *P. aeruginosa* excrète des phénazines (comme la pyocyanine) capables de promouvoir la réduction du Fe(III) contenu dans les protéines de l'hôte en Fe(II).[68] Le Fe(II) est assimilable par la bactérie grâce à une porine non identifiée de la membrane externe. Le transport au travers de la membrane cytoplasmique est effectué par la perméase FeoB, dont l'énergie est fournie par l'hydrolyse de GTP. L'activité GTPase de FeoB est exacerbé en présence de la protéine cytoplasmique FeoA.[69] (**Figure 22**)

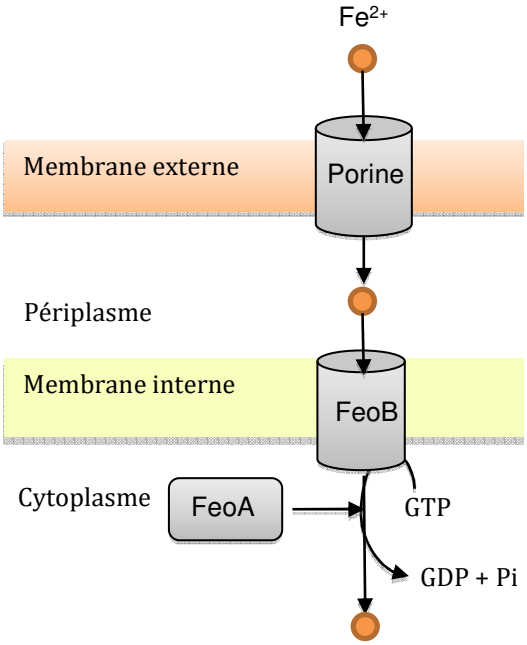


Figure 22 : Fonctionnement schématique du système Feo.

C. Import du fer heminique

Dans l'organisme humain, une grande partie du fer est lié à des protéines contenant des hèmes. Les hèmes sont des molécules de type porphyrinique possédant des chaînes

variables en C3, C8 et C18 et qui permettent de lier le fer dans des protéines appelées hémoprotéines. Ces hémoprotéines peuvent être des protéines de transport ou de stockage de l'oxygène (hémoglobine, myoglobine) ou des enzymes dont la fonctionnalité requiert un hème (cytochrome P450) (**Figure 23**)

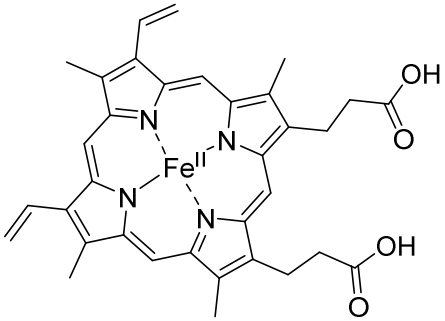


Figure 23 : Structure d'un hème complexant le fer.

Les hèmes peuvent être importés directement par le système Phu (*Pseudomonas Heme Uptake*) cependant différents facteurs de virulences sont excrétés par *P. aeruginosa* pour libérer les hèmes des cellules et en particulier des érythrocytes. Le transporteur TonB-dépendant PhuR de la membrane externe, permet l'import de l'hème dans le périplasme.[70] L'hème est chaperonné par la protéine PhuT pour être dirigé vers le transporteur ABC de la membrane interne, PhuUVW.[71] L'hydrolyse d'ATP permet le transfert de l'hème dans le cytoplasme où l'hème est pris en charge par la protéine PhuS pour être oxydé par le système HemO ce qui conduit à la libération du fer.[72]

Les hèmes peuvent également être importés dans la bactérie par des hémophores *via* le système Has (*Heme Acquisition System*). Chez *P. aeruginosa,* l'hémophore est la protéine HasA qui est sécrétée par une ATP-ase (HasD-HasE). HasA prend en charge l'hème dans le milieu extracellulaire où il entre en compétition avec les hémoprotéines de l'hôte. Le complexe HasA-hème est reconnu par le transporteur de la membrane externe HasR, mais seul l'hème est transporté dans le périplasme. Ce transporteur est couplé à la force proton motrice par le complexe HasB-ExbB-ExbD, un système analogue à la machinerie TonB.[73] Dans le périplasme, l'hème est transporté vers le cytoplasme par le système Phu décrit précédemment. [74] (**Figure 24**)

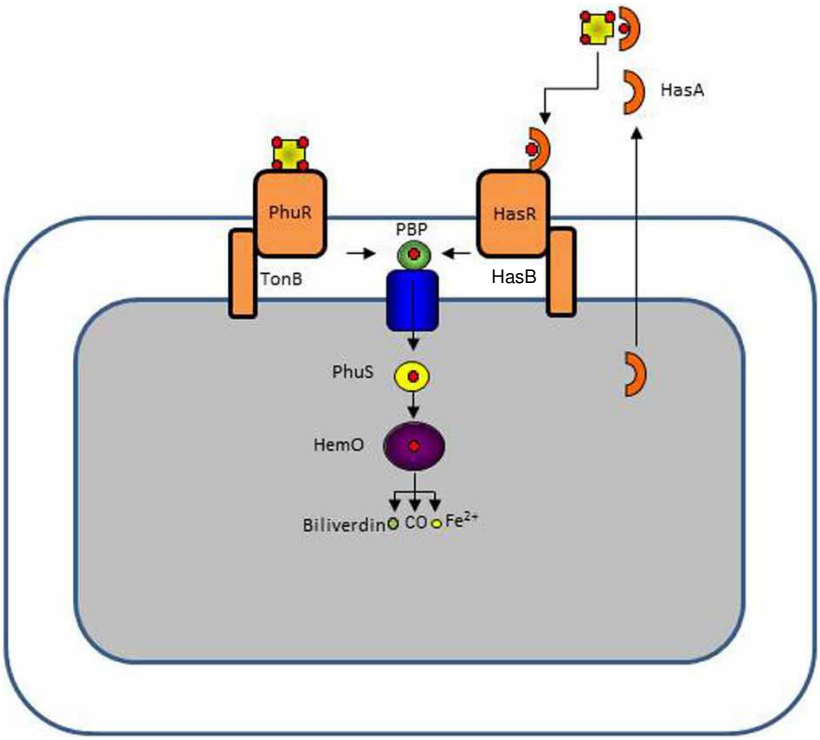


Figure 24 : Systèmes d'import du fer héminique. Adapté de Cornelis et al.[75]

L'acquisition du fer ferreux et du fer héminique, loin d'être anecdotiques sont dans un grand nombre de conditions de culture largement supplantées par les mécanismes d'assimilation du fer dépendant des sidérophores.

D. ACQUISITION DU FER FERRIQUE SIDEROPHORE-DEPENDANT

Les sidérophores sont métabolites secondaires de faible poids moléculaire excrétés dans le milieu extracellulaire par les bactéries et présentant une forte affinité pour le fer(III). Ces molécules sont pourvues de différentes fonctions chélatrices, comme les catéchols, les hydroxamates ou encore les hydroxyacides. Les sidérophores forment des complexes octaédriques hexacoordinés avec le Fe(III) avec différentes stœchiométries en fonction du nombre de fonctions chélatrices portées par le sidérophore. (**Figure 25**)

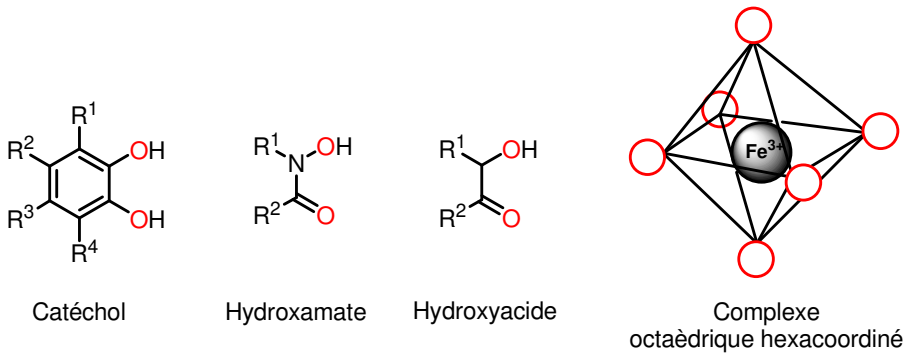


Figure 25: Structure des fonctions chélatrices des sidérophores et représentation d'un complexe octaédrique hexacoordiné avec le fer. Les hétéroatomes impliqués dans la chélation sont colorés en rouge.

Les bactéries, mais aussi certains champignons, et certains végétaux sont capables de synthétiser des sidérophores. Aujourd'hui plus de 500 sidérophores de structures différentes ont été recensés,[76] au nombre de ceux-ci seul un nombre restreint sont excrétés et/ou utilisables par *P. aeruginosa*. Nous réduirons donc notre propos au seuls sidérophores produits par cette bactérie (endogènes) et à certains sidérophores exogènes.

1. Les sidérophores endogènes de Pseudomonas aeruginosa

a) La pyoverdine

Les pyoverdines (PVD) sont des sidérophores synthétisés par les *Pseudomonas* fluorescents dont *P. aeruginosa* fait partie. Les mécanismes d'assimilation du fer utilisant ces molécules constitue l'un des sujets phares du laboratoire. Les PVDs comptent parmi les sidérophores aux structures les plus complexes et aux poids moléculaires les plus élevés (jusqu'à 1900 Da). Ces composés donnent aux cultures de *P. aeruginosa* cette coloration verte caractéristique. La structure des PVD se divise en trois parties :

-un chromophore, constitué d'un noyau dihydroquinoline. Ce chromophore est à l'origine de la fluorescence de ces molécules lorsqu'elles sont excitées dans l'UV. Le chromophore est aussi porteur d'une fonction catéchol impliquée dans la chélation du Fe(III). Cette chélation s'accompagne de l'extinction de la fluorescence émise par le chromophore et l'apparition d'une coloration sombre caractéristique d'un complexe de transfert de charge.

-un oligopeptide de 6 à 14 acides aminés. La chaine d'acide aminé est de séquence variable en fonction des souches de *Pseudomonas* qui la produise. La particularité de l'oligopeptide est qu'il contient des acides aminés non protéinogènes dont deux sont porteurs

de fonctions hydroxamates. Ces deux fonctions bidentates viennent compléter la sphère de coordination autour du Fe(III). L'oligopeptide est toujours lié en C1 du chromophore et est en en grande partie responsable de la reconnaissance spécifique de ce type de sidérophore par les systèmes de transport dédiés.

-une chaîne latérale liée en C3 du chromophore. Cette chaine est généralement un diacide organique (ou l'amide correspondant). L'utilité de cette chaîne dans le processus de transport n'est pas connue.

Il existe plus d'une centaine de pyoverdines qui diffèrent par la séquence de leurs chaines latérales et leurs chaines oligopeptidiques (**Figure 26**). Les pyoverdines ont été regroupées en trois familles nommées : PvdI, PvdII et PvdIII.[77] Chacune de ces familles de pyoverdine est reconnue par un transporteur de membrane spécifique.[78]

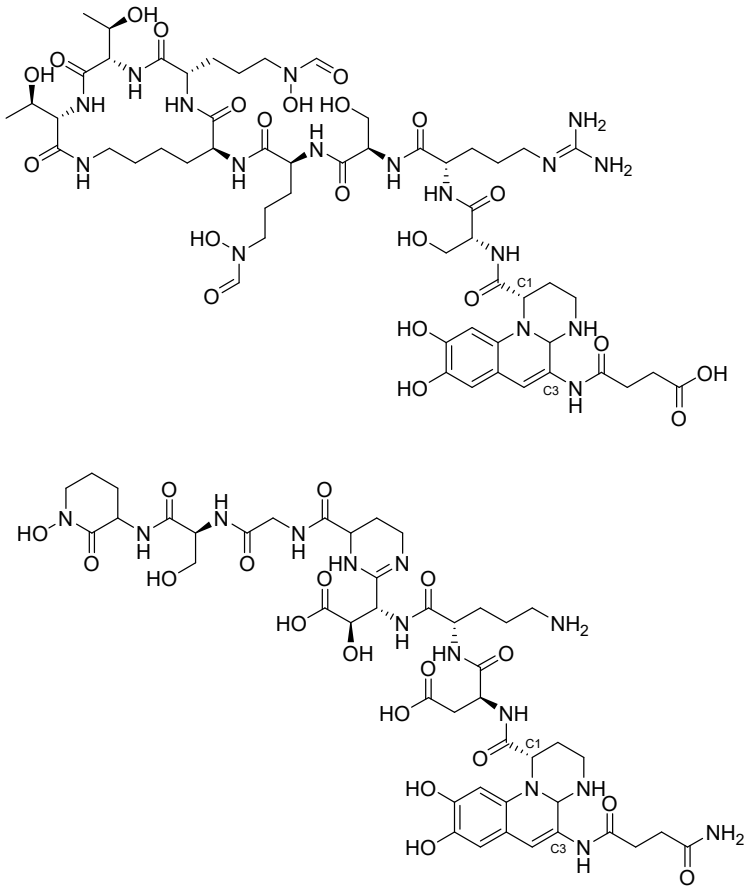


Figure 26 : Structures de deux pyoverdines.

La biosynthèse des pyoverdines démarre dans le cytoplasme puis continue dans le périplasme, avant d'être excrété dans le milieu extracellulaire par la pompe PvdRT-OpmQ.[79] La

pyoverdine chélate le fer dans le milieu extracellulaire grâce à la fonction catéchol du chromophore ainsi que deux fonctions hydroxamate portés par les acides aminés de la chaine peptidique. Le complexe entre le fer et le sidérophore est de stœchiométrie 1 :1 avec une constante d'affinité de 10^{31} M^{-1}.[80] Le ferri-sidérophore est transporté dans le périplasme par les transporteurs de la membrane externe FpvA (le transporteur principal) ou FpvB (transporteur secondaire). Ces deux transporteurs sont activés par la force proton motrice de la membrane interne, *via* la machinerie protéique TonB. Le fer est ensuite libéré du sidérophore dans le périplasme par un processus de réduction du Fe(III) en Fe(II) sans dégradation du sidérophore.[81] La pyoverdine est ainsi recyclée par la pompe PvdRT-OpmQ pour être reexcrétée dans le milieu extracellulaire et participer à un nouveau cycle. [82] (**Figure 27**)

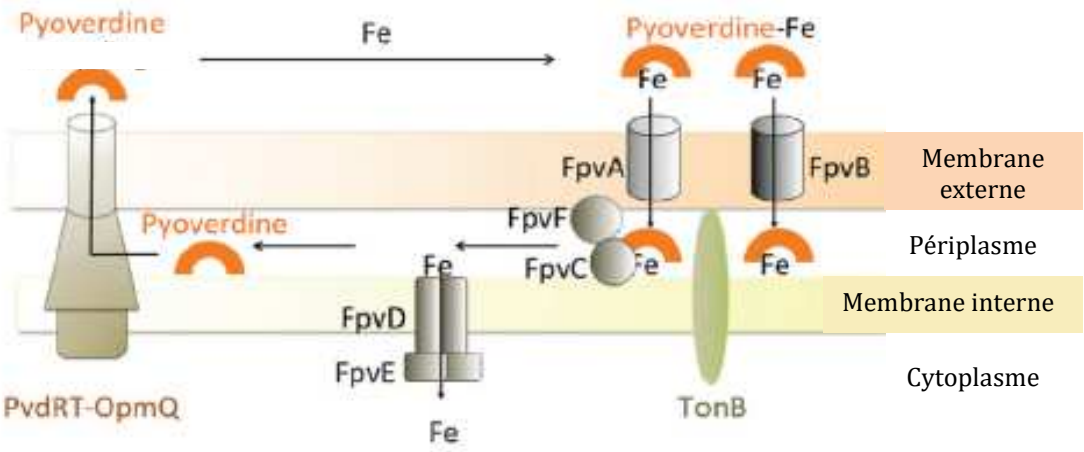


Figure 27 : Acquisition du fer par la voie pyoverdine tirée de Mislin et Schalk.[83]

b) La pyochéline

La pyochéline **23** est le second sidérophore de *P. aeruginosa*. Il lie le fer(III) avec une affinité plus faible (pFe(III) = 16) que la pyoverdine mais présente une affinité élevée pour les métaux biologiques divalents. [84] Ces propriétés l'ont parfois conduite à être qualifiée de secondaire au regard des propriétés de la pyoverdine dans des cultures bactériennes planctoniques. Il est aujourd'hui admis que ce sidérophore participe de façon prépondérante à la virulence de la bactérie et son système d'assimilation est fortement exprimé dans les modèles d'infections eucaryotes[85]. Les propriétés physico-chimiques de la pyochéline ont

permis de l'extraire aisément des milieux de cultures et la structure de la pyochéline a été déterminée par Cox *et al* en 1981.[86] La pyochéline est composée d'un cycle phénol, d'une thiazoline et d'une thiazolidine et comporte trois centres asymétriques en C4' (*R*), C2" et C4"(*R*). Le carbone C2" est un thio-aminal dont la configuration peut être inversée rapidement par une séquence ouverture-cyclisation du cycle thiazoline. Ce carbone est donc retrouvé sous les deux configurations *R* et *S* dans le ligand libre mais la présence d'un métal semble stabiliser la configuration *R*. Cet effet matrice permet la réorganisation du ligand autour du métal en faisant participer la fonction carboxylate à la sphère de coordination du Fe(III). (**Figure 28**)

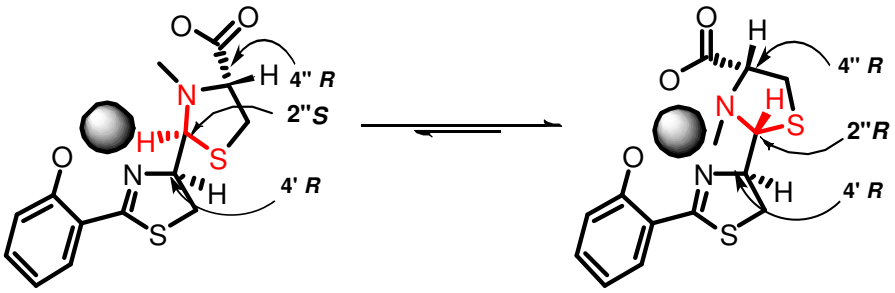


Figure 28 : Structure de la pyochéline

La biosynthèse de la pyochéline a lieu dans le cytoplasme et est catalysée par les protéines PchA à PchI. Ces enzymes produisent le sidérophore à partir d'une molécule d'acide salicylique ainsi que deux molécules de cystéine.[87] Le processus d'excrétion de la pyochéline dans le milieu extracellulaire n'est pas connu à ce jour. La stœchiométrie du complexe de la pyochéline avec le fer(III) est 2 :1 où une pyochéline est tétradentate grâce aux deux azotes des cycles thiazoline et thiazolidine, ainsi qu'aux deux oxygènes des fonctions hydroxyle et acide carboxylique. La seconde pyochéline n'utilise que deux hétéroatomes pour lier le fer : l'oxygène du phénol et l'azote de la thiazoline. (**Figure 29**) [88]

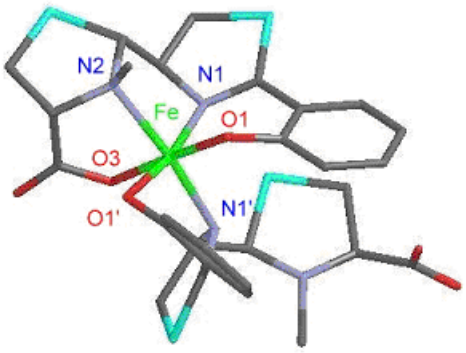


Figure 29 : Structure modélisée du complexe pyochéline-Fe(III) de stœchiométrie 2 :1. Tirée de Tseng et al.[89]

Après sa formation dans le milieu extracellulaire le complexe pyochéline-fer(III) est transporté dans le périplasme par le transporteur de la membrane externe FptA. La structure tridimensionnelle de ce transporteur a été résolue dans le laboratoire.[90] Ce transporteur possède les déterminants structuraux communs à tous les transporteurs de sidérophores : un pore transmembranaire défini par un tonneau β à 22 brins antiparallèles et un bouchon qui vient occulter la lumière du pore. La structure obtenue était un complexe ternaire FptA-pyochéline-Fe(III) et ces données structurales ont permis de faire une étude précise des relations structures-activités liant le sidérophore à son transporteur spécifique (**Figure 30**).

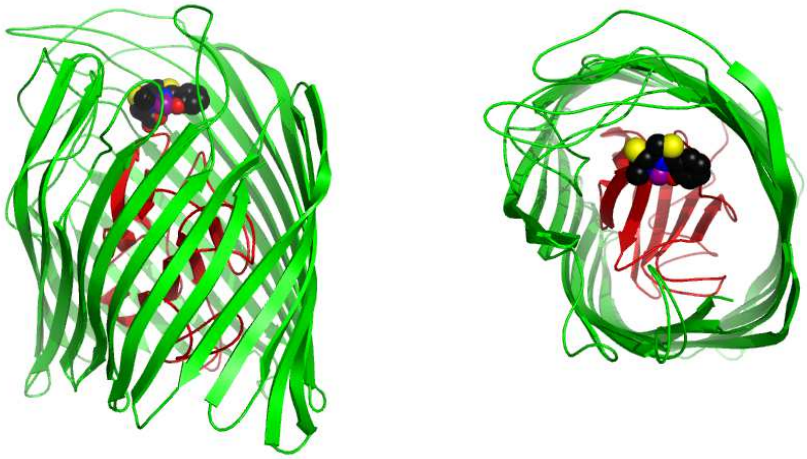


Figure 30 : vues en ruban de la structure tridimensionnelle du récepteur FptA de la pyochéline. Le tonneau β est en vert, le bouchon en rouge et la ferripyochéline est colorée suivant la nomenclature standard.

Cette structure a permis de montrer que seule une pyochéline liée au fer(III) est nécessaire pour la reconnaissance et le transport du sidérophore ferrique par le transporteur de membrane externe.[90] La configuration du carbone C2" et plus encore celle du C4" est primordiale pour la reconnaissance du ferri-sidérophore par le transporteur. L'énergie nécessaire à ce transport est apportée par la machinerie TonB, qui est couplée à la force proton motrice de la membrane interne. Dans le périplasme le ferri-sidérophore est transporté vers le cytoplasme par la perméase FptX. (**Figure 31**).

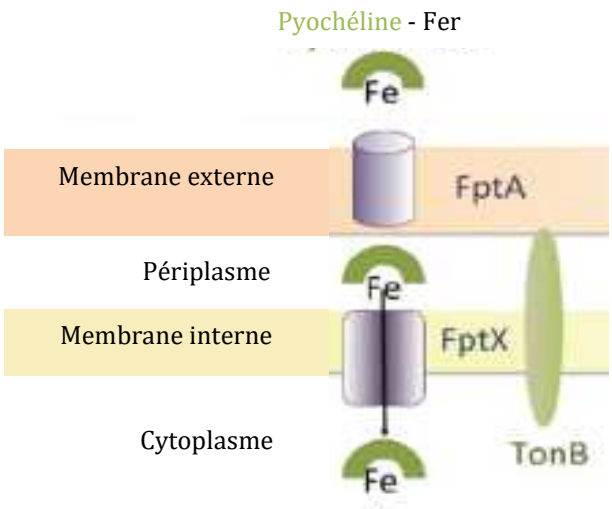


Figure 31 : Transport du fer pyochéline-dépendant chez *P. aeruginosa*. Tirée de Mislin et Schalk (2014).[83]

Le mécanisme de dissociation entre le fer et la pyochéline, ainsi que le destin du sidérophore libéré (dégradation ou recyclage) restent à déterminer.

En parallèle de l'utilisation de ses deux sidérophores endogènes, *P. aeruginosa* est capable d'utiliser les sidérophores produits par d'autres bactéries, si ces composés sont présents dans le milieu extracellulaire.

2. *Les sidérophores exogènes : le cas de l'entérobactine et du ferrichrome*

En plus de ses sidérophores spécifiques, *P. aeruginosa* peut acquérir du fer, en « piratant » les sidérophores d'autres organismes. *P. aeruginosa* est capable d'utiliser des sidérophores d'espèces bactériennes proches, comme la cépabactine produite par le genre *Burkholderia* [91], mais aussi d'espèces bien plus éloignées, par exemple le ferrichrome ou la ferrioxamine produites par des champignons. *P. aeruginosa* est aussi en mesure d'utiliser le citrate, la mycobactine (sidérophore des *Mycobacteria*, responsables de la tuberculose), la rhizobactine, le shizokinen, l'aérobactine, la vibriobactine (sidérophore de *Vibrio cholerae*, responsable du choléra), le coprogène, la desferrichrysine, la desferricrocine, etc. Cette liste n'est probablement plus exhaustive à l'heure de rédiger ce manuscrit. Cette capacité à utiliser ces sidérophores exogènes est le

résultat de l'expression des systèmes de transport spécifiques dont les gènes codants sont présents dans le génome de notre bactérie modèle. Cette capacité au « piratage » est un avantage adaptatif aux diverses conditions de croissance que peut rencontrer une bactérie dans l'environnement ou au cours d'un processus infectieux : il permet de prendre l'ascendant sur les autres espèces bactériennes en lutte pour une même ressource.[92] Dans la suite de ce manuscrit, nous décrirons plus en détail le transport de l'entérobactine et du ferrichrome chez *P. aeruginosa.*

a) Entérobactine

L'entérobactine **24** est principalement synthétisée par des bactéries à Gram-négatif, et notamment par *Escherichia coli* dont il est sidérophore principal. Ce sidérophore comporte trois fonctions catéchols liées par des liaisons amide à une trilactone cyclique résultant de la condensation de trois sérines. (**Figure 32**) Les trois catéchols permettent de former un complexe octaédrique avec le fer(III) d'une stœchiométrie 1 :1. Ce complexe extrêmement est stable et l'entérobactine à une affinité pour le fer(III) d'environ 10^{42} M^{-1}.[93]

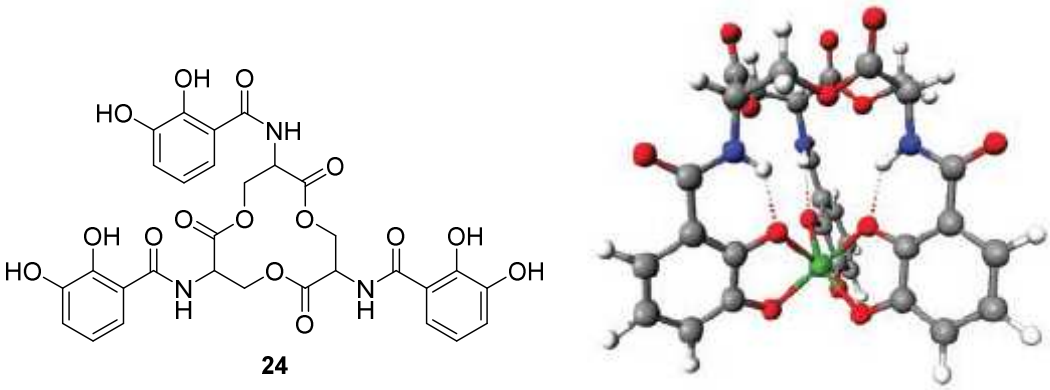


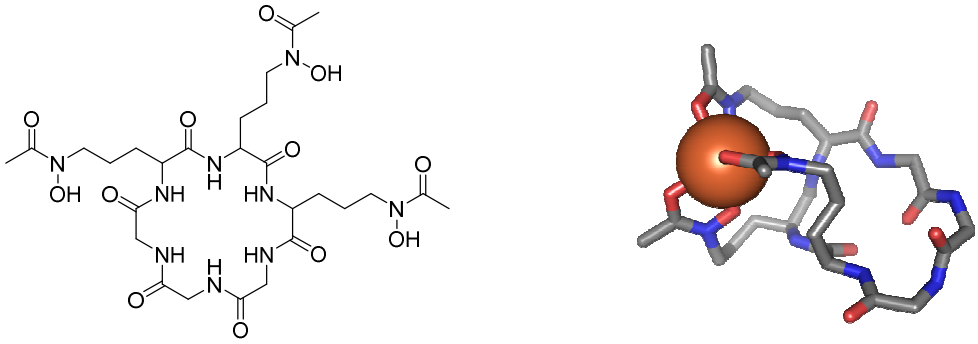
Figure 32 : Structure de l'entérobactine **24** (à gauche) et structure d'un complexe entérobactine-V(IV) (à droite).

Si le mode de transport de l'entérobactine est désormais bien décrit chez *E. coli*. Le mécanisme impliqué dans le transport de ce sidérophore chez *P. aeruginosa* reste pour l'heure très mal connu. Le transport de l'entérobactine **24** au travers de la membrane externe chez *P. aeruginosa* est dut aux deux transporteurs PfeA et PirA.[94,95] Lorsque ces deux transporteurs sont mutés, l'assimilation de l'entérobactine ferrique est inhibée. Le mécanisme de transport au travers de la membrane interne n'a pas encore été identifié. Chez *E. coli,* le transporteur de la membrane externe est FepA et la suite de ce transport est effectué grâce à FepB, protéine

périplasmique liant l'entérobactine et FepCDG, un transporteur de type ABC. [74] Des gènes homologues a *fepBCDG* ont été identifié chez *P. aeruginosa.*[96] Ces résultats permettaient de supposer que chez les deux microorganismes l'entérobactine était transportée jusque dans le cytoplasme par des mécanismes très similaires. Nous verrons, dans la suite de ce manuscrit que ce genre d'hypothèse peut nous mener à des résultats étonnants.

b) Ferrichrome

Le ferrichrome **25** est un hexapeptide cyclique comportant trois fonctions hydroxamates, synthétisé par exemple par des champignons de la famille des *Aspergillus*. L'affinité de ce sidérophore pour le fer(III) est de l'ordre de 10^{-29} M^{-1}. Le sidérophore complexe l'ion métallique avec une stoechiométrie 1 :1 (**Figure 33**).[97]



25

Figure 33 : Structure du ferrichrome **25** (à gauche) et du complexe ferrichrome (à droite).

P. aeruginosa exprime deux transporteurs de la membrane externe, FiuA et FoxA, permettant le transport du ferrichrome. Ces transporteurs sont couplés à la machinerie TonB qui fournit l'énergie nécessaire au transport. La perméase FiuB permet le transport du ferrichrome dans le cytoplasme. Le fer(III) est ensuite dissocié du sidérophore par un mécanisme de réduction du métal et le ferrichrome est acétylé par FiuC pour être recyclé.[98] (**Figure 34**)

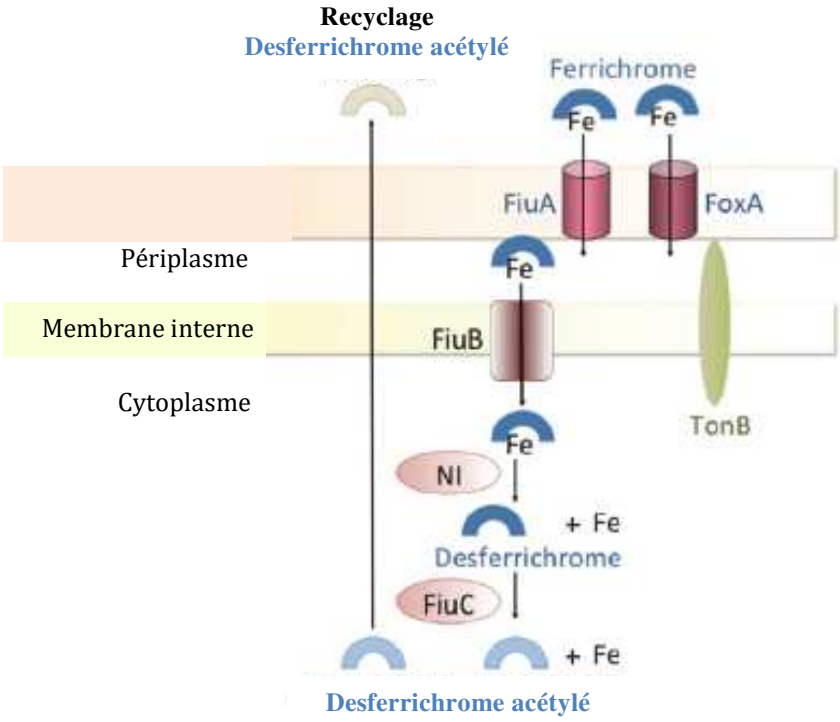


Figure 34 : Voie du transport du fer ferrichrome-dependant chez *P. aeruginosa*. Tiré de Mislin et Schalk (2014).[83]

Comme nous l'avons mentionné, l'enveloppe des bactéries Gram-négatives constitue une barrière difficile à franchir pour de nombreux antibiotiques. Les systèmes transmembranaires de transport du fer sont des « portes » dans cette enveloppe et les sidérophores sont les « clés » permettant de les emprunter. Dans ce contexte, la conjugaison d'un antibiotique sur le sidérophore peut permettre d'utiliser l'efficacité et la spécificité des systèmes de transport de sidérophores pour promouvoir l'accumulation de l'antibiotique dans la bactérie. Par analogie, cette stratégie est souvent comparée dans la littérature au Cheval de bois, conçu par Ulysse pour traverser les murailles de Troie et conquérir la ville en résistance depuis des décennies : le cheval de Troie.

III. Les stratégies de type cheval de Troie basées sur les sidérophores

A. Principe general

Les sidérophores peuvent jouer le rôle d'un vecteur, reconnu spécifiquement et permettant à l'antibiotique vectorisé de franchir plus aisément les membranes bactériennes

pour atteindre soit le périplasme, soit le cytoplasme, en fonction de la destination finale du sidérophore dans sa voie de transport. Le vecteur sidérophore et l'antibiotique sont reliés par un bras espaceur de longueur et de propriétés chimiques variables. Ce bras permet de limiter les contraintes stériques amenées par le couplage de l'antibiotique avec une entité qui pourrait diminuer l'affinité globale du conjugué pour la cible biologique. Dans le cas idéal ce bras doit être stable dans le milieu extracellulaire et hydrolysable à l'intérieur de la bactérie soit par des conditions physiologiques particulières, soit par l'action d'enzymes autochtones (**Figure 35**).

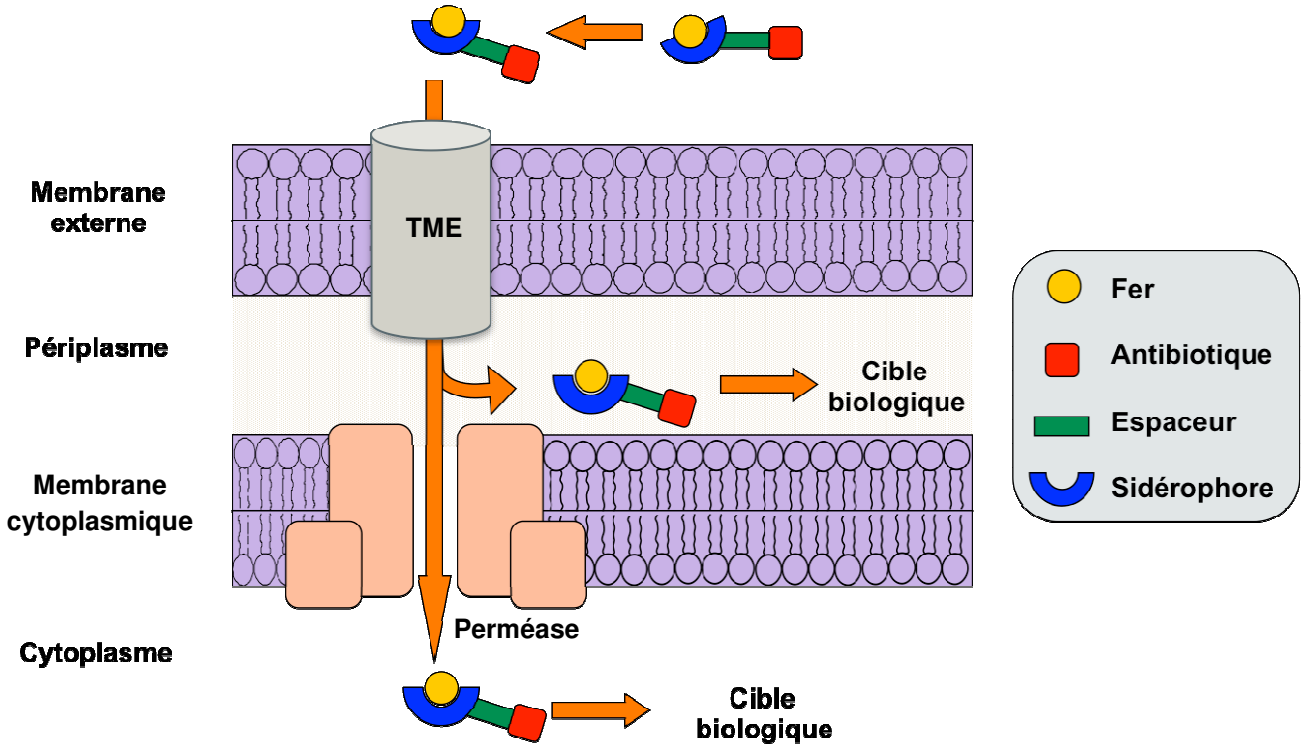


Figure 35 : Schéma général de la stratégie du cheval de Troie utilisant les sidérophores comme vecteurs. TME : transporteur de la membrane externe.

Cette stratégie permet de contrecarrer les phénomènes de résistances visant à réduire la concentration intracellulaire de l'antibiotique par diminution de l'expression des systèmes d'import. Dans le cas spécifique de *P. aeruginosa* cette approche permet de contourner la faible perméabilité membranaire naturelle de ce microorganisme à de nombreuses familles d'antibiotiques. Dans ce contexte, cette stratégie peut aussi permettre d'étendre le spectre d'activité de certains antibiotiques qui sont efficaces sur les bactéries Gram-positives, mais inefficace sur les Gram-négatifs à cause de la faible perméabilité membranaire de ces bactéries.[99]

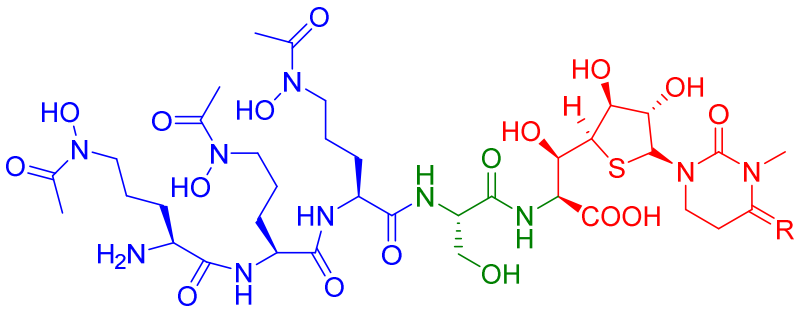
Cette stratégie n'est pas née spontanément dans l'esprit des quelques groupes qui travaillent sur cette approche à travers le Monde : elle résulte d'un mimétisme avec une famille de molécules naturelles appelées sidéromycines.

B. LES SIDEROMYCINES : DES CHEVAUX DE TROIE NATURELS

Les sidéromycines sont des composés naturels sécrétés par certaines bactéries. Ces biomolécules sont composées d'une partie antibiotique liée de façon covalente à un analogue de sidérophore par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Les sidéromycines ont été découvertes dans le cadre de la recherche de nouveaux antibiotiques issus de sources naturelles. [100] Ces composés sont capables d'emprunter les systèmes d'acquisition du fer sidérophore-dépendants pour atteindre la cible biologique de l'antibiotique vectorisé. Plusieurs familles de sidéromycines ont été décrites à ce jour, notamment les albomycines,[101] les ferrimycines,[102] les danomycines,[103] les salmycines,[104] et certaines microcines[105]. A titre d'exemples représentatifs de cette famille de métabolites nous présentons dans la suite du manuscrit les albomycines et la microcine E492. L'existence et l'efficacité des sidéromycines est une nouvelle preuve de la guerre « fratricide » que se livrent les microorganismes pour une niche écologique et la conquête des nutriments essentiels à leur prolifération.

1. Albomycine

Les albomycines **26** à **28** sont produites par certaines bactéries du genre *Streptomyces*, notamment le genre *griseus* d'où elles furent purifiées pour la première fois en 1947 et qui explique le nom initial de ces molécules : les griséines.[106] Les albomycines sont des sidéromycines composées d'un analogue du ferrichrome pour leur partie sidérophore, d'une sérine comme bras espaceur et d'une partie antibiotique constituée d'une thioribosyl-pyrimidine (**Figure 36**).[100,101]



26 : δ_1 : R = $NCONH_2$
27 : δ_2 : R = NH
28 : ε : R = O

Figure 36 : Structure des albomycines. Le sidérophore est représenté en bleu, le bras espaceur en vert, et l'antibiotique en rouge.

L'antibiotique thioribosyl-pyrimidine inhibe la seryl-tARN synthétase, et par conséquent la synthèse protéique. Cette sidéromycine emprunte les voies d'acquisition dépendante du ferrichrome.[107,108] Il a été montré que le lien entre l'antibiotique et le sidérophore est clivé chez *E. coli* par la peptidase N. Dans le cas où le gène *pepN*, codant pour cette peptidase, est muté, l'albomycine transporte le fer au sein de la bactérie mais perd son activité biologique.[109,110] Les albomycines ont une activité antibiotique aussi bien sur des bactéries Gram-négatives (*Klebsellia pneumonia, Yersinia pestis, Escherichia coli*…) que sur les bactéries Gram-positives (*Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus,*…).[111]

2. *Microcine E492*

Les microcines sont une large famille des peptides antibactériens. La microcine E492 **29** a été isolée à partir de culture de *Klebsellia pneumonia* RYC492.[105] Cette sidéromycine a la particularité d'être composée d'un peptide antibactérien de 84 acides aminés (7 886 Da).[112] Sa partie vecteur est composée d'un analogue linéarisé de l'entérobactine **24** qui est lié au peptide en C-terminal grâce à un bras glycosidique, le ß-D-glucose.[113] (**Figure 37**)

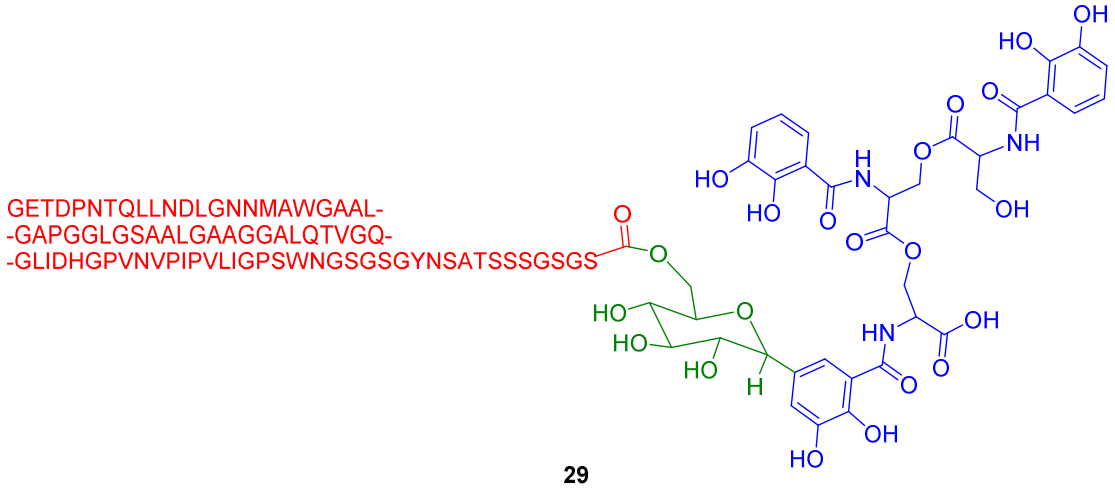


Figure 37 : Structure de la microcine E492. Le sidérophore est représenté en bleu, le bras espaceur en vert, et l'antibiotique en rouge.

Chez *E. coli*, la microcine E492 emprunte les transporteurs de la membrane externe FepA, Fiu et Cir, qui sont responsables du transport de l'entérobactine et de ses produits d'hydrolyse.[114] Ce peptide forme des pores dans la membrane bactérienne et entraine sa dépolarisation.[115] L'activité antibiotique du peptide seul est de 0,3 µM chez *E. coli* et certaines souches de *Salmonella*, cette activité est augmentée par un facteur 10 lorsque le peptide est vectorisé par le sidérophore catécholé.[113]

Ces exemples choisis de sidéromycines montrent que :

- Cette stratégie fonctionne !
- Des cibles périplasmiques ou cytoplasmiques peuvent-être atteintes.
- Des analogues simplifiés des sidérophores sont utilisables comme vecteurs.
- La taille de l'antibiotique vectorisé peut être conséquente.
- La nature clivable de l'espaceur est un plus pour une activité optimale.

Sur la base de ces constats et de ces exemples tirés du Vivant, les chimistes tentent depuis près de trois décennies de concevoir et de synthétiser des sidéromycines artificielles.

C. Les sideromycines synthetiques ou hemi-synthetique : etat de l'art

De nombreuses combinaisons de conjugués entre des analogues de sidérophores et différentes familles d'antibiotiques ont été synthétisées et testées afin de mettre au point des sidéromycines synthétiques efficaces. L'état de l'art qui suit n'a pas l'ambition d'être

exhaustif mais permet de présenter les grands axes qui ont été explorés et fonction notamment du sidérophore utilisé comme vecteur.

1. Sidéromycines fondées sur les sidérophores endogènes de P. aeruginosa

Des hémi-synthèses de conjugués de type cheval de Troie ont été effectué à partir de la pyoverdine extraite de milieux de culture de *P. aeruginosa*. En effet la synthèse totale de la pyoverdine n'a été effectuée pour la première fois que récemment.[116] Des conjugués entre la pyoverdine et des ß-lactames,[117,118] mais également des fluoroquinolones, ont été décrits.[119] Les conjugués **30** et **31** contenant une ampicilline liée à une amine primaire de la pyoverdine présentent respectivement des CMIs de 0,04 µg/mL et 0,67 µg/mL contre une souche de *Pseudomonas* résistante à l'ampicilline. Ce résultat prouve la validité de cette approche, néanmoins la nature souche-spécifique de la pyoverdine limite fortement le potentiel thérapeutique de ces conjugués. Les conjugués **32, 33** et **34** n'ont quant à eux pas montré d'activité antibiotique significative. Le conjugué **32** semble pénétrer dans la bactérie par le système de transport de fer pyoverdine-dépendant mais la gêne stérique induite par la présence du sidérophore pourrait expliquer une mauvaise interaction avec la transpeptidase cible. Dans le cas des conjugués de fluoroquinolones **33** et **34** l'absence d'activité peut être expliquée a posteriori par le fait que la pyoverdine a un destin purement périplasmique alors que la cible des fluoroquinolones est cytoplasmique. Ces données n'étaient évidemment pas disponibles lors de la mise au point de ces conjugués (**Figure 38**).

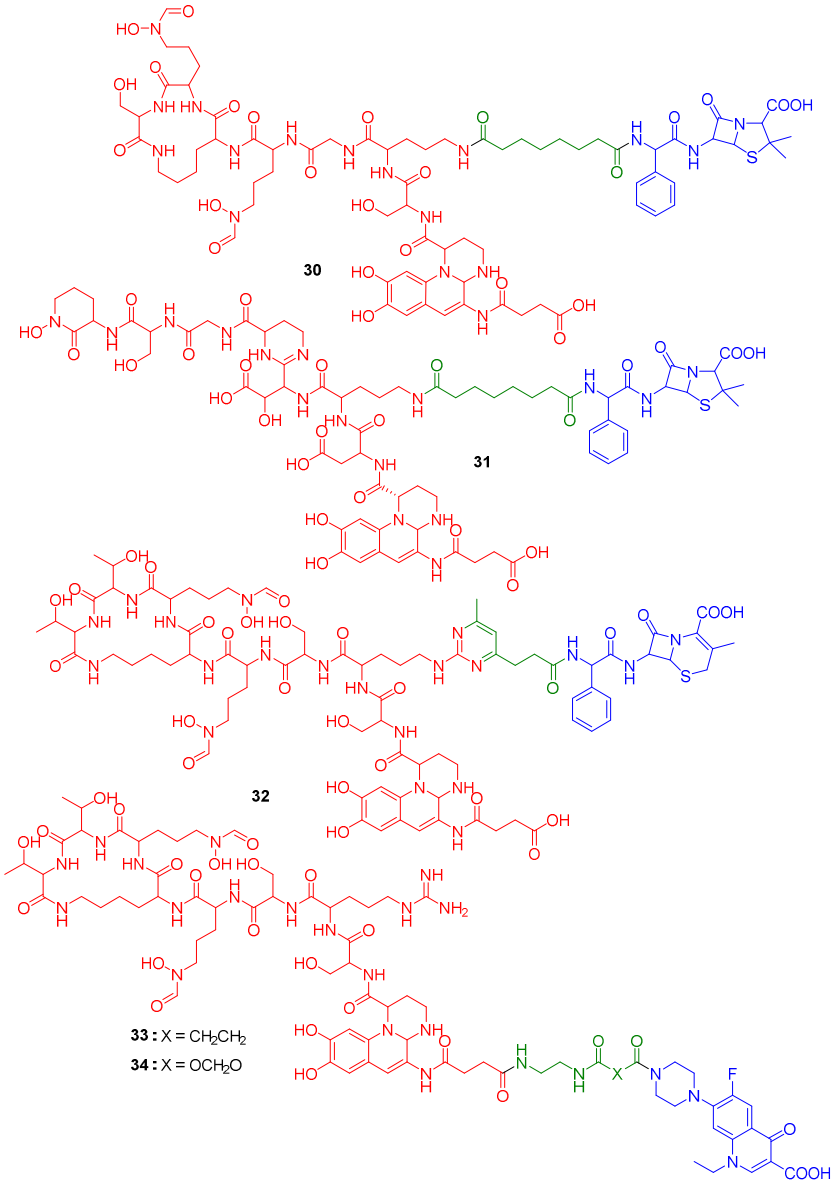


Figure 38 : Structures de conjugués de type cheval de Troie entre des β-lactames, ou des fluoroquinolones, et la pyoverdine.

Contrairement à la pyoverdine, dont le transport est souche-spécifique, la pyochéline est un sidérophore commun à toutes les souches de *P. aeruginosa* faisant de ce vecteur une base crédible pour la mise au point de conjugués de type cheval de Troie ciblant l'intégralité de la population de *P. aeruginosa*. Contrairement à la pyoverdine, la pyochéline peut être synthétisée par voie chimique et des vecteurs présentant une fonctionnalisation au niveau du cycle aromatique ont été développés. Ces vecteurs ont ensuite été conjugués avec la norfloxacine ou la gallidermine sans que les conjugués correspondants **35**, **36**, **37** et **38** ne présentent d'activité significative (**Figure 39**). [120–122]

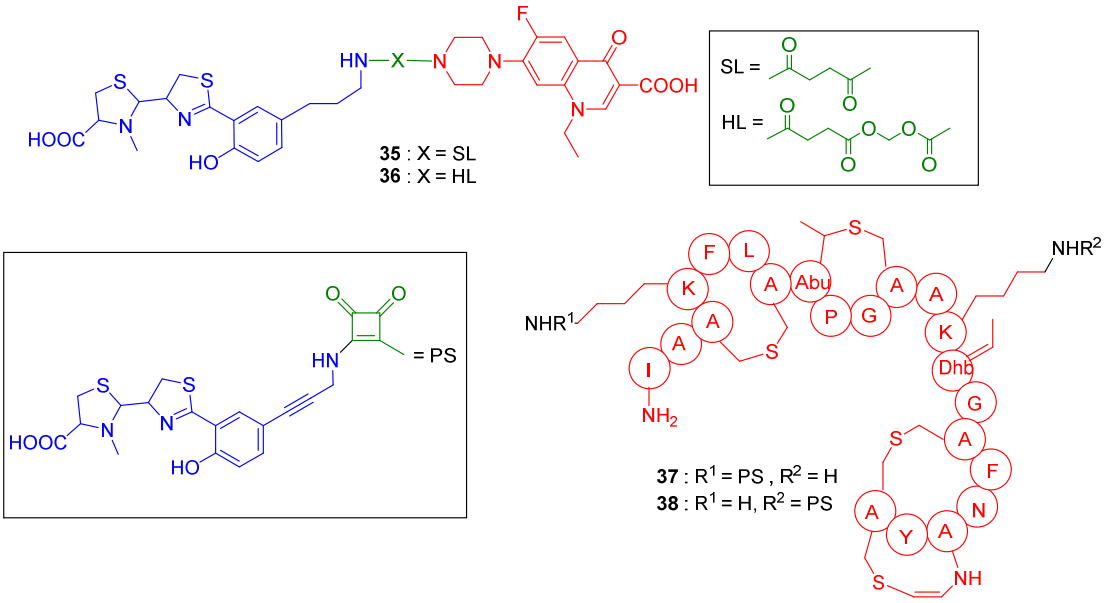


Figure 39 : Structures des conjugués **35**, **36**, **37** et **38** entre la pyochéline et des antibiotiques. Le sidérophore est représenté en bleu, le bras espaceur en vert et l'antibiotique en rouge.

La résolution a posteriori de la structure tridimensionnelle du transporteur de membrane externe FptA spécifique de la pyochéline montre que la fonctionnalisation de la pyochéline sur le cycle aromatique entraîne d'importants conflits stériques avec la protéine de transport. Face à ce résultat, un nouveau vecteur pyochéline, fonctionnalisé au niveau de l'azote N3" a été mis au point au laboratoire. Des conjugués **39** à **44** entre ce vecteur et des fluoroquinolones (norfloxacine, ofloxacine, ciprofloxacine) ont été synthétisés au laboratoire par le Dr. Sabrina Noël durant sa thèse (**Figure 40**).[121] Ces conjugués avaient été dotés de bras espaceurs soit stables en milieu physiologique (molécules **39** à **41**), soit hydrolysables *in vivo* (composés **42** à **44**). Malheureusement, les conjugués obtenus n'ont pas montré d'activité antibiotique supérieure à celle de la molécule active non vectorisée. Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer ce résultat : 1-l'hydrolyse du bras espaceur clivable dans le milieu extracellulaire par des hydrolases excrétées par la bactérie rendant inefficaces les conjugués **39** à **44.** 2- L'impossibilité de libérer les antibiotiques *in vivo* à partir des conjugués **39** à **41**, la fonction amine basique de la pipérazine des fluoroquinolones étant réputée importante pour l'activité. 3-La faible solubilité globale de tous ces conjugués en milieu biologique qui conduit à des précipitations importantes qui limitent la concentration des conjugués disponibles pour les bactéries lors de tests de CMI.

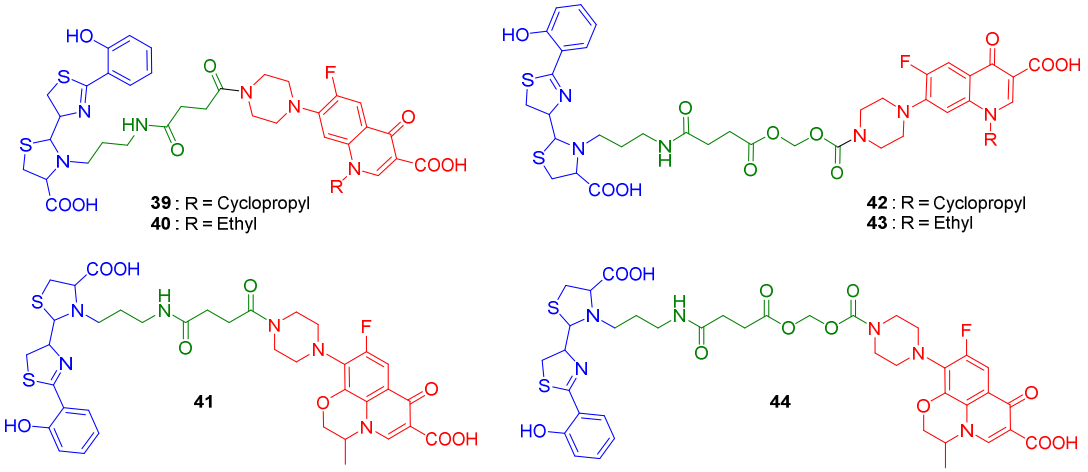


Figure 40 : Structures des conjugués pyochéline–fluoroquinolones **39** à **44**. Le sidérophore est représenté en bleu, le bras espaceur en vert et l'antibiotique en rouge.

Ces résultats ne remettent néanmoins pas en cause l'utilisation de la pyochéline comme vecteur. La modification de l'antibiotique ou du bras espaceur pourrait en effet permettre de pallier aux problèmes de solubilité rencontrés avec ces molécules. C'est tout l'esprit d'une des parties du projet décrit dans ce manuscrit.

Nous avons mentionné précédemment que *P. aeruginosa* est capable d'utiliser à son profit les sidérophores synthétisés par d'autres bactéries. Cet avantage pourrait ainsi devenir un talon d'Achille, car dans ce cas les sidérophores exogènes peuvent aussi être exploités en tant que vecteurs.

2. *Les sidéromycines contenant des hydroxamates*

Les premières sidéromycines synthétiques étaient basées sur la ferrioxamine et la ferricrocine, couplées avec des sulfonamides. Ces conjugués ne comprenant pas de bras espaceur ont montré peu d'activité antibiotique. [123] Brochu *et al.* ont ensuite proposé une sidéromycine synthétique **45** composée du N^5-acetyl-N^5-hydroxy-L-ornithine et de carbacéphalosporine. Ce conjugué, ne comportant pas de bras espaceur, a pourtant démontré une activité inhibitrice à partir de 32 µg/mL sur *E. coli.* [124] (**Figure 41**)

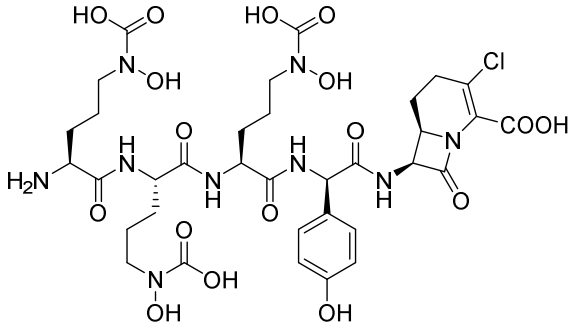


Figure 41: Conjugué **45** entre la N^5-acetyl-N^5-hydroxy-L-ornithine et la carbacéphalosporine.

La desferrioxyamine B, commercialisé sous le nom de Desferal pour ses propriétés chélatrices et notamment utilisée dans le traitement de l'hémochromatose, est un vecteur régulièrement utilisé dans la stratégie du cheval de Troie.[125–128] Le conjugué **46** entre ce sidérophore et une fluoroquinolone a montré une activité antibiotique sur les bactéries à Gram positif.[126] Le conjugué **47** est muni d'un bras espaceur potentiellement hydrolysable *in vivo* mais présente une activité plus faible que celle de l'antibiotique libre correspondant (**Figure 42**).[127]

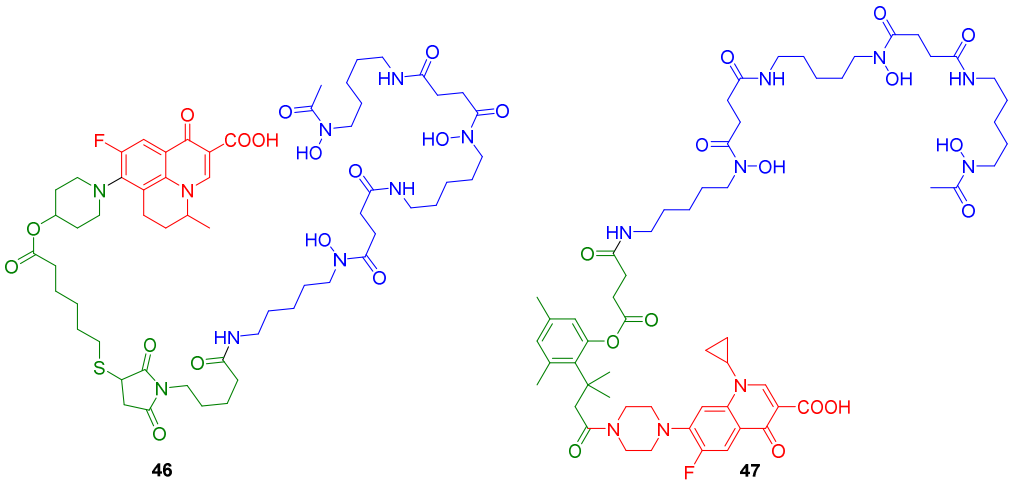


Figure 42 : Structure de conjugués desferrioxamine –fluoroquinolone **46** et **47**. Le sidérophore est représenté en bleu, le bras espaceur en vert et l'antibiotique en rouge.

3. *Les sidéromycines basées sur les catéchols*

L'entérobactine **24**, et plus généralement les sidérophores catécholés peuvent être utilisés par *P. aeruginosa* mais aussi un grand nombre d'autres espèces bactériennes

pathogènes. C'est donc tout naturellement que des analogues de cette famille de sidérophore ont été développés pour servir de vecteurs dans des stratégies de type cheval de Troie. Ainsi le groupe de Liz Nolan a développé un vecteur dérivé de l'entérobactine, à partir duquel ont été synthétisés des conjugués avec la vancomycine **48**, la ciprofloxacine **49**, l'amoxicilline **50** et l'ampicilline **51**.[129,130] (**Figure 43**) Parmi ces conjugués, ceux vectorisant les β-lactames ont montré une activité antibiotique plus intéressante. L'activité antibiotique des conjugués **49** et **50** est en effet 10 fois supérieure à celles des antibiotiques libres sur des souches pathogènes d'*E. coli.*[130]

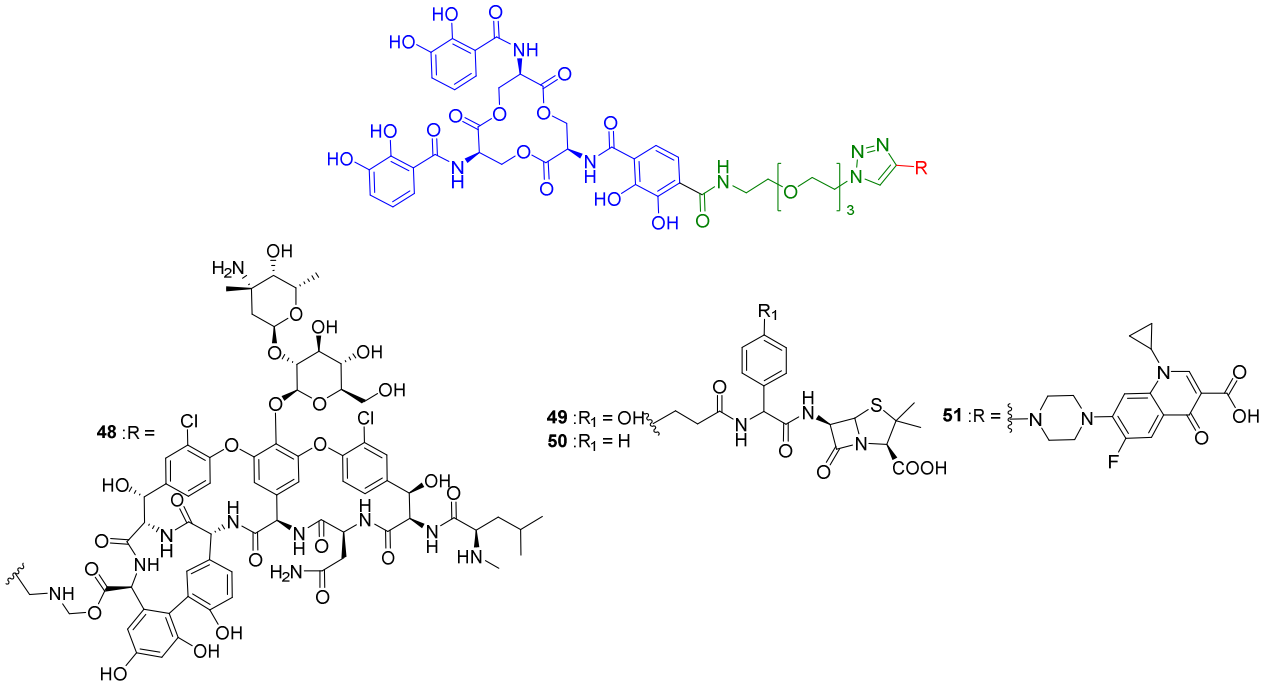
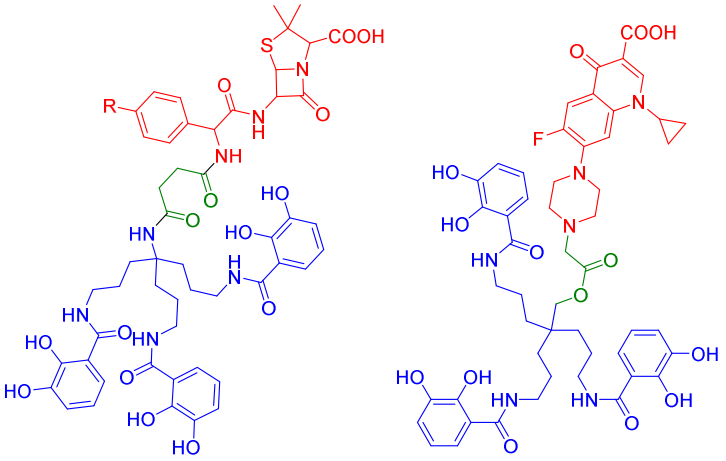


Figure 43 : Structures des conjugués entre un analogue de l'entérobactine et des β-lactames, la ciprofloxacine ou la vancomycine.

Des exemples de sidéromycines synthétiques utilisant des chélateurs tris-catécholés mimant l'entérobactine ont également été décrits. Nous avons arbitrairement choisi d'imager ce propos par les conjugués tris-catéchol-β-lactames **52** et **53** et tris-catéchol-ciprofloxacine **54**. (**Figure 44**)



52 : R = H
53 : R = OH

54

Figure 44 : Structures des conjugués tris-catéchol-β-lactame **52** et **53** et tris-catéchol-ciprofloxacine **54**.

Les conjugués **52** et **53** ont montré des activités antibiotiques améliorées nettement par rapport aux antibiotiques seuls, sur des souches d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* résistantes aux ß-lactames.[125,131] Au contraire le conjugué **54** muni du même vecteur mais doté d'une ciproflaxine a montré une activité diminuée par rapport à l'antibiotique seul sur *P. aeruginosa*.[132] L'activité modéré du conjugué **54** peut être liée à l'hydrolyse partielle du bras espaceur, à la faible solubilité du conjugué ou peut-être au mécanisme de transport qui pourrait être différent chez *E. coli* et *P. aeruginosa*. Ce dernier exemple montre bien qu'il ne semble pas y avoir de « recette miracle » pour faire aboutir favorablement et à coup sur ce type de vectorisation. Ainsi ces résultats très aléatoires et la méconnaissance encore très importante des mécanismes de transport du fer chez d'autres microorganismes que *E. coli* ont conduit souvent à décrire cette stratégie comme théorique, illusoire et inapplicable du point de vue thérapeutique. Néanmoins depuis quelques années, l'industrie pharmaceutique s'intéresse à cette approche, en particulier dans le cadre de la lutte contre des pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumani*.

4. Sidéromycines synthétiques développées par l'industrie

La frilosité rencontrée chez certains chercheurs académiques contraste avec l'enthousiasme actuel des industries pharmaceutiques pour la stratégie du cheval de Troie fondée sur des vecteurs sidérophores. Dans les cinq dernières années trois molécules utilisant cette stratégie ont été amenées jusqu'aux phases cliniques : le MC1 **55** de Pfizer, le BAL-

30072 **56** de Basilea Pharmaceutica et le S-649266, renommé Cefiderocol **57**, développé en commun par Shionogi et GSK (**Figure 45**).

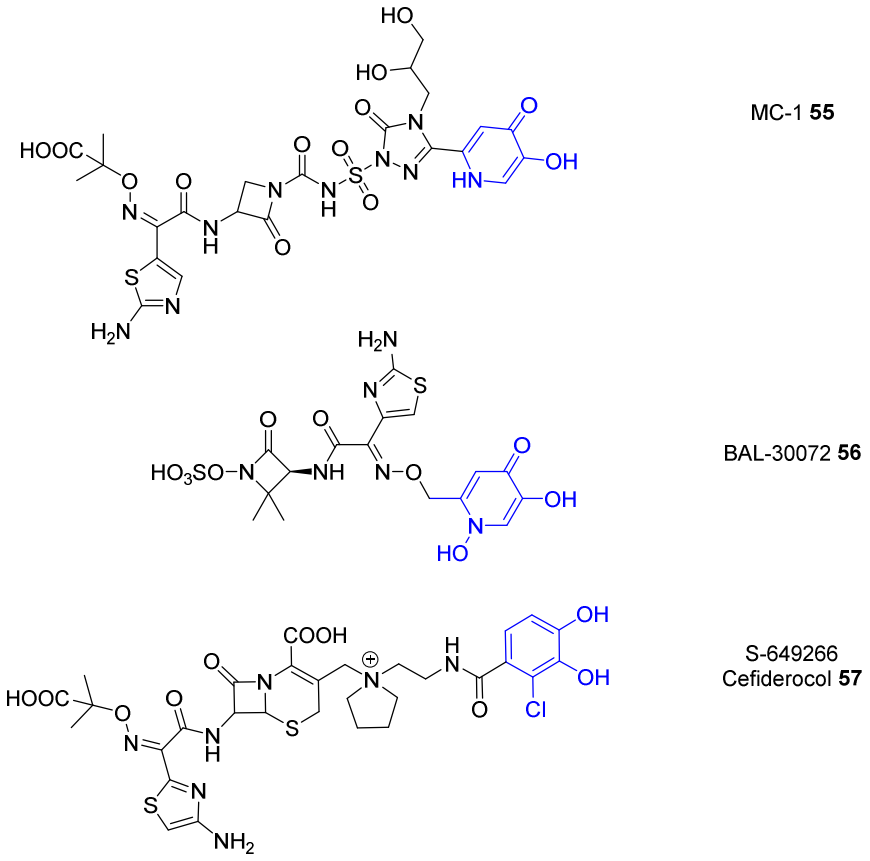


Figure 45 : Structures des conjugués sidérophore-antibiotique actuellement en développement dans l'industrie pharmaceutique. Le vecteur est coloré en bleu.

Les conjugués **55** et **56** utilisent comme vecteurs des dihydroxypyridones, isostères des catéchols pour vectoriser des antibiotiques de type monobactames. Ces conjugués ont montré une activité convaincante sur *P. aeruginosa* en condition de carence de fer.[133,134] Le conjugué **57**, est composé d'un vecteur monocatéchol lié à une céphalosporine, ce conjugué montre également une activité antibiotique contre les bactéries Gram-négatives et il a été démontré qu'il emprunte les systèmes d'import du fer sidérophore-dépendant pour entrer dans la bactérie. [135–137] Il convient de noter que dans ces trois chevaux de Troie, l'antibiotique et le vecteur sont liés par des fonctions non hydrolysables *in vivo*.

L'intérêt porté par l'industrie pharmaceutique à ce type de stratégie montre que cette technologie est désormais mature, du moins pour l'adressage d'antibiotique à cible

périplasmique, et exploitable dans le cadre d'approches thérapeutiques. Il revient désormais aux chercheurs académiques d'aller plus loin pour explorer les limites actuelles de cette stratégie et de proposer des solutions pour pérenniser l'utilisation des sidérophores comme vecteurs pour la délivrance efficace d'antibiotiques. Dans ce contexte trois axes sont particulièrement cruciaux :

- Atteindre le cytoplasme : en effet si à ce jour, les conjugués sidérophores β-lactames ont montré tout leur potentiel, il n'existe que de très rares exemples de conjugués vectorisant un antibiotique à cible cytoplasmique alors que ceux-ci représentent une part essentielle de l'arsenal actuel.
- Développer de nouveaux bras espaceurs clivables *in vivo* : Hormis les transpeptidases connues pour avoir une spécificité de reconnaissance large, la majorité des cibles biologiques sont peu tolérantes à l'encombrement stérique. La mise au point de bras espaceurs capables de libérer l'antibiotique à partir du conjugué, une fois ce dernier entré dans la bactérie est une nécessité.
- Développer rationnellement les vecteurs sidérophores. Les trois molécules **55**, **56** et **57** développées par l'industrie sont issues de criblages. Leurs capacités à être transportées par les voies d'acquisition du fer n'ont, pour certaines, été découvertes qu'en second lieu. La rationalisation de ce type de recherche passe par une démarche inverse où c'est l'étude et la compréhension préalable des mécanismes de transport du fer qui doit diriger la conception des molécules actives.

Le présent projet se veut une contribution à cet effort de recherche en explorant le potentiel de vecteurs catécholés et pyochélines pour l'adressage d'antibiotiques à visée majoritairement cytoplasmique.

VECTORISATION D'ANTIBIOTIQUES PAR DES SIDEROPHORES CATECHOLES

Le motif catéchol est l'un des plus communément retrouvé dans la structure des sidérophores bactériens. L'archétype de ce type de sidérophore est l'entérobactine **24** où trois motifs catéchols sont organisés autour d'un système trilactone cyclique. Différents sidérophores catécholés sont synthétisés par les bactéries. Nous citerons notamment la salmochéline **58**, la serratiochéline **59** et l'acinétobactine **60** qui sont des sidérophores excrétés respectivement par les *Salmonella*, par *Serratia marcescens* et par *Acinetobacter baumanii* (**Figure 46**).

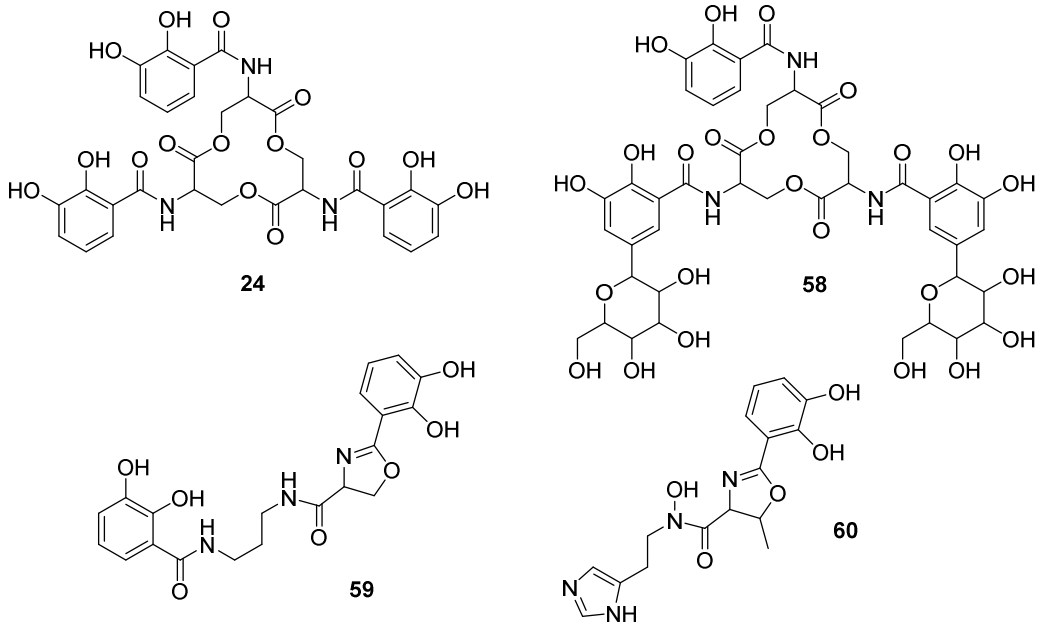


Figure 46 : Structures de l'entérobactine **24**, de la salmochéline **58**, de la serratiochéline **59** et de l'acinétobactine **60**, quatre exemples de sidérophores catécholés.

L'entérobactine **24** est un sidérophore excrété notamment par *Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium* mais qui est susceptible d'être utilisée comme sidérophore hétérologue par plusieurs autres pathogènes comme *Vibrio cholerae*.[138] Dans ce contexte *P. aeruginosa* est lui aussi capable d'utiliser ce sidérophore pour subvenir à ses besoins en fer lorsqu'il est présent dans le milieu de culture.[139] L'entérobactine **24**, ou des molécules permettant de mimer ce sidérophore, devraient donc être utilisables comme vecteurs pour adresser efficacement des antibiotiques à *P. aeruginosa* dans le cadre d'une stratégie de type Cheval de Troie. Si cette voie d'acquisition du fer est désormais très bien décrite chez *E. coli,* [93,140] la méconnaissance des subtilités de la voie de transport entérobactine-dépendante chez *P. aeruginosa* explique les résultats très aléatoires obtenus par certaines équipes concurrentes

avec ce type d'approche contre *P. aeruginosa*. Nous souhaitons ainsi nous appuyer sur l'interface chimie-biologie qui existe dans notre équipe pour tout à la fois accroître notre connaissance de ce système biologique et développer nos vecteurs catécholés et les conjugués antibiotiques correspondants, de manière plus rationnelle. Les composés chimiques synthétisés dans le cadre de ce projet pouvant eux-mêmes se révéler, comme nous le verrons, des outils moléculaires indispensables pour l'étude des systèmes de transport de fer dédiés.

Des analogues simplifiés de l'entérobactine ont déjà montrés des capacités à mimer efficacement le sidérophore naturel. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés aux sidérophores d'*Azotobacter vinelandii*, une bactérie proche des *Pseudomonas*. *A. vinelandii* synthétise un chromopeptide similaire à la pyoverdine, l'azotobactine, et trois sidérophores catécholés, la protochéline **61**, l'azotochéline **62** et l'aminochéline **63** (**Figure 47**).[141,142]

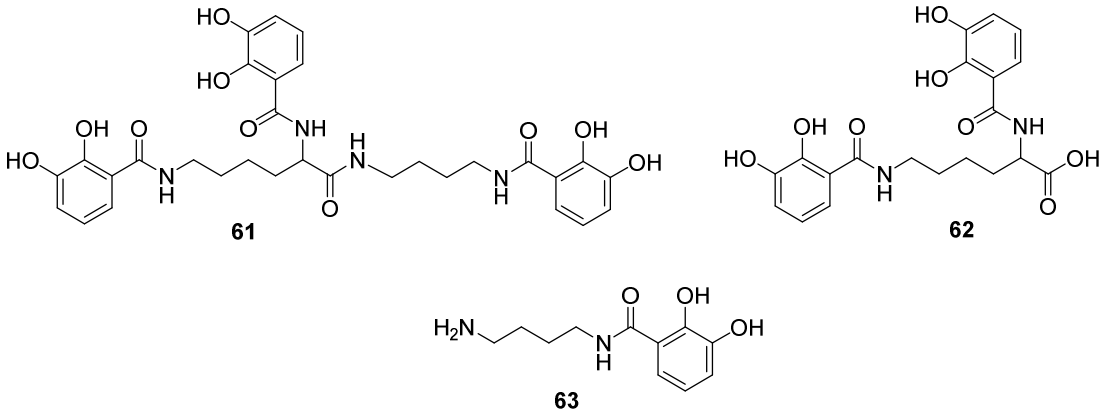


Figure 47 : Structures de la protochéline **61**, de l'azotochéline **62** et de l'aminochéline **63**.

La synthèse et les propriétés de la protochéline **61** et le développement des vecteurs mimant ce sidérophore faisaient partie plus particulièrement du travail du Dr. Etienne Baco lors de son stage postdoctoral au laboratoire. Nous ne traiterons ici que les aspects liés à l'azotochéline **62** et l'aminochéline **63** qui ont été plus spécifiquement liés au sujet de cette thèse. La proximité structurale entre ces composés et l'entérobactine **24** conduit à s'interroger sur leur capacité à servir de sidérophores hétérologues, et donc de modèle pour le développement de vecteurs utilisables dans des stratégies antibiotiques contre *P. aeruginosa*. Afin de vérifier ce point nous avons débuté ce travail par la synthèse des sidérophores **62** et

63 et par le développement des analogues bis-catécholé BCV **64** et mono-catécholé MCV **65** susceptibles de les imiter (**Figure 48**).

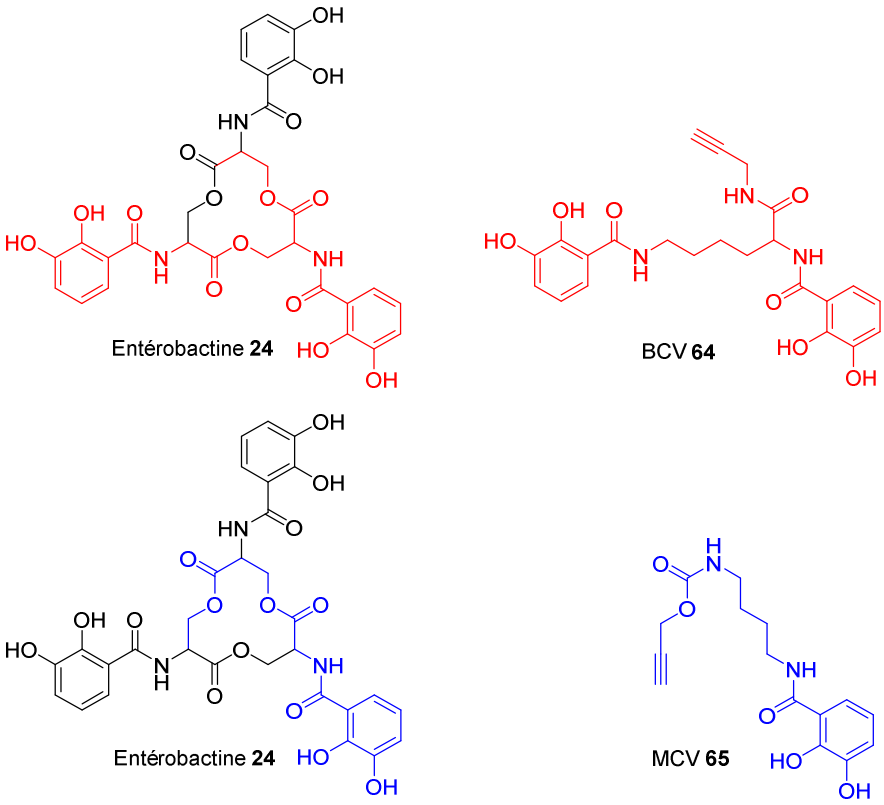


Figure 48 : Structures des vecteurs bis-catécholé BCV **64** et mono-catécholé MCV **65** mimant respectivement l'azotochéline et l'aminochéline.

Comme le vecteur TCV développé antérieurement,[143] les deux vecteurs BCV **64** et MCV **65** sont doté d'une triple liaison susceptible de réagir par cycloaddition 1,3-dipolaire (chimie « click ») avec des antibiotiques munis d'une fonction azoture. Les synthèses et les propriétés biologiques des composés **62, 63**, **64** et **65** sont décrites dans la suite du manuscrit.

I. Synthèse de l'azotochéline 62, de l'aminochéline 63 et des vecteurs MCV 65 et BCV 64

Plusieurs synthèses de l'aminochéline **63** ou de l'azotochéline **62** ont été décrites[144,145]. Ces synthèses utilisent toujours l'acide 2,3-dihydroxybenzoique **66** comme produit de départ. La protection de la fonction catéchol est nécessaire tout au long de la synthèse des

sidérophores catécholés afin de s'affranchir de réactions secondaires et de faciliter les étapes de purification (polarité, complexation des irons, solubilité). Dans la littérature, ces protections sont le plus souvent des groupements benzyle[144] ou isopropyle. Les groupements benzyles peuvent être éliminés dans des conditions d'hydrogénation. Ces dernières ne sont pas compatibles avec la fonction alcyne que nous souhaitons introduire sur les vecteurs. Quant aux groupements isopropyle, ils sont clivés en présence d'acide de Lewis forts comme BCl_3 ou BBr_3, peu compatibles avec de nombreux groupements fonctionnels. Les rendements de déprotection restent en outre souvent modestes. Dans ce contexte la synthèse des deux sidérophores catécholés et des deux vecteurs correspondants s'appuie sur le pentafluorophényl ester de l'acide diphényl-benzo[1,3]dioxole-4-carboxylique **67**, mis au point précédemment au laboratoire.[143] Le synthon **67** a été conçu comme un intermédiaire de synthèse utilisable pour préparer un grand nombre de sidérophores catécholés. La fonction catéchol est protégée par un groupe diphényl-dioxole clivable ultérieurement en milieu acide. La déprotection de la fonction chélatante se déroulant dans la dernière étape. Le synthon **67** est aussi doté d'une fonction acide activée sous forme d'un ester de pentaflurophénol très réactif en présence d'une amine. En outre le composé **67** est cristallin, stable sur le long terme à 5°C et peut-être produit par grammes à partir de composés commerciaux et suivant des protocoles désormais bien maitrisés au laboratoire : L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **66** est tout d'abord traité par du chlorure de thionyle. Le chlorure d'acide résultant n'est pas purifié et est utilisé tel que dans une réaction de solvolyse par le méthanol en présence de triéthylamine. L'ester méthylique **68** est ainsi obtenu de manière quantitative. Cet ester est ensuite mis en réaction en liquide pur à 160°C avec le dichloro-diphénylméthane. Le diphényl-dioxole obtenu est utilisé sans purification dans la suite de la réaction. La fonction ester du composé **68** est saponifiée par un traitement au triméthylsilanolate de potassium (TMSOK) pour conduire à l'acide **69** avec un rendement de 55% sur deux étapes. L'acide **69** est finalement activé à l'aide pentafluorophénol, en présence de *N,N'*-diisopropylcarbodiimide dans un mélange d'acétonitrile et de pyridine, pour conduire au synthon catécholé **67** isolé avec un rendement de 93% sur cette dernière étape et 51% sur les cinq étapes de la synthèse à partir de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **66** (**Schéma 1**).

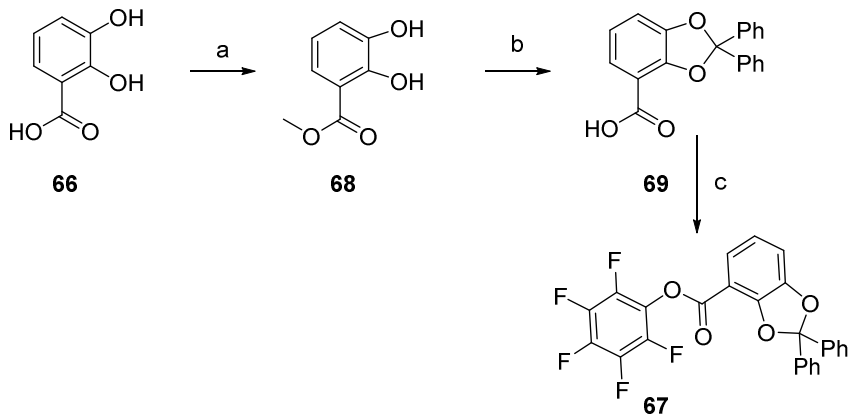


Schéma 1 : Synthèse du catéchol protégé : (a) $SOCl_2$ reflux puis MeOH, Et_3N, 0 °C à 25 °C, quantitatif sur deux étapes cumulées (b) Cl_2CPh_2, 160 °C, puis TMSOK, THF 70 °C, 55% sur deux étapes cumulées (c) DIC, C_6F_5OH, acétonitrile/pyridine (9/1), 93%

A partir du composé **67**, la synthèse de l'aminochéline **63** et du vecteur MCV **65** est très directe : Le 1,4-diaminobutane est mis en réaction avec le synthon **67** en excès (**Schéma 1**). L'aminochéline protégée **70** est obtenue quantitativement. Le groupe protecteur est ensuite éliminé en présence de TFA pour conduire à l'aminochéline **63** recherchée avec un rendement de 55%. Le traitement de l'aminochéline protégée **70** avec du propargyl-chloroformate en présence de base de Hünig conduit au vecteur MCV **71** protégé isolé avec un rendement de 90%. Afin de restaurer les propriétés chélatrices des composés **70** et **71**, le groupe protecteur diphényl-dioxole doit être éliminé dans des conditions acides. Nous avons utilisé dans un premier temps les conditions décrites par le Dr. Baco sur des molécules structuralement proches à savoir utiliser de l'acide trifluoroacétique 20% en présence de triisopropylsilane pendant une nuit à 20°C. Si ces conditions ont permis d'isoler l'aminochéline **63** avec un rendement de 55%, sur le MCV protégé **71**, la réaction n'est pas complète après 24 heures. Lors des essais de déprotection nous avons constaté un meilleur avancement de la réaction lorsqu'une faible quantité d'éthanol est ajoutée au milieu réactionnel. Le vecteur MCV déprotégé **65** est isolé par précipitation dans un mélange THF/cyclohexane. Cette précipitation permet de d'isoler le produit recherché avec un rendement de 87% sans qu'aucune autre étape de purification, notamment sur colone de silice démétallée, ne soit nécessaire (**Schéma 2**).

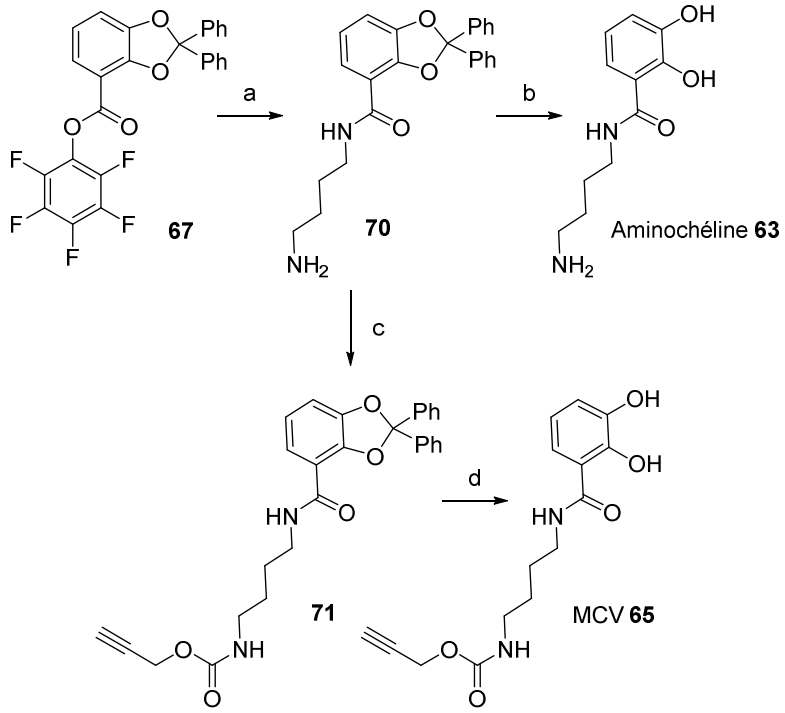


Schéma 2 : Synthèse de l'aminochéline **63** et du vecteur MCV **65**: (a) 1,4-diaminopropane, CH_2Cl_2, 25 °C, quant., (b) TFA/CH_2Cl_2 25%, TIPS, EtOH, 22 °C, 55%. (c) Propargylchloroformate, DIPEA, CH_2Cl_2, 25 °C, 90%. (d) TFA/CH_2Cl_2 20%, TIPS, EtOH, 22 °C, 87%.

L'usage de l'ester activé **67** est également avantageux pour la synthèse de l'azotochéline **62** et du vecteur BCV **64**. L'ester méthylique de (L)-lysine **72** est traité par l'ester activé **67**, en présence de base de Hünig, pour conduire au diamide **73** isolé avec un rendement de 86%. L'ester méthylique **73** est ensuite saponifié par un traitement au peroxyde de lithium pour conduire à l'azotochéline protégée **74** isolée avec un rendement quantitatif. L'acide carboxylique **74** est ensuite couplé avec la propargylamine en présence d'HBTU pour conduire au vecteur BCV protégé **75**. Lors de l'étape de déprotection des composé **70** et **75** nous avons, utilisé dans un premier temps les conditions décrites antérieurement au laboratoire.[143] Les analyses par RMN et par spectrométrie de masse ont montré la présence des catéchols libres attendus **62** et **64** mais également d'une quantité non négligeable d'un produit dont uniquement l'un des catéchols restait protégé. La déprotection des composés bis-catécholés **62** et **64** a ensuite été effectuée dans des conditions similaires à celles décrites pour le vecteur monocatécholé, c'est à dire à 25% de TFA, en présence de triisopropylsilane dans le dichlorométhane. Dans ces conditions l'azotochéline **62** est isolée avec un rendement de 48%. Cependant, dans les mêmes conditions, la précipitation du vecteur BCV déprotégé **64** conduit en général à de faibles rendements. Dans ces conditions le BCV **64** est isolé avec un rendement de 35%. (**Schéma 3**).

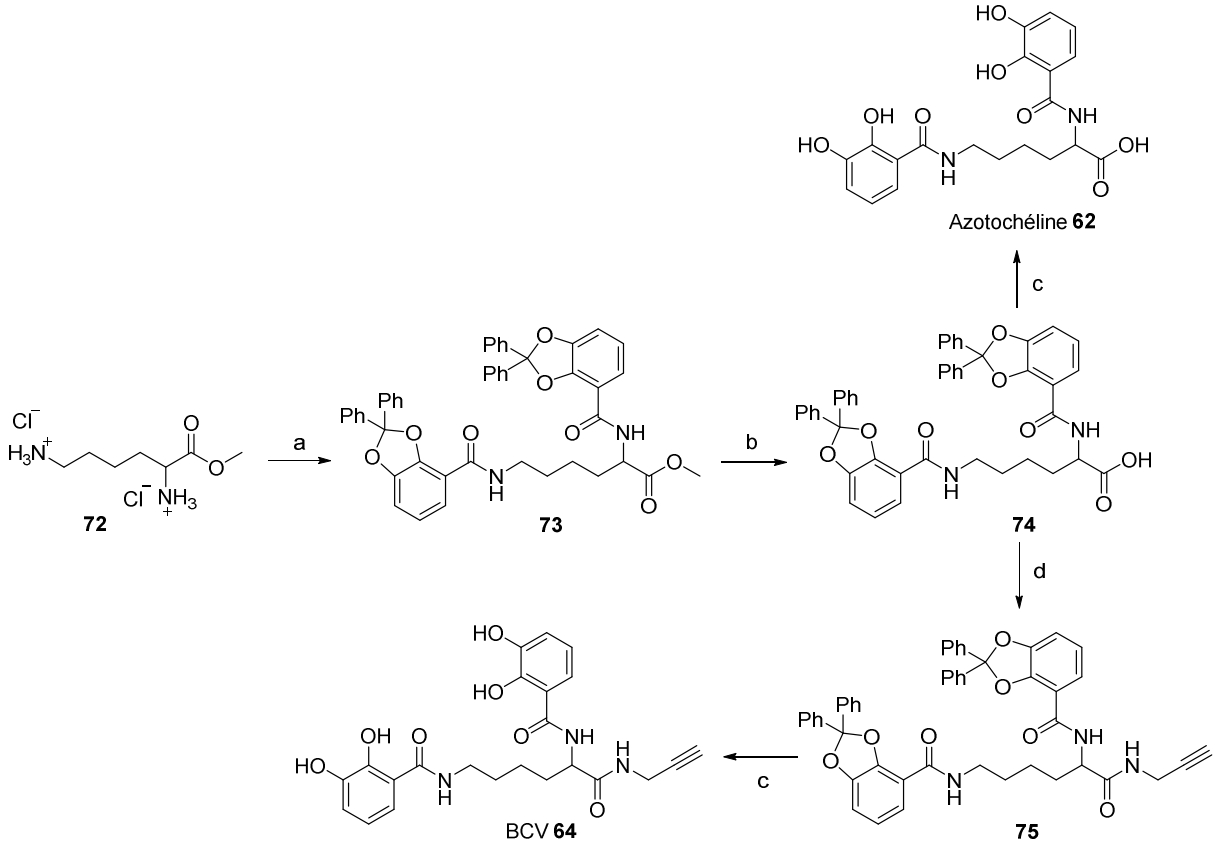


Schéma 3 : Synthèse de l'azotochéline **62** et du vecteur BCV **64** : (a) **67**, DIPEA, DMAP, CH_2Cl_2, 86%, (b) LiOH, H_2O_2, THF, quant., (c) TFA/CH_2Cl_2 25%, TIPS, 20°C, 35% pour **64**, 48% pour **62**. (d) Propargylamine, HBTU, DIPEA, CH_2Cl_2, 87%.

La mise au point des synthèses des sidérophores **62**, **63** et des vecteurs **64** et **65** a permis d'obtenir les quantités de produits nécessaires à l'étude des propriétés biologiques de ces composés et à l'évaluation de l'utilité des vecteurs MCV **65** et BCV **64** dans des stratégies de type cheval de Troie. Ces études biologiques ont été menées au laboratoire par Mlle Véronique Gasser (Ingénieur d'étude, CNRS).

II. Etude des propriétés biologiques de l'aminochéline 63, de l'azotochéline 62 et des vecteurs MCV 65 et BCV 64

A. TRANSPORT DU FER

Nous avons souhaité savoir si les deux sidérophores **62** et **63** d'*Azotobacter vinelandii* et les deux vecteurs correspondants MCV **65** et BCV **64** sont des sidérophores, c'est-à-dire capables de promouvoir l'acquisition du fer, chez *P. aeruginosa*. Notre équipe a, depuis plusieurs années, une compétence reconnue dans l'utilisation du ^{55}Fe dans l'analyse de l'import du fer sur des bactéries vivantes. Cette technique a été utilisée pour évaluer les propriétés sidérophores des composés **62**, **63**, **64** et **65**. Dans ces expériences, le ^{55}Fe est incubé avec le sidérophore. Le sidérophore chargé en ^{55}Fe(III) est ensuite ajouté à des cultures de *P. aeruginosa* en milieu carencé en fer (milieu CAA). A intervalle de temps donné, un aliquote est soustrait de l'expérience pour être filtrée (ou centrifugée). La radioactivité incorporée par les cellules bactériennes est mesurée par scintillation et permet de mesurer la quantité de ^{55}Fe(III) ayant pénétré dans la bactérie par unité de temps. Des expériences contrôles permettent de vérifier la réalité et la nature des transports éventuellement observés. L'utilisation de CCCP (carbonylcyanure *m*-chlorophénylhydrazone) qui inhibe la force proton-motrice permet de vérifier qu'il s'agit d'un import dépendant d'un transporteur TonB-dépendant. L'utilisation de mutants dans différentes voies/protéines de transport permet en parallèle de valider leur importance dans le processus d'acquisition du sidérophore-^{55}Fe testé. Dans ces expériences, les cultures sont induites préalablement avec l'entérobactine.

Dans ce contexte les deux sidérophores **62** et **63** d'*Azotobacter vinelandii* et les deux vecteurs correspondants MCV **65** et BCV **64** ont été testés dans ces expériences de transport. Ainsi l'azotochéline **62**, appelée BCS (*Bis-Catechol Siderophore*) dans certains de nos schémas, et le vecteur correspondant BCV **64** sont en mesure de transporter le ^{55}Fe avec une efficacité proche de celle de l'entérobactine naturelle. Ce transport est aboli en présence de CCCP ce qui implique le passage probable par un transporteur TonB-dépendant. L'abolition partielle de ce transport dans un mutant n'exprimant pas le transporteur PfeA et l'activité retrouvée dans des souches complémentées, prouve que l'assimilation des chélates ferriques des composés **62** et **64** est dépendante de ce transporteur. L'abolition incomplète semble néanmoins mettre en évidence l'implication d'un, ou d'autres, transporteurs TonB-dépendants, dont l'identité n'a pas pour l'instant été déterminée (**Figure 49**).

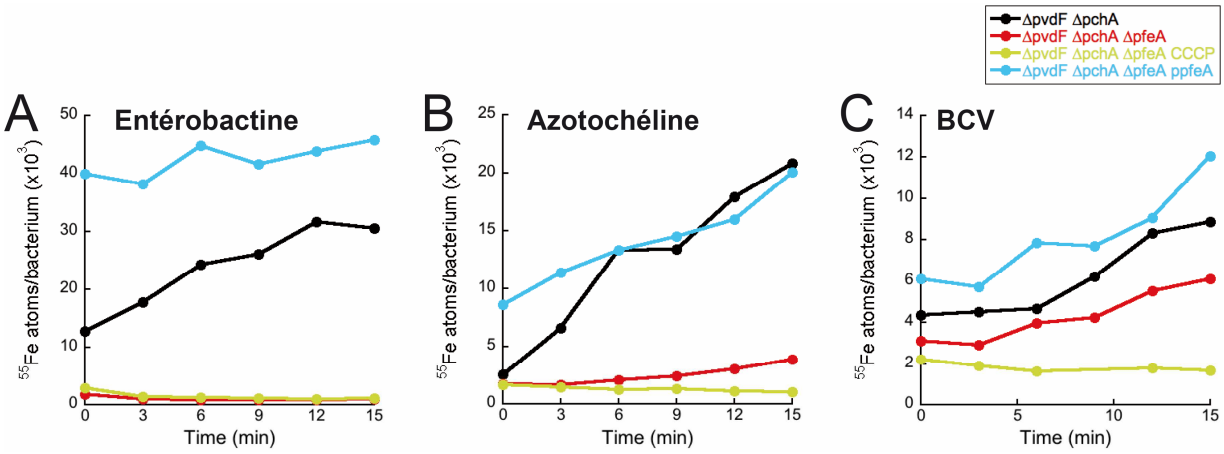


Figure 49 : Transport du ^{55}Fe par **A.** l'entérobactine **24**, **B.** l'azotochéline (BCS) **62**, et **C.** le vecteur BCV **64**.

Une analyse plus poussée de ces données de transport permet même de quantifier l'efficacité de ce transport en termes de nombre d'ions ^{55}Fe(III) pénétrant dans une bactérie par minute. Cette expérience a été menée en parallèle sur PAO1 et sur une souche de *P. aeruginosa* (Δ*pvdF*Δ*pchA*) ne produisant pas ses sidérophores endogènes, pyoverdine et pyochéline (**Tableau 1**).

	Atomes de ^{55}Fe/bactérie/min		
	Entérobactine **24**	BCS **62**	BCV **64**
PAO1 (LB)	827± 64	299 ± 33	661 ± 32
Δ*pvdF*Δ*pchA* (CAA)	1306 ± 220	712 ± 126	372 ± 68

Tableau 1 : Quantités de ^{55}Fe accumulée par l'entérobactine **24**, l'azotochéline (BCS) **62**, et le vecteur BCV **64** dans les souches PAO1 et Δ*pvdF*Δ*pchA* de *P. aeruginosa* induites en présence de 10 µM des composés testés.

Nous avons tenté de reproduire le même type d'expériences de transport de ^{55}Fe en utilisant l'aminochéline (MCS : *Mono-Catechol Siderophore*) **63** et le vecteur MCV **65** comme sidérophores. Malheureusement, avec ces chélateurs les expériences ont été peu concluantes : un rapport signal/bruit élevé suggère que dans les conditions générales utilisées au cours de ces expériences, les chélates ferriques du MCS et du MCV précipitent. La mise au point de conditions d'expériences spécifiquement dédiées aux sidérophores monocatécholés n'a pas permis d'obtenir de résultats plus exploitables.

Quelques groupes à travers le monde tentent, comme nous, de mettre au point des nouveaux vecteurs sidérophores pour des stratégies antibiotiques de type cheval de Troie. Dans l'impossibilité technique, ou règlementaire, d'employer le fer radioactif, ces groupes se contentent souvent de valider les capacités sidérophores de leurs vecteurs par des tests montrant qu'en présence du chélateur testé, la croissance du microorganisme augmente significativement par rapport au témoin. Nous avons donc utilisé cette méthode pour évaluer les capacités de MCS **63** et MCV **65** à transporter le fer chez la souche sauvage de *Pseudomonas aeruginosa*. Dans cette expérience, l'aminochéline (MCS) **63** accroit la croissance bactérienne de près de 100% et le MCV d'environ 25% (DO_{600}). Ces données prouvent : 1- que MCS **63** et MCV **65** sont capables de promouvoir la croissance bactérienne et 2-que ces deux chélateurs exogènes n'ont pas d'activité bactéricide ou bactériostatique sur *P. aeruginosa* PAO1). (**Figure 50**)

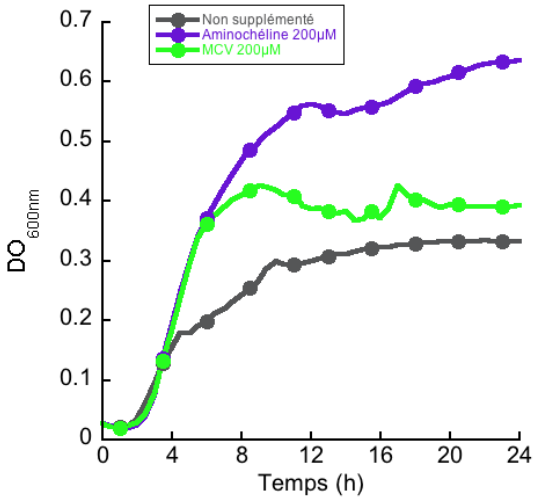


Figure 50 : Courbes de croissance de *P. aeruginosa* sauvage en milieu CAA en présence de 200 µM d'aminochéline (MCS, courbe violette) **63** et du vecteur MCV (courbe verte) **65**. La courbe grise représente la croissance de la bactérie en l'absence de tout chélateur.

Le même type d'expériences a été mené sur l'azotochéline **62** et le vecteur BCV **64**. Dans ce contexte les deux molécules augmentent la croissance bactérienne de près de 100% (DO_{600}). A l'image de que nous avons observé pour l'aminochéline et le MCV, ces données prouvent que le BCS **62** et BCV **64** sont capables de promouvoir la croissance bactérienne et qu'ils n'ont pas d'activité bactéricide ou bactériostatique sur *P. aeruginosa*. (**Figure 51**)

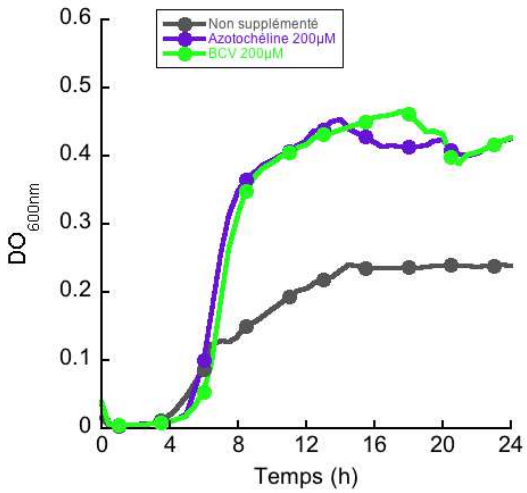


Figure 51 : Courbes de croissance de *P. aeruginosa* sauvage en milieu CAA en présence de 200 µM d'azotochéline **62** (BCS, courbe violette) et du vecteur BCV **64** (courbe verte). La courbe grise représente la croissance de la bactérie en l'absence de tout chélateur.

Comme nous l'avons mentionné précédemment le système de transport de fer entérobactine–dépendant n'est exprimé chez *P. aeruginosa* que si le sidérophore est détecté par la bactérie dans le milieu extracellulaire. Cette induction se traduit notamment par l'expression du transporteur de membrane externe PfeA responsable de la reconnaissance et de l'import de l'entérobactine entre le milieu extracellulaire et le périplasme.

B. Induction de l'expression du transporteur de membrane externe PfeA

La technique de qRT-PCR est fondée sur la quantification des mRNA transcrits dans les conditions données de l'expérience. Ces mRNA sont convertis en ADNc par la reverse transcriptase puis cet ADNc est amplifié par polymérisation en chaîne. Cette technique permet d'évaluer le niveau d'expression d'un gène donné par rapport à une condition témoin.

Nos expériences montrent très logiquement qu'en présence d'entérobactine il y a une forte induction du gène PfeA, codant pour le transporteur de membrane externe spécifique de ce sidérophore chez *P. aeruginosa*. Les chélateurs bis-catécholés azotochéline (BCS) **62** et BCV **64**, sont eux aussi en mesure d'induire l'expression de cette protéine membranaire mais à un niveau plus faible. Cette expression est spécifique puisque l'expression d'aucun des autres transporteurs testés dans ces expériences ne semble être induite dans des proportions significatives. Il est a noter que l'expression de CirA et PirA, pourtant décrits comme

transporteur de l'entérobactine ou de ses métabolites, n'est pas induite dans nos conditions. (**Figure 52**)

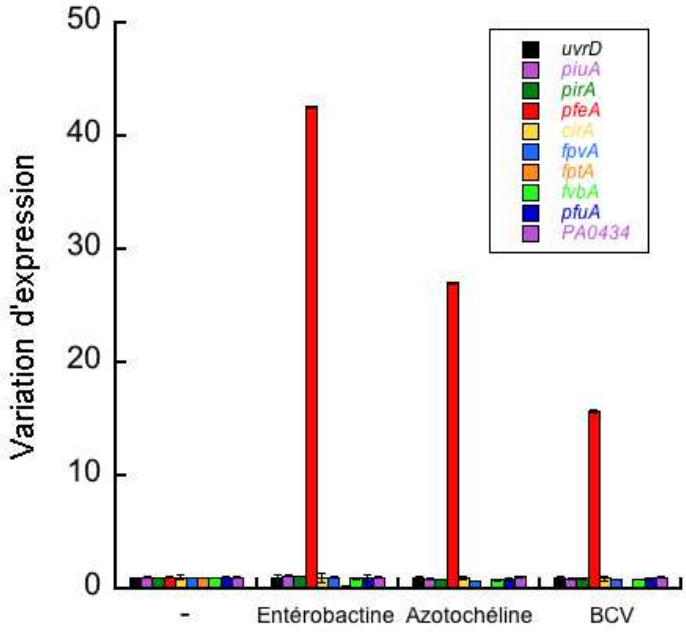


Figure 52 : Variation d'expression des gènes codants pour les transporteurs de membranes externes lorsque *P. aeruginosa* est induit par l'entérobactine **24**, l'azotochéline **62** ou le BCV **64**.

De plus, le transporteur responsable de l'import résiduel de ^{55}Fe observé lors de l'évaluation de l'entérobactine **24**, l'azotochéline (BCS) **62**, et du vecteur BCV **64** ne fait pas partie de ceux testés et reste donc à trouver au nombre des dizaines de transporteurs TonB-dépendants exprimables chez *P. aeruginosa* (**Figure 49** et **52**).

Le même type d'étude par qRT-PCR a été mené sur l'aminochéline **63** et le vecteur MCV **65**. Le cas de ces composés semble plus complexe à traiter. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les expériences de croissance en milieu carencé montrent que ces deux composés ont une activité sidérophore. La masse molaire putative des ferri-sidérophores correspondants étant très supérieure aux 500 Da qui est la limite de perméabilité membranaire décrite pour *P. aeruginosa*,[146] cet import est vraisemblablement le résultat d'un transport actif TonB-dépendant plutôt que d'un phénomène de diffusion transmembranaire. Lors de nos expériences de qRT-PCR utilisant les sidérophores **63** et **65** nous avons observé de façon aléatoire, en fonction des expériences, l'induction du transporteur CirA. Nous avons néanmoins un problème récurrent de reproductibilité de ce résultat sur des expériences menées en série. Si l'induction de CirA par les deux composés **63** et **65** reste à confirmer, les

expériences déjà réalisées montrent clairement que le transporteur PfeA n'est, cette fois, pas impliqué dans le transport de l'aminochéline **63** et du vecteur mono-catécholé MCV **65**.

L'implication du transporteur PfeA dans l'import des chélates ferriques de l'azotochéline **62** et du vecteur BCV **64** nous interroge sur la manière dont ces sidérophores, pourtant structuralement éloignés de l'entérobactine, interagissent avec la protéine membranaire. Pour mieux comprendre l'origine de cette reconnaissance il est nécessaire d'avoir un accès à une structure tridimensionnelle du transporteur.

C. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU TRANSPORTEUR PFEA

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. James Naismith (St Andrews University, Royaume-Uni), la structure tridimensionnelle du transporteur PfeA a été résolue dans sa forme vide de tout sidérophore, mais aussi celle contenant l'entérobactine ferrique. PfeA est l'homologue chez *P. aeruginosa* du transporteur FepA de l'entérobactine chez *E. coli* dont la structure a été l'une premières à être résolue pour cette famille de protéines membranaires.[147] Ces deux protéines présentent la structure globale hautement conservée des transporteurs de membrane externe TonB-dépendant: un pore défini par un tonneau β constitué de 22 brins anti-parallèles et d'un bouchon obturant ce pore transmembranaire avec des boucles extracellulaires et périplasmiques. Des échantillons d'azotochéline **62** et de BCV **64** ont été envoyés pour être « trempés » avec les cristaux de PfeA. La structure du complexe ternaire PfeA-azotochéline ferrique a été obtenue récemment avec une résolution de 2,9 Å (**Figure 53 A.**). La structure du complexe ternaire PfeA-azotochéline **62** ferrique montre bien que ce sidérophore agit comme un chélateur tétradentate du fer(III) où seules les fonctions catéchols sont impliquées dans l'interaction avec le métal. Il existe une parfaite superposition de ces deux catéchols avec deux des catéchols de l'entérobactine. Les deux sidérophores utilisent d'ailleurs rigoureusement le même site de liaison sur le transporteur. La sphère de coordination du fer(III) dans le complexe d'azotochéline est complétée par les deux oxygènes d'une molécule de glycol, issue des conditions de cristallisation. Un phénomène identique avait été observé par notre équipe lors de la résolution du complexe entre la pyochéline ferrique et son transporteur de membrane externe FptA.[90] Dans la structure PfeA-azotochéline ferrique cette molécule de glycol s'insère dans le complexe à la même position que le

troisième catéchol dans l'entérobactine ferrique (**Figure 53 B.** et **Figure 54**). Le réseau de liaisons hydrogènes liant l'entérobactine et l'azotobactine au transporteur n'est pas supperposable mais implique les mêmes acides aminés en particulier l'arginine 483 et la glutamine 485 (**Figure 54**).

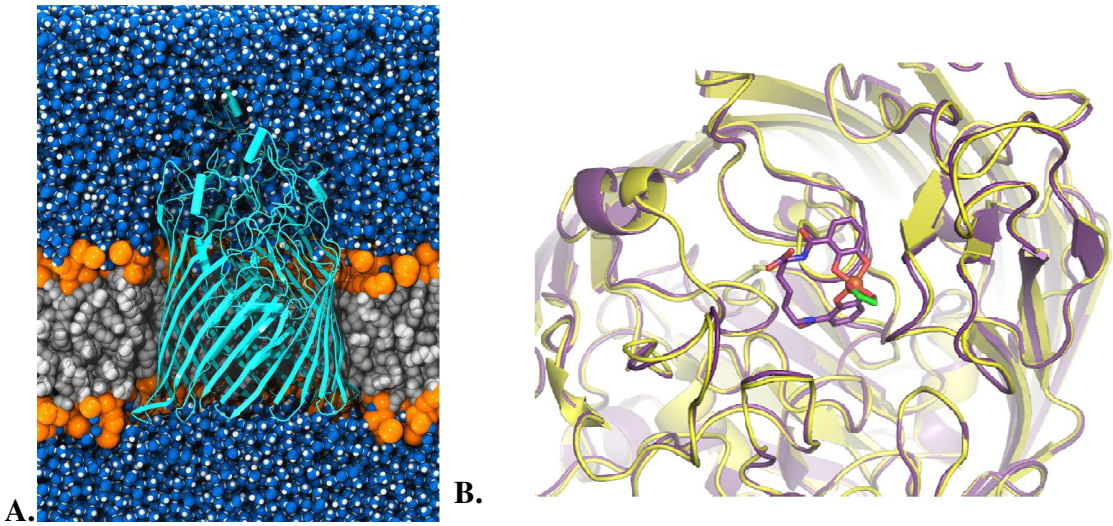


Figure 53 : A. Structure tridimensionnelle du transporteur PfeA sous forme vide modélisé en insertion dans une bicouche lipidique (Pr. Matteo Ceccarelli. Universita di Cagliari, Italie). **B.** Superposition des vues apicales (face extracellulaire) des structures tridimensionnelles de PfeA vide (jaune) et du complexe ternaire PfeA-azotochéline **62** ferrique (violet). L'azotochéline est colorée en violet, le fer en orange et le glycol complétant la sphère de coordination en vert.

La qualité actuelle des cristaux de PfeA-BCV ferrique obtenus dans le cadre de cette même étude ne permet pas pour l'instant de résoudre la structure du co-complexe correspondant. Ces travaux se poursuivent néanmoins dans le cadre du consortium européen IMI ND4BB TRANSLOCATION qui a financé les derniers mois de cette thèse. Les données structurales obtenue sur l'azotochéline permettent néanmoins de se rassurer sur plusieurs points concernant nos approches de type cheval de Troie utilisant les vecteurs BCV **64**. La seule différence structurale entre l'azotochéline **62** et le BCV **64** est le remplacement de la fonction carboxylate de **62** par un propargylamide dans le vecteur **64**. La structure du complexe PfeA-azotochéline ferrique montre que ce carboxylate est orienté vers la face apicale du transporteur s'ouvrant largement vers l'espace extracellulaire. Dans cette conformation, la liaison de l'azotochéline, ou du BCV, à un antibiotique ne devrait pas impacter la reconnaissance par le transporteur (**Figure 55**).

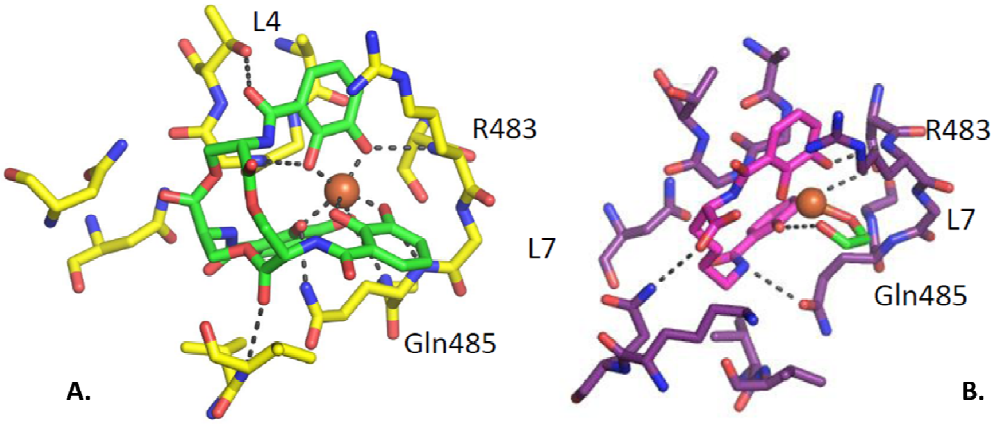


Figure 54 : A. Structure tridimensionnelle du site de liaison des sidérophores sur le transporteur PfeA, co-cristallisé avec l'entérobactine ferrique (Vue **A**) et l'azotobactine ferrique (Vue **B**).

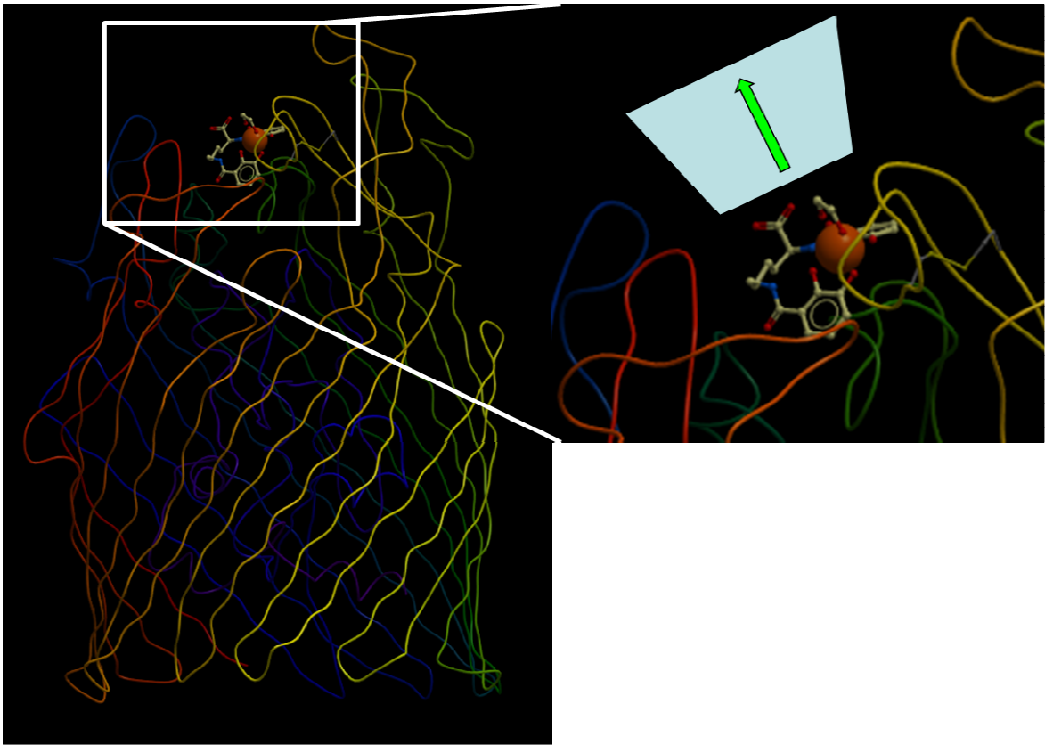


Figure 55 : Structure tridimensionnelle du TME PfeA, co-cristallisé avec l'azotochéline **62**. La flèche verte et le trapèze cyan indiquent respectivement la direction et la zone d'expansion du bras espaceur et de l'antibiotique pouvant être conjugué sur ce sidérophore.

Les données biologiques antérieures, excluant la contribution de PfeA à l'import des sidérophores mono-catécholés aminochéline **63** et MCV **65**, ces derniers n'ont pas été testé dans ces expériences de co-cristallisation.

Pour « synthétiser » l'ensemble des données biologiques recueillies sur les quatre composés chélateurs **62**, **63**, **64** et **65** nous pouvons affirmer que :

- L'aminochéline (MCS) **63** et le vecteur monocatécholé MCV **65** présentent des propriétés biologiques identiques et sont capables de promouvoir la croissance de *P. aeruginosa* en milieu carencé en fer, suggérant des capacités à promouvoir l'assimilation du fer chez ce microorganisme. Néanmoins la voie de transport empruntée n'est à ce jour pas connu mais le passage par la voie entérobactine-dépendante peut désormais être exclu.

- L'azotochéline (BCS) **62** et le vecteur biscatécholé BCV **64** présentent des propriétés biologiques identiques et sont capables de promouvoir l'accumulation du fer dans *P. aeruginosa* en utilisant la voie de transport entérobactine-dépendante. Ces sidérophores bis-catécholés semblent néanmoins capables d'utiliser en parallèle une autre voie de transport dépendante d'un sidérophore non connue à ce jour.

- Les sidérophores bis-catécholés **62** et **64** sont en mesure d'induire l'expression du système de transport entérobactine-dépendant. Ce n'est pas le cas des composés mono-catécholés **63** et **65**.

L'ensemble de ces données confirme que les composés catécholés **62**, **63**, **64** et **65** sont des candidats prometteurs en tant que vecteurs dans des approches de type cheval de Troie. La suite de ce manuscrit fait état de nos avancées dans la synthèse de conjugués entre ces vecteurs et des antibiotiques.

III. Synthèse des conjugués sidérophores-antibiotiques

Dans notre approche de type cheval de Troie, l'azotochéline **62**, le vecteur BCV **64** et le vecteur mono-catécholé MCV **65** ont été utilisés. L'azotochéline **62** possède une fonction acide terminale permettant la conjugaison avec des antibiotiques possédant une amine *via* une liaison amide. Les vecteurs MCV **65** et BCV **64** sont munis d'une extension alcyne. Cette extension permet une conjugaison par cycloaddition 1,3-dipolaire (chimie click) avec différents antibiotiques munis d'azotures terminaux.

Dans la littérature, de nombreux antibiotiques différents ont déjà été vectorisés par des sidérophores catécholés. Une famille néanmoins n'a jamais été évaluée dans ce contexte contre *P. aeruginosa* : les oxazolidinones. Le choix de cette famille d'antibiotiques relativement récents peut sembler discutable, a priori, compte tenu du spectre d'activité décrit pour ces antibiotiques. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, les oxazolidinones, dont le représentant principal est le linézolide, sont actifs exclusivement sur les pathogènes Gram-positifs.[18] La cible de cet antibiotique est pourtant identique chez les deux types de bactéries : le ribosome.[15] Le différentiel d'activité n'est pas lié à une structure ou une fonctionnalité différente de la cible biologique mais plutôt à une difficulté pour les oxazolidinones à s'accumuler dans les bactéries Gram-négatives.[148] Cette difficulté est liée à la faible perméabilité membranaire et dans une certaine mesure à des processus d'efflux plus importants chez les Gram-négatifs. La vectorisation de l'antibiotique par des sidérophores pourrait donc permettre d'étendre notablement le spectre d'activité des oxazolidinones. Cette vectorisation pourrait aussi permettre de limiter la toxicité périphérique importante de ces composés.[20] Les bactéries et cellules eucaryotes exprimant des modes d'acquisition des métaux différents, la molécule active vectorisée pourrait se concentrer préférentiellement dans les cellules bactériennes. La cible biologique des oxazolidinones étant cytoplasmique, il est évidemment préférable que le conjugué puisse rejoindre ce compartiment lors du mécanisme de transport. Les voies de transport des sidérophores catécholés étant peu décrites chez *P. aeruginosa* lorsque nous avons débuté ce projet, nous nous sommes fondé sur ce qui était connu chez *E. coli* où les sidérophores catécholés ont un destin purement cytoplasmique.

La synthèse des oxazolidinones munies de fonctions azotures et leur conjugaison avec les vecteurs vont être décrites successivement dans la suite du manuscrit.

A. SYNTHESE D'OXAZOLIDINONES MUNIES DE FONCTIONS AZOTURES

Le linézolide **10** est le composé phare de la famille des oxazolidinones. Ce composé étant plutôt onéreux nous avons choisi de le synthétiser en parallèle des azotures d'oxazolidinones recherchés afin qu'il serve de références dans les tests ultérieurs. Nous avons choisi d'introduire la fonction azoture au moyen de bras espaceurs de différentes longueurs. Les modifications sur l'oxazolidinone consistent soit à substituer la fonction acétyle du linézolide pour les oxazolidinones **76**, **77** et **78** soit en substituant le cycle morpholine par une pipérazine fonctionnalisée dans le cas des oxazolidinones **79**, **80** et **81**. (**Figure 56**).

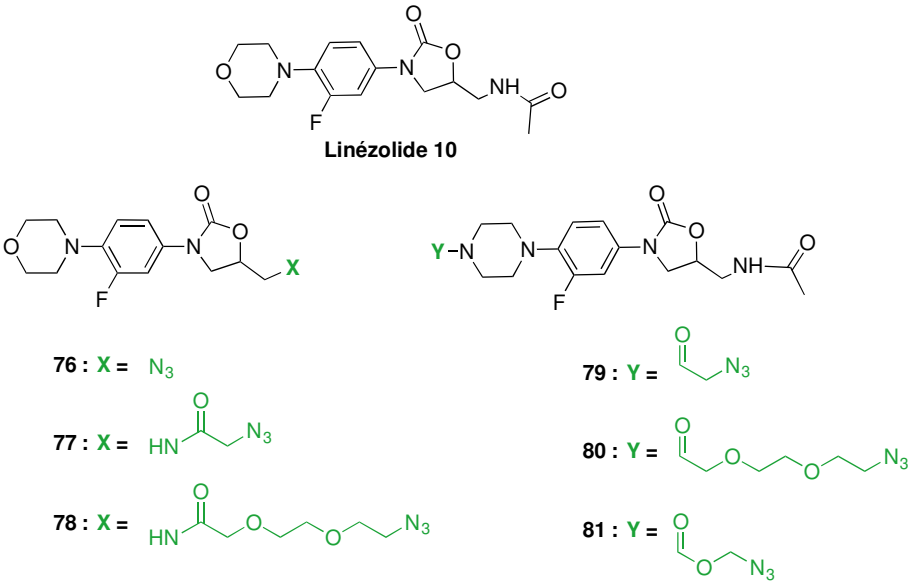


Figure 56 : Structures du linézolide et des azotures d'oxazolidinone **76** à **81**.

Les oxazolidinones souhaitées ont été synthétisées à partir de la synthèse décrite par Yan et al[149]. Certaines conditions réactionnelles ont néanmoins été modifiées afin d'en améliorer les rendements ou de rendre les étapes de purifications plus aisées.

1. *Synthèse du linézolide*

A partir de la morpholine **82**, le benzyl-carbamate **83** est synthétisé avec un rendement de 74% sur deux étapes couplée.[149,150] Cette molécule ayant été synthétisée en grande quantité au laboratoire par le Dr. Bénédicte Pesset lors de sa thèse, j'ai débuté mes synthèses à partir

de ces échantillons. Le carbamate **83** est ensuite traitée par le *n*-butyllithium. Bien que l'ajout de l'organolithien se fasse à -70 °C, la température du milieu réactionnel doit atteindre les -10°C afin de former le carbocation intemédiaire. Ce carbocation est ensuite traité par le (*R*)-glycidylbutyrate afin de former l'oxazolidinone **84,** isolée avec un rendement de 70%. L'alcool est activé en présence de chlorure de mésyle dans un mélange triéthylamine-dichlorométhane pour conduire quantitativement au dérivé mésylé **85**. Le mésylate ainsi obtenu est traité par du NaN_3 dans la DMF à 80°C, pour conduire quantitativement à l'azoture **76**. Afin de synthétiser le linézolide **10**, plusieurs stratégies ont été envisagées. Tout d'abord l'utilisation d'un boride issu de la réaction de sulfate de cuivre avec du borohydrure de sodium, mais ces conditions n'ont pas permis d'isoler l'amine attendue. Le produit a pu être détecté en utilisant la réaction de Staüdinger en présence de triphénylphosphine. Néanmoins la séparation de l'amine résultante et de l'oxyde de triphénylphosphine s'est avérée difficile. Le produit a ensuite été synthétisé en utilisant la triphénylphosphine supportée. Les faibles rendements et le prix des réactifs, nous a conduit a ne pas poursuivre dans cette voie. Nous sommes revenu à une stratégie utilisant des borides métalliques. L'utilisation de borohydrure de sodium avec du chlorure de cobalt a permis de réduire l'azoture en amine de manière rapide et sélective[151]. L'amine obtenue par cette méthode peut directement être mise en réaction avec l'anhydride acétique en présence de DIPEA, pour conduire au linézolide **10** isolé avec un rendement de 70% sur deux étapes cumulées (**Schéma 4**).

L'azoture **76** est un intermédaire clé puisqu'il sert autant à la synthèse du linézolide que de produit de départ pour la synthèse des oxazolidinones **77** et **78**.

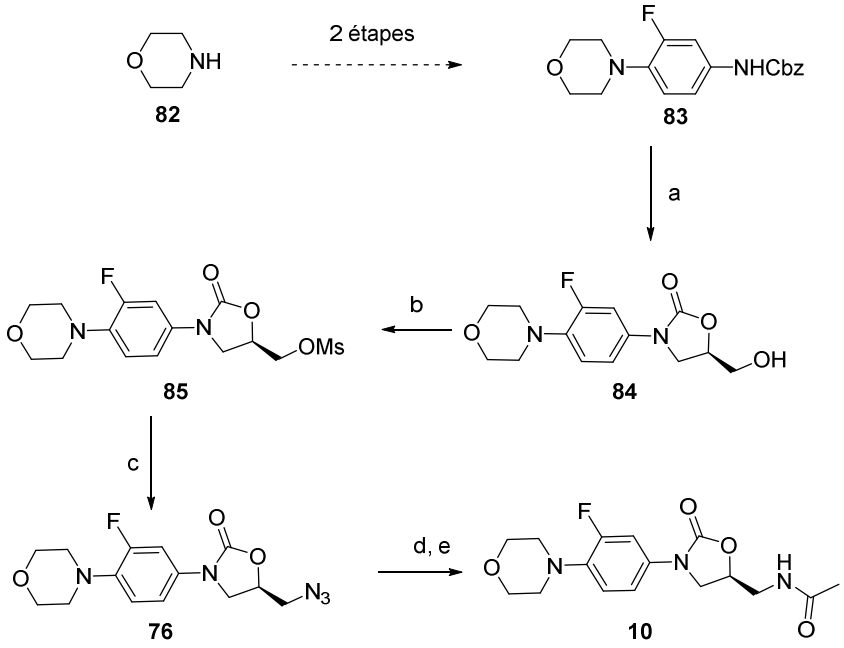


Schéma 4 : Synthèse de l'azoture **76** et du linézolide **10 :** (a) *n*-BuLi, THF, -78 °C à -10 °C puis (*R*)-glycidylbutyrate, -70 °C à 20 °C 70% (b) MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 100%, 20 °C (c) NaN_3, DMF, 75 °C, 100% (d) $NaBH_4$, $CoCl_2$, MeOH, 5 °C (e) Ac_2O, DIPEA, CH_2Cl_2, 20 °C, 70% sur deux étapes.

2. *Synthèse des oxazolidinones 77 et 78*

La synthèse de ces deux oxazolidinones débute par la réduction de l'azoture **76**, effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites pour la synthèse du linézolide. L'amine **86** obtenue est traitée soit par l'acide 2-azidoacétique, soit avec l'acide 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)acétique, en présence de chlorhydrate d'EDCI, pour conduire aux azotures **77** et **78** isolées avec des rendements respectifs de 70% et 78% sur deux étapes cumulées. (**Schéma 5**).

Nous avons choisi de dévélopper en prallèle une deuxième série d'oxazolidines qui laisserai la fonction acétyl intacte, cette dernière ayant été décrite comme potentiellement importante pour l'interaction avec la cible biologique. Dans cette approche la fonctionnalisation est possible à l'autre extrêmité de l'antibiotique en substituant la morpholine de départ par une pipérazine.

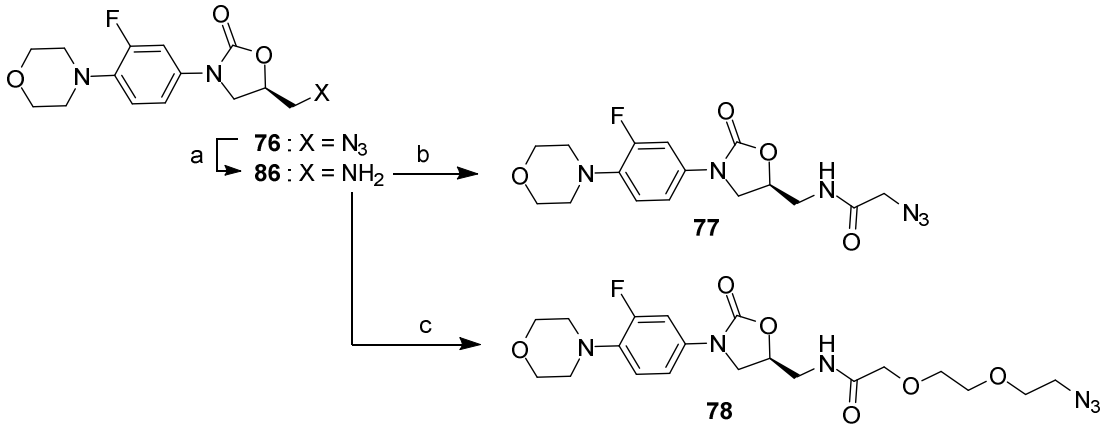


Schéma 5 : Synthèse des azotures **77** et **78**. (a) $NaBH_4$, $CoCl_2$, MeOH, 5 °C, (b) acide azidoacétique, EDCI, CH_2Cl_2, 20 °C, 70% sur deux étapes cumulées (c) acide 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)acétique, EDCI, CH_2Cl_2, 20 °C, 78% sur deux étapes cumulées.

*3. Synthèse des oxazolidinones **79, 80** et **81** à partir de la pipérazine*

La synthèse des oxazolidinones **79** à **81** débute par une réaction de substitution nucléophile aromatique de la pipérazine **87** sur le 3,4-difluoronitrobenzène. Cette réaction menée dans l'acétonitrile à 80 °C conduit au dérivé nitré **88** avec un rendement quantitatif. L'amine secondaire de la pipérazine est ensuite protégée par un groupement Boc. La réaction est conduite dans un mélange THF/eau, en présence de bicarbonate de sodium et de dicarbonate de di-*tert*-butyle. Le carbamate **89** est isolé avec un rendement de 93%. La fonction nitrée du composé **89** est réduite en amine par le boride de cuivre. L'amine obtenue n'est pas purifiée et est immédiatement mise en réaction avec le chloroformate de benzyle en présence de DIPEA afin d'obtenir le di-carbamate **90** avec un rendement de 42% sur deux étapes successives. Le composé **90** est traité par le *n*-butyllithium puis par le (*R*)-glycidylbutyrate conduisant ainsi à l'oxazolidinone **91** avec un rendement de 82%. L'alcool **91** est activé en présence de chlorure de mésyle dans un mélange triéthylamine-dichlorométhane pour conduire quantitativement au dérivé mésylé **92**. Le mésylate **92** est ensuite traité par NaN_3 dans la DMF à 75 °C, pour conduire à l'azoture **93** isolé avec un rendement quantitatif. La fonction azoture du composé **93** est réduite en amine par le boride de cobalt. Cette amine n'est pas isolée et est directement mise en réaction avec de l'anhydride acétique en utilisant les conditions développées lors de la synthèse du linézolide. Le dérivé acétylé **94** recherché est isolé avec un rendement de 81% (**Schéma 6**).

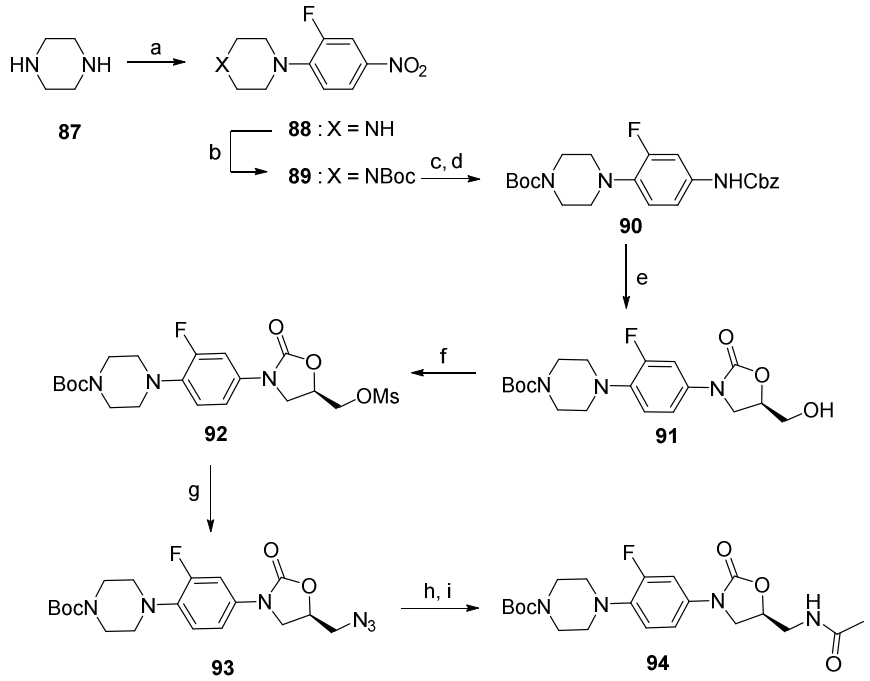
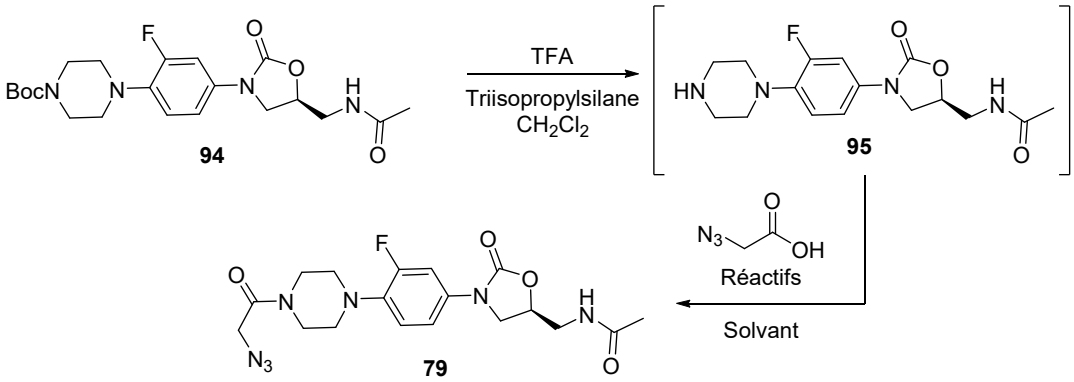


Schéma 6 : Synthèse de l'oxazolidinone **94** à partir de la pipérazine : (a) 3,4-difluoronitrobenzène, CH_3CN, 80 °C, 100% (b) Boc_2O, $NaHCO_3$, THF/H_2O, 25 °C, 93% (c) $CuSO_4$, $NaBH_4$, MeOH/H_2O, 5 °C (d) CbzCl, DIPEA, CH_2Cl_2, 42% sur deux étapes cumulées (e) *n*-BuLi, THF, -78 °C à -10 °C puis (*R*)-glycidylbutyrate, -70 °C à 20 °C, 82% (f) MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 20 °C ? 100% (g) NaN_3, DMF, 75 °C, 100% (h) $NaBH_4$, $CoCl_2$, MeOH, 5 °C (i) Ac_2O, DIPEA, CH_2Cl_2, 20 °C, 81%.

Le dérivé clé **94** est le produit de départ commun pour la synthèse des oxazolidinones **79** à **81**. Le dérivé **94** est déprotégé par d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane en présence de triisopropylsilane pour conduire à l'amine secondaire **95**. Cette amine n'est pas purifiée mais immédiatement mise en réaction pour introduire les bras espaceurs. Les premiers essais de couplage ont été effectués sur l'acide 2-azidoacétique, le moins onéreux des bras envisagés. Nous avons tenté d'activer cet acide sous forme de chlorure d'acyle (entrée 1) ou sous forme d'ester d'imidazole (entrée 2). Dans les deux cas ces expériences ont été peu fructueuses, le composé attendu **79** n'ayant été que discerné dans des bruts de réaction complexes et difficilement purifiables. (**Tableau 2**).



Réactif	Température	Solvant	Durée	Rendement en **79** sur 2 étapes
$SOCl_2$	78 °C	/	5 h	Traces dans un mélange complexe
Carbonyl-diimidazole	25 °C	$CHCl_3$	12 h	14% (rendement estimé RMN-MS)

Tableau 2 : Tentatives de synthèse de l'oxazolidinone **79**

Face à ce résultat nous avons préféré synthétiser un ester activé en traitant l'acide 2-azidoacétique par du *N*-hydroxysuccinimide en présence de chlorhydrate d'EDCI dans le dichlorométhane. L'ester activé **96** recherché est isolé avec un rendement de 62% (**Schéma 7**).

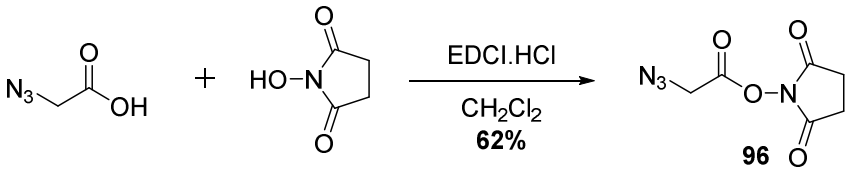


Schéma 7 : Synthèse de l'ester activé **96** de l'acide 2-azidoacétique.

Après traitement du carbamate **94** dans un mélange TFA/CH_2Cl_2 en présence de triisopropylsilane 10%, l'amine résultante est mise en réaction l'ester activé **96** en présence de DIPEA dans le dichlorométhane. L'azoture **79** est ainsi obtenu avec un rendement de 31% à partir du carbamate **94** (**Schéma 8**).

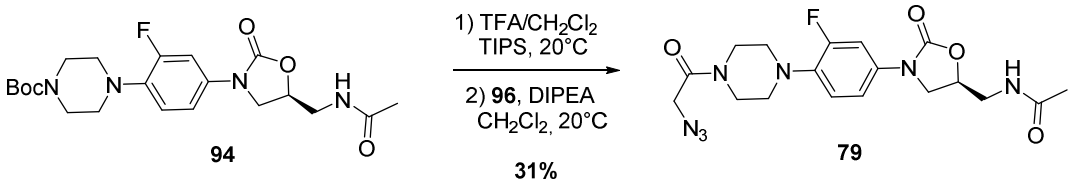


Schéma 8 : Synthèse de l'oxazolidinone **79**

De la même manière, un ester activé a été synthétisé à partir de l'acide 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)acétique **97** et le *N*-hydroxysuccinimide. Le couplage de ces molécules à l'aide du chlorhydrate d'EDCI conduit à l'ester activé **98** attendu isolé avec 83% de rendement. L'amine obtenue par déprotection du carbamate **94** en présence de TFA est ensuite mise en réaction avec l'ester activé **98** en présence de DIPEA. L'azoture d'oxazolidinone **80** est ainsi obtenu avec un rendement de 50% sur deux étapes (**Schéma 9**).

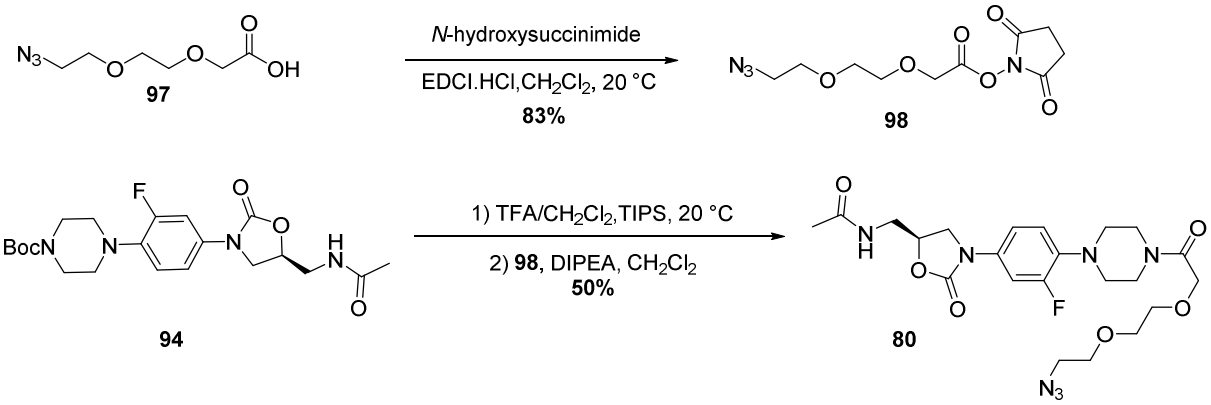


Schéma 9 : Synthèse de l'ester activé **98** et de l'oxazolidinone **80**

Enfin, pour synthétiser l'oxazolidinone **81**, l'amine obtenue par déprotection du *t*-butyl-carbamate **95** est traitée par le chlorométhyl-chloroformate, en présence de DIPEA dans le dichlorométhane. Le dérivé chloré **99** est ainsi obtenu avec un rendement de 85%. Ce dérivé halogéné est ensuite traité par l'azoture de sodium dans la DMF à 75 °C conduisant à l'azoture attendu, isolé avec un rendement de 83% (**Schéma 10**).

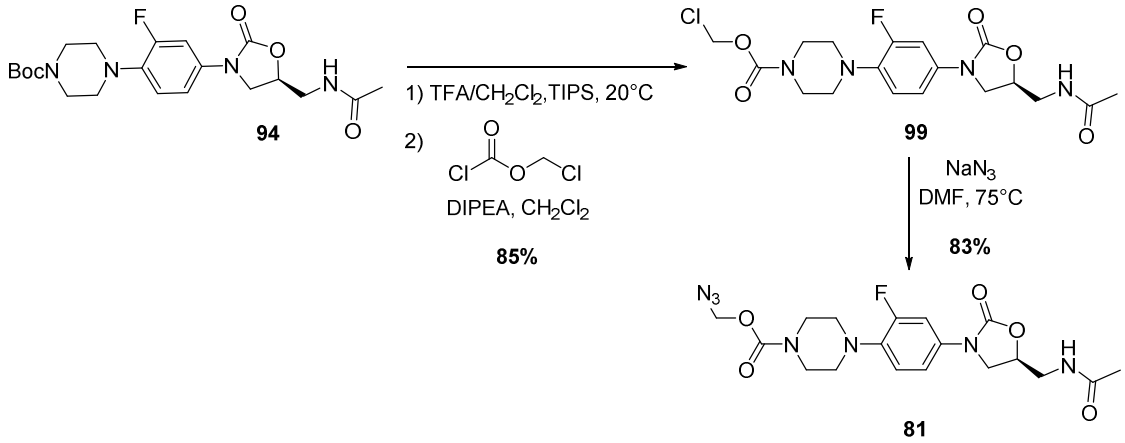


Schéma 10 : Synthèse de l'oxazolidinone **81**

A l'issue de ce travail nous avons synthétisé les six oxazolidinones **76**, **77**, **78**, **79**, **80** et **81** munies de bras de longueurs et de propriétés variables à partir de la morpholine **82** ou de la pipérazine **87** avec des rendements compris entre 7% (11 étapes) et 49% (5 étapes). Nous avons aussi préparé des quantités appréciables de linézolide **10** qui servira de référence de nos tests biologiques ultérieurs (**Schémas 11** et **12**).

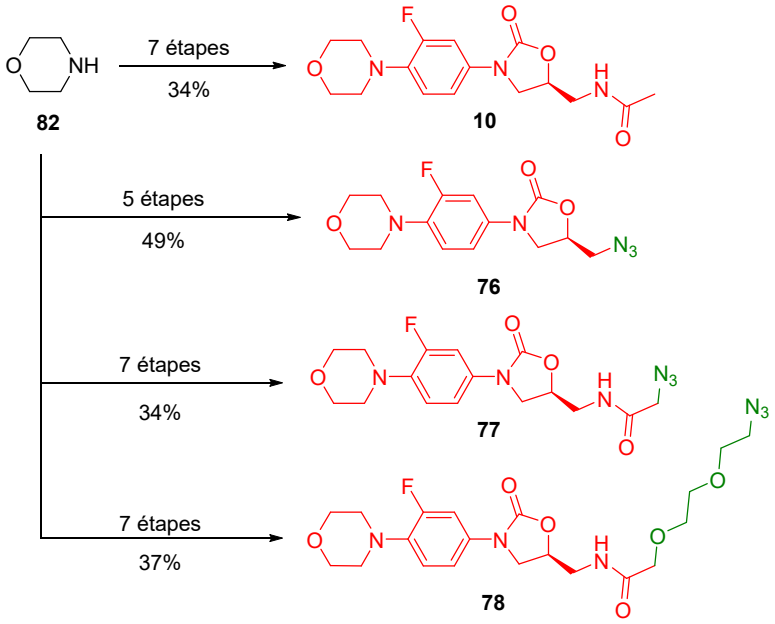


Schéma 11 : Récapitulatif des oxazolidinones **10**, **76**, **77** et **78**, synthétisés à partir de la morpholine **82**. L'oxazolidinone est colorée en rouge, le bras espaceur est coloré en vert.

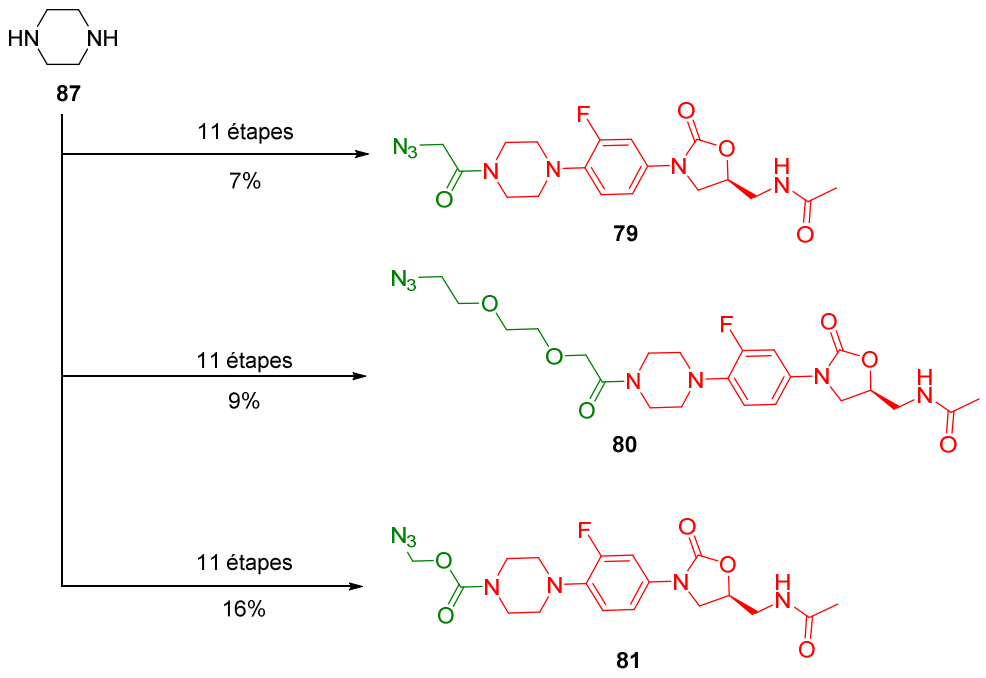


Schéma 12 : Récapitulatif des oxazolidinones **79**, **80** et **81** synthétisées à partir de la pipérazine **87**. L'oxazolidinone est colorée en rouge, le bras espaceur est coloré en vert.

Avec désormais dans les mains les vecteurs sidérophores d'une part et les blocs oxazolidinones-bras espaceurs d'autre part, nous avons ensuite conjugué ces partenaires pour obtenir nos chevaux de Troie potentiels.

B. Conjugaison entre vecteurs et blocs antibiotiques-bras espaceurs

Pour la conjugaison entre les vecteurs et les antibiotiques nous avons opté pour deux stratégies parallèles : 1-la ligation des entités chimiques par cycloaddition 1,3-dipolaire dite « chimie click » ou réaction de Huisgen, pour les vecteurs **64** et **65** munis de fonctions alcynes terminales ou 2- le couplage du vecteur à l'antibiotique par une simple liaison amide, méthode réservée à l'azotochéline **62** qui est le seul de nos sidérophores a posséder une fonction acide carboxylique terminale. Ces deux stratégies seront développées successivement dans la suite de ce manuscrit.

1. *Conjugaison par chimie click*

La chimie dite « click » regroupe quelques familles de réactions capables de coupler deux entités chimiques présentant chacune une fonction stable par elle-même, mais très réactive vis-à-vis de la fonction présente sur l'autre partenaire chimique de la réaction.[152] La réaction dite « click » la plus utilisée est sans doute la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azoture organique. Cette réaction peut avoir lieu thermiquement menant alors à des mélanges des régioisomères 1,5 **100** et 1,4 **101**. Cette réaction peut aussi être menée à température ambiante en présence d'une catalyse au cuivre(I) on parle alors de CuAAC (*Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*). Cette réaction fonctionne presque uniquement avec les alcynes terminaux et conduit exclusivement au régioisomère 1,4 **101** [152–154]. Il faut mentionner que la modification du métal utilisé pour catalyser la réaction peut aussi modifier les propriétés de la réaction. Ainsi des complexes de ruthénium peuvent catalyser la réaction sur des alcynes vrais mais aussi disubstitués, la RuAAC (*Ruthenium-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) conduit au régiosiomère 1,5 **100** de façon exclusive (**Schéma 13**).

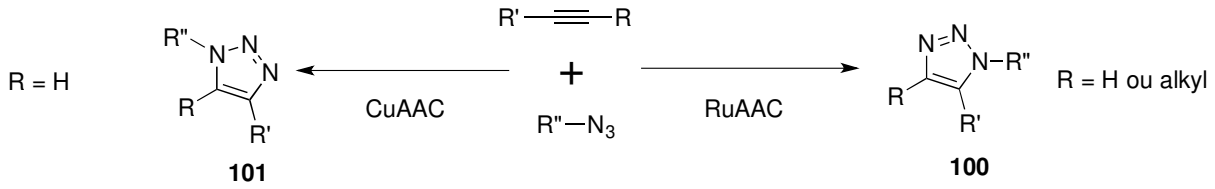


Schéma 13 : Réactions de chimie « click » CuAAC et RuAAC permettant d'obtenir des triazoles régioisomères.

Enfin, des versions de cette réaction de chimie « click » ne nécessitant pas de catalyses métalliques ont été développées au cours de la dernière décennie, notamment pour des applications dans le vivant où la présence de métaux peut être problématique ou difficile à mettre en œuvre.[155,156] Dans notre stratégie, nous souhaitions privilégier la formation du régiosiomère 1,4 **101** afin de « linéariser » au maximum notre conjugué et limiter ainsi d'éventuelles gênes stériques au cours des processus de reconnaissance et de transport. La stratégie CuAAC a donc été privilégiée. Dans ce but, les premières tentatives ont été effectuées dans un mélange *t*BuOH/H_2O, conditions décrites souvent comme universelles pour ce type de réaction. Dans notre cas ces conditions ne permettent pas de solubiliser parfaitement les vecteurs et les azotures d'oxazolidinones. Nous avons donc utilisé un

mélange THF/eau qui convenait plus à notre application. Le catalyseur utilisé est le cuivre(I) obtenu par la réduction *in situ* de sulfate de cuivre(II) en présence d'ascorbate de sodium. Il faut néanmoins préciser que dans notre cas, cette réaction « catalysée » a souvent requis des quantités stoechiométrique, voir supra-stoechiométriques pour conduire aux conjugués recherchés. Ainsi la réaction du vecteur MCV **71** avec les oxazolidinones **76**-**81** en présence de Cu(I) conduit aux conjugués correspondants, obtenus sous une forme où la fonction catéchol est protégée par le groupe diphényl-dioxole. Une fois ces conjugués protégés purifiés, ceux-ci sont déprotégés en présence de TFA et de triisopropylsilane dans un mélange éthanol/dichlorométhane. Afin de s'affranchir des étapes de purification de ces composés polaires sur silice démétallée, les bruts de réaction contenant les conjugués sont solubilisés dans du THF et l'ajout de cyclohexane permet de précipiter les conjugués qui sont récupérés par filtration. Ainsi les conjugués sidérophores-antibiotiques **102**, **103**, **104**, **105**, **106** et **107** ont pu être isolés avec des rendements de 25% à 73% sur deux étapes cumulées (**Schéma 14**).

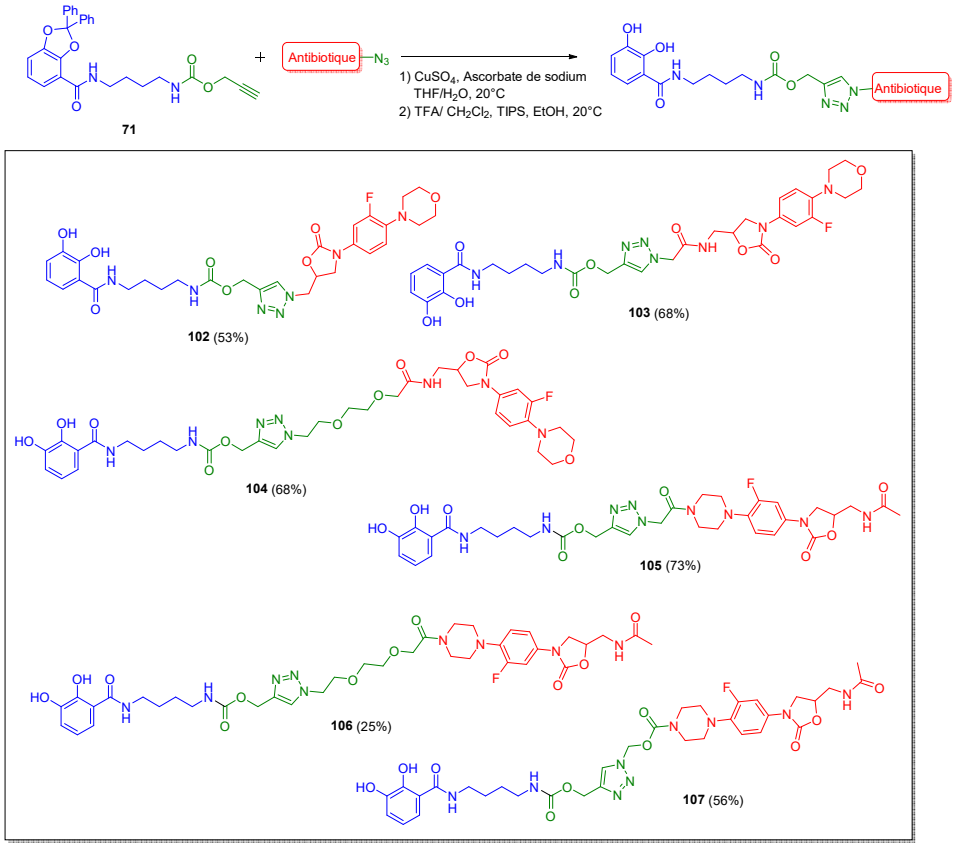


Schéma 14 : Structures des conjugués MCV-oxazolidinones **102** à **107**. Le sidérophore vecteur est représenté en bleu, le bras espaceur en vert, et l'antibiotique en rouge.

De la même manière, les oxazolidinones **76-81** ont été conjugués avec le vecteur BCV **75** pour conduire aux conjugués sidérophores-antibiotiques **108**, **109**, **110**, **111**, **112** et **113**. Les conjugués **108** à **113** ont été ainsi isolés avec des rendements compris entre 36% et 72% (**Schéma 15**).

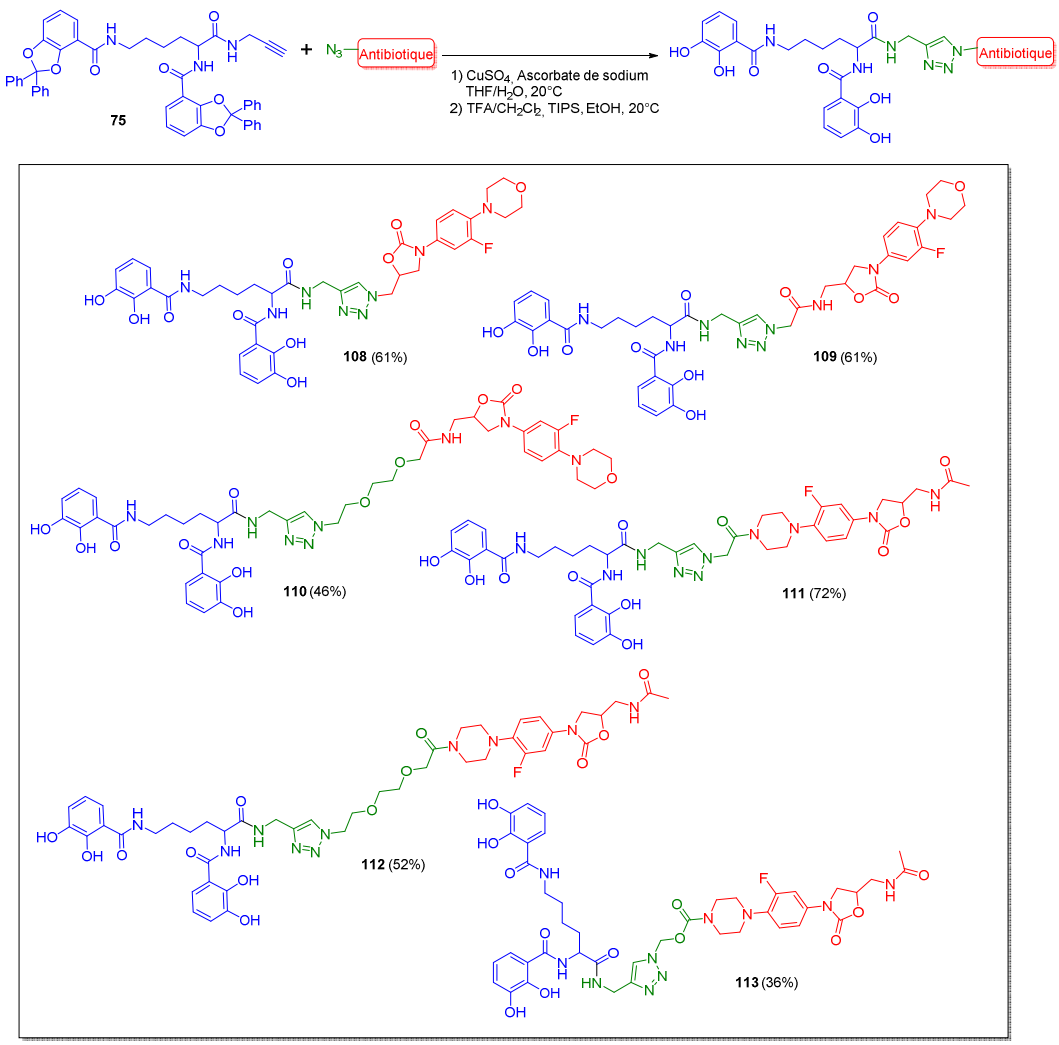


Schéma 15 : Structures des conjugués BCV-oxazolidinones **108** à **113**. Le sidérophore vecteur est représenté en bleu, le bras espaceur en vert, et l'antibiotique en rouge.

Le cycle triazole n'est pas « neutre » en milieu biologique. Ce motif chimique peut en effet être source de toxicité et il est aussi capable de servir de chélateur vis-à-vis de certains métaux biologiques. Aussi afin d'évaluer l'influence/l'importance de cet espaceur dans les propriétés biologiques que nous souhaitons étudier, nous avons choisi de synthétiser en parallèle une série de conjugués où le vecteur et l'oxazolidinone sont reliés par une simple liaison amide.

2. *Conjugaison par une liaison amide*

L'azotochéline **62** présente une fonction acide carboxylique terminale susceptible d'être couplée avec des oxazolidinones munies de fonctions amines. Dans ce contexte, les azotures d'oxazolidinones **76** à **81** dont nous disposons sont des produits de départ très intéressants. La fonction azoture pouvant être convertie aisément en amine primaire d'après les données de la littérature. Dans une première approche nous nous sommes intéressés à la série des oxazolidinones **79**, **80** et **81** dérivés de la pipérazine. La réduction de la fonction azoture des oxazolidinones **79-81** a été conduite soit dans des conditions de type Staudinger (triphénylphosphine/eau), soit par un boride de cobalt. Les amines **114** et **115** obtenues ont été directement mises en réaction avec le l'azotochéline protégée **74** en présence de HATU et de DIPEA pour conduire aux conjugués protégés **116** et **117** isolés respectivement avec un rendement de 63% et 45% sur 2 étapes. Il faut noter que pour l'un des azotures c'est la réaction de Staudinger qui a donné le meilleur résultat et pour l'autre la réduction par le boride de cobalt (**Schéma 16** et **Tableau 3**).

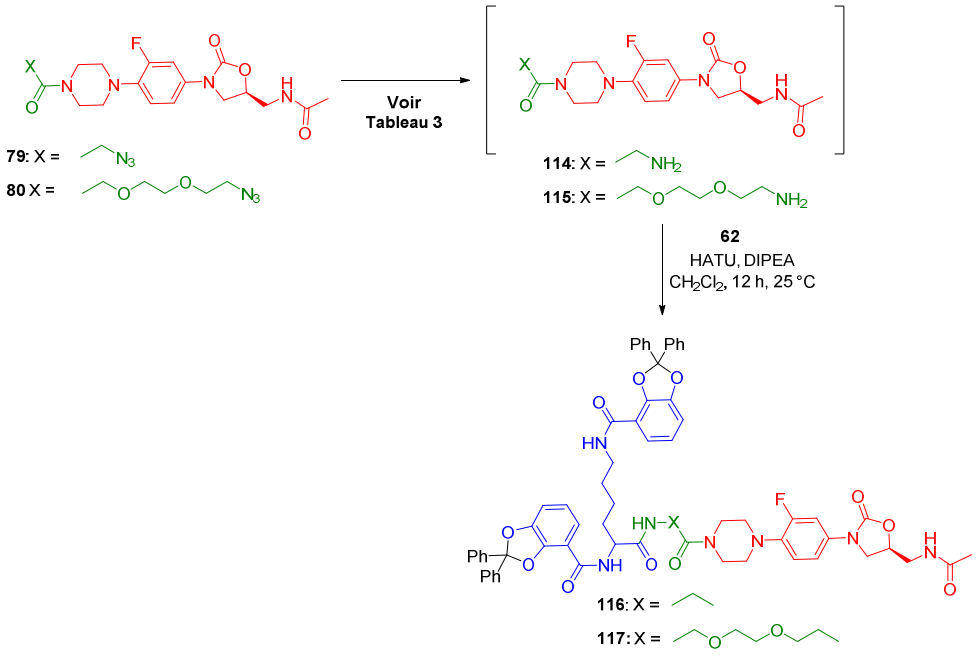


Schéma 16 : Synthèse et structures des conjugués BCV-oxazolidinones **116** et **117**. Le sidérophore vecteur est représenté en bleu, le bras espaceur en vert, et l'antibiotique en rouge.

Azoture	Réactif	Solvant	Température	Temps	Conjugué obtenu (Rdt%)
79	$NaBH_4/CoCl_2$	$MeOH/H_2O$	5 °C	30 min	**116** (traces)
79	PPh_3/DIPEA	THF	55°C	3 h	**116** (63%)
80	$NaBH_4/CoCl_2$	$MeOH/H_2O$	5 °C	10 min	**117** (45%)
80	PPh_3/DIPEA	THF	55 °C	1 h	**117** (26%)

Tableau 3 : Conditions de réduction des azotures **79** et **80** et conjugués obtenus après la réaction de couplage.

La réduction de l'azoture **81** n'a pas été tentée puisque la formation de l'amine primaire correspondante devrait conduire, d'après la littérature, à un hemi-aminal instable.[157] A l'heure d'écrire ces lignes cette partie du projet n'est pas achevée : les conjugués **116** et **117** n'ont pas encore été déprotégés en vue d'obtenir les conjugués sidérophores-antibiotiques utilisables dans les tests biologiques. L'honnêteté exige de préciser que dans les conditions décrites antérieurement pour la déprotection des groupes catéchols (TFA/dichlorométhane, TIPS, éthanol), nous avons rencontré des problèmes de dégradation des conjugués. La mise au point de nouvelles conditions de déprotection, notamment fondées sur l'hydrogénolyse, sont à l'étude au laboratoire. L'absence de ces deux conjugués n'a cependant pas été un frein à l'évaluation des autres chevaux de Troie potentiels.

IV. Propriétés biologiques des conjugués MCV-oxazoldidinones et BCV-oxazolidinones

A l'image de ce qui a été mené sur les vecteurs seuls, nous avons voulu connaître les propriétés biologiques de nos conjugués.

Dans le contexte d'une stratégie de type cheval de Troie à visée thérapeutique c'est évidemment l'activité antibiotique qui a focalisé toute notre attention dans un premier temps. Ces tests ont été menés, dans un premier temps, par diffusion dans des gels d'agar sur boîtes de Pétri. Si des halos d'inhibition plus ou moins net étaient visibles, il nous a paru opportun de revenir à la technique de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par

dilution en cascade (protocole CLSI) considérée comme plus fiable. Ces premières expériences ont été réalisées sur la souche PAO1 (souche sauvage) de *P. aeruginosa* en milieu Mueller-Hinton (MH), considéré comme riche en fer et en milieu CAA, plus appauvri en ce métal. Afin de vérifier si ces conjugués empruntent la voie entérobactine, les expériences ont été menées en parallèle sur une souche (PAO1*ΔpfeA*) n'exprimant pas le transporteur PfeA spécifique de ce sidérophore chez *P. aeruginosa*. Le linézolide que nous avons synthétisé et les vecteurs MCV **65** et BCV **64** sont utilisés comme références (**Tableaux 4** et **5**).

Toutes nos expériences confirment que le linézolide **10** n'a que peu, ou pas, d'activité antibiotique contre *P. aeruginosa* dans la gamme de concentration testée. Compte tenu des problèmes de solubilité de cet antibiotique il n'a pas été possible d'utiliser des concentrations plus élevées que 1024 µM. Il convient d'ailleurs de mentionner ici que nos conjugués antibiotiques ne sont pas non plus des modèles de solubilité en milieu physiologique dans les conditions du test, malgré l'utilisation de solutions mères dans le DMSO ou de ou de soude 1N pour préparer les dilutions en cascade. Les vecteurs MCV **65** et BCV **64** ont une activité antibiotique intrinsèque. Nos expériences antérieures menées au cours de l'évaluation biologique des vecteurs montraient plutôt un effet pro-bactérien à des concentrations moindres (voir **Figures 51** et **52**, p. 82 et 83). L'activité antibactérienne des chélateurs de fer est un phénomène décrit et suggéré dans la littérature comme une approche thérapeutique.[158] Dans ce contexte, les chélateurs peuvent être utilisées seuls ou en synergie avec des antibiotiques dont ils parviennent à potentialiser l'action.[159,160] Ne présentent donc d'intérêt majeur dans le cadre d'une approche de type cheval de Troie, que les conjugués présentant des activités antibiotiques supérieures à celle du vecteur ou de l'antibiotique testés isolément.

Dans le cas des conjugués MCV-oxazolidinones **102** à **107**, le composé **105** apparaît comme très prometteur puisqu'il présente une CMI de 128 µM en milieu CAA. Cette CMI s'accroît à 512 µM en milieu Mueller-Hinton. Il y a donc, pour cette molécule, une activité antibiotique distincte des propriétés de chélation, qui est potentialisée en milieu appauvri en fer. Ce résultat suggère que ce conjugué pourrait bien être importé dans *P. aeruginosa* par un des systèmes de transport de fer exprimés en carence de fer. L'expérience menée sur la souche PAO1*ΔpfeA* permet d'exclure que ce transport soit lié à celui de l'entérobactine puisque la CMI obtenue, 128 µM, est identique à celle évaluée sur la souche non-mutée dans

cette voie. Ce résultat confirme les données fonctionnelles et structurales antérieures obtenues sur le vecteur MCV **65** et sur l'aminochéline **63** qui a servi de modèle pour le développement de cette approche.

Dans le cas des conjugués BCV-oxazolidinones **108** à **113**, à part le composé **108**, tous les autres conjugués présente une CMI de 128 µM en milieu CAA. Cette CMI s'accroît à 512 µM en milieu Mueller-Hinton. Il y a donc, comme pour les conjugués précédents, une activité antibiotique distincte des propriétés de chélation et qui s'accroit en milieu carencé en fer. Cependant les CMI obtenues sur une souche PAO1*ΔpfeA*, et qui sont identiques à celles décrites sur la souche sauvage, semblent montrer que le transporteur PfeA n'est pas nécessaire à cette activité. L'activité antibiotique observée pourrait être le résultat du transport de nos molécules par le transporteur de nature indéterminé évoqué plus haut. Ce dernier, en l'absence de PfeA pourrait promouvoir l'accumulation des conjugués dans les compartiments internes de la bactérie (

Tableau 5).

Molécules testées	CMI (µM)		
	PAO1 (CAA)	PAO1 (MH)	PAO1Δ*pfeA* (CAA)
10	1024	>1024	1024
MCV 65	256	512	256
102	256	512	256
103	256	512	256
104	256	512	256
105	**128**	**512**	**128**
106	256	512	256
107	256	1024	256

Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des conjugués MCV-oxazolidinones **102** à **107** mesurées dans le milieu Mueller-Hinton (MH) et dans le milieu CAA sur les souches PAO1 et PAO1Δ*pfeA*. Les valeurs de CMI sont une moyenne sur trois expériences indépendantes. Le sidérophore vecteur est représenté en bleu, le bras espaceur en vert, et l'antibiotique en rouge.

Molécules testées	CMI (µM)		
	PAO1 (CAA)	PAO1 (MH)	PAO1Δ*pfeA* (CAA)
10	1024	> 1024	1024
64	256	512	128
108	128	512	128
109	128	256	128
110	128	256	128
111	128	256	128
112	128	256	128
113	128	256	128

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des conjugués BCV-oxazolidinones **108** à **113** mesurées dans le milieu Mueller-Hinton (MH) et dans le milieu CAA sur les souches PAO1 et PAO1Δ*pfeA*. Les valeurs de CMI sont une moyenne sur trois expériences indépendantes. Le sidérophore vecteur est représenté en bleu, le bras espaceur en vert, et l'antibiotique en rouge.

Avant de poursuivre plus loin la description des propriétés biologiques, il est nous paraît nécessaire de revenir sur le cas particuliers des conjugués **107** et **113** présentant un bras espaceur atypique incluant un motif [(1,2,3-triazol-1-yl) méthyl]-carbamate totalement inédit dans des approches de type cheval de Troie fondées sur les sidérophores. Si nous nous sommes beaucoup focalisé depuis le début de ce manuscrit sur l'importance des vecteurs et de l'antibiotique dans l'activité biologiques des conjugués finaux, la nature de l'espaceur liant les deux entités chimiques est elle aussi prépondérante. L'interaction entre l'antibiotique et sa cible biologique peut être affectée, et même affaiblie, si la molécule active est liée à un autre composé. Le cheval de Troie idéal est donc constitué d'un vecteur bien reconnu et transporté, d'un antibiotique efficace et enfin d'un bras espaceur stable dans le milieu extracellulaire et clivable dans le milieu intracellulaire, soit par une enzyme endogène intracellulaire soit par des conditions particulières recontrées dans les compartiments internes de la bactérie. Ces chevaux de Troie existent, ce sont les sidéromycines naturelles comme l'albomycine ou la microcine E492 (voir **Figure 36** et **37**) que nous avons décrits dans l'introduction. Dans ces composés le clivage du conjugué se déroule dans les compartiments internes du microoganisme grâce à des enzymes de type hydrolase. Ces conjugués ont été optimisés au cours de l'évolution pour atteindre cette perfection dans le mode d'action. Malheureusement, à ce jour, très peu de ces conjugués « idéaux » ont été décrits après synthèse intégrale par des chimistes. La majorité des sidéromycines artificielles décrites jusqu'ici se contentant de lier le vecteur et l'antibiotique par des bras espaceurs stables *in vivo*, misant sur la permissivité structurale de la cible biologique. Si cette approche s'est révélée fructueuse pour l'inhibition de la synthèse de peptidoglycane par des β-lactames vectorisés par des analogues de sidérophores,[125,129,132] la vectorisation efficace d'antibiotique à cibles cytoplasmiques reste très peu documentée dans la littérature.[121,128,145] Conscient que le développement de nouveaux bras espaceurs clivables sélectivement est la clé de voûte d'une plus large utilisation de la stratégie du cheval de Troie, quelques groupes à travers le monde se sont intéressés à cette problématique. A ce jour les résultats restent extrêmement mitigés car ce type de bras clivable est rare pour les Gram-négatifs en général et inexistants contre *P. aeruginosa* plus particulièrement. Dans ce contexte nous avons souhaité contribuer à cet effort de recherche, risqué, mais présentant un fort potentiel d'application. Dans ce contexte et en nous inspirant des données issus des travaux du Pr. Winssinger à Strasbourg, qui a développé le groupe Azoc (azidométhyl carbamate) permettant de protéger une fonction amine sous la forme d'un carbamate de (1,2,3-triazol-1-yl) méthyl.[157] Dans cette approche le carbamate peut ensuite

être clivé par une réaction de Staudinger qui régénère l'amine primaire. En parallèle les données issues des travaux de Sharpless et collaborateurs[161] montraient que des motifs de type (1,2,3-triazol-1-yl) méthyl-ester pouvaient être clivés dans différentes conditions basiques pour régénérer le triazole libre (**Schéma 17**).

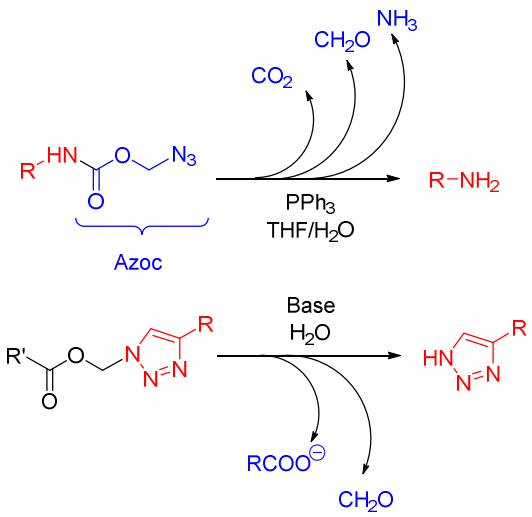


Schéma 17 : Clivage de groupes fonctionnels incluant un motif [(1,2,3-triazol-1-yl)] méthyl-ester ou [(1,2,3-triazol-1-yl)] méthyl-carbamate.

Si la stabilité d'un carbamate et celle d'un ester en milieu biologique n'ont rien en commun il nous a semblé intéressant de rassembler ces deux approches et de tenter le développement d'un bras espaceur utilisant cette réactivité des 1-méthyl-1*H*-1,2,3-triazole en tablant sur le fait qu'une hydrolase endogène pourrait hydrolyser ce bras en libérant l'antibiotique (**Figure 57**).

Les activités biologiques de conjugués **107** et **113** fondés sur ce type d'espaceurs ne semblent pas montrer que cette approche fonctionne avec l'efficacité recherchée sur *P. aeruginosa*. Les CMI semblent montrer que l'espaceur est stable même une fois le conjugué à l'intérieur de la bactérie.

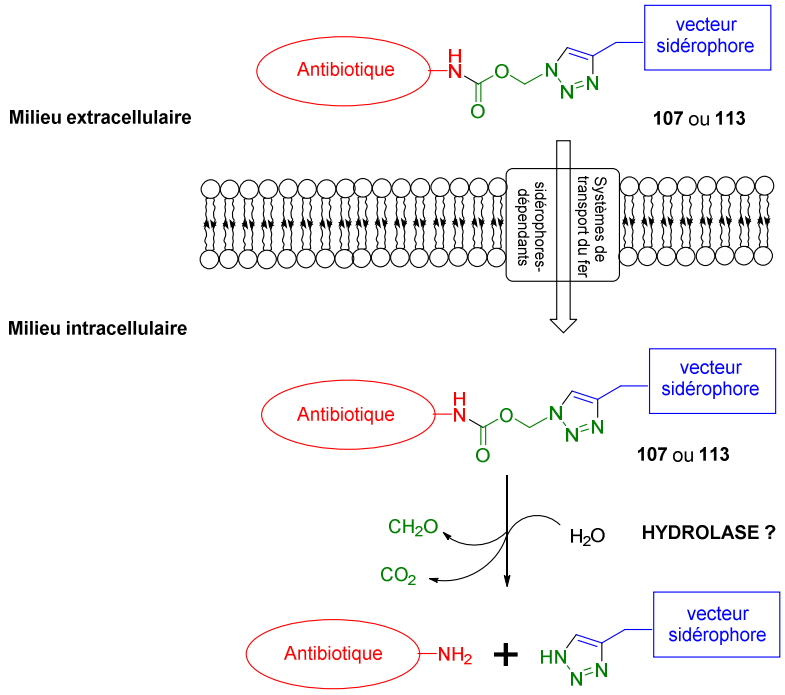


Figure 57 : Transport et clivage potentiel des conjugués **107** et **113**.

Après cette parenthèse concernant plus spécifiquement les conjugués **107** et **113**, il convient de revenir sur les CMI obtenues pour l'ensemble des conjugués et d'étudier les propriétés biologiques de ces composés dans le cadre plus global des voies d'assimilation du fer exprimées par *P. aeruginosa*. Les conjugués les plus prometteurs restent des antibiotique en définitive peu performants au regard de ceux utilisés actuellement en thérapie contre *P. aeruginosa*. Néanmoins, nous décrivons ici les oxazolidinones les plus efficaces décrites à ce jour sur ce microorganisme. Le mécanisme d'action de ces composés restait à étudier. Les données obtenues en utilisant notamment la souche PAO1*ΔpfeA* semblent indiquer que les conjugués MCV n'utilisent pas le système entérobactine ce qui est conforme aux données que nous avions obtenus sur les vecteurs mono-catécholés seuls. Par contre le BCV **64** et l'azotochéline **62** avaient montré des capacités à promouvoir le transport du fer notamment par cette voie de transport. Ces mêmes chélateurs avaient aussi montré qu'ils sont capables d'induire l'expression de la voie entérobactine-dépendante. Ces données antérieures semblaient discordantes avec les CMI obtenues sur PAO1*ΔpfeA*. Ce différentiel nous interroge sur la capacité réelle des conjugués BCV-antibiotiques à pouvoir entrer dans la bactérie.

Nous avons tenté de vérifier la capacité des conjugués BCV-oxazolidinones à promouvoir l'assimilation du ^{55}Fe. Malheureusement, quelles que soient les conditions

testées, nous avons rencontré des problèmes de précipitation importantes des chélates ferriques conduisant à un rapport signal sur bruit significatif ce qui rend les expériences inexploitables.

V. Epilogue

Des résultats très récents ayant été apporté sur notre sujet par les biologistes il me semblait nécessaire de les présenter et de les discuter avant de conclure sur cette partie du projet de thèse. Nous avons mentionné au début de ce chapitre que la voie de transport entérobactine-dépendante est très bien décrite chez *E. coli* et chez les *Salmonella*, mais mal connue chez *P. aeruginosa*. Au départ de ce projet nous avions fondé notre approche sur l'hypothèse que les mécanismes de transport de ce sidérophore très commun devaient être similaires chez les deux microogranismes. Dans cette optique l'entérobactine ayant une destination purement cytoplasmique chez *E. coli* nous en avons déduit que des vecteurs mimant ce sidérophores seraient en mesure d'atteindre le cytoplasme avec un antibiotique comme les oxazoldinones. Les travaux des biologistes de l'équipe ont permis de montrer que notre postulat de départ était faux puisque contrairement à ce que nous supposions, la voie de l'entérobactine s'arrête dans le périplasme : après l'import par le transporteur PfeA, une estérase périplasmique, la protéine PA2689 pourrait être à l'origine d'une hydrolyse du motif trilactone. L'estérase PA2689 présentant un fort taux d'homologie avec la protéine iroE des *Salmonella* responsable de l'hydrolyse de la salmochéline, un sidérophore possédant le même motif trilactone que celui présent dans l'entérobactine (voir **Figure 46**, p 73).[162] La structure de cette protéine a d'ailleurs été résolue très récemment par nos collaborateurs de l'équipe du Pr Jim Naismith (St-Andrews University, Royaume-Uni). Les biologistes de l'équipe ont aussi commencé à étudier la régulation de l'expression du système entérobactine chez *P. aeruginosa*. Dans ce contexte ils ont découvert que l'expression des gènes codants pour les protéines impliquées dans la voie entérobactine sont induits grâce à un système à deux composants appelés PfeS et PfeR localisé dans le périplasme. Dans ce type de système de régulation, PfeS sert de senseur. Cette protéine, en présence d'un stimulus chimique présent dans le périplasme, en général le sidérophore, active par phosphorylation l'effecteur PfeR qui induit la transcription des gènes sous contrôle dont celui de PfeA (**Figure 58**).

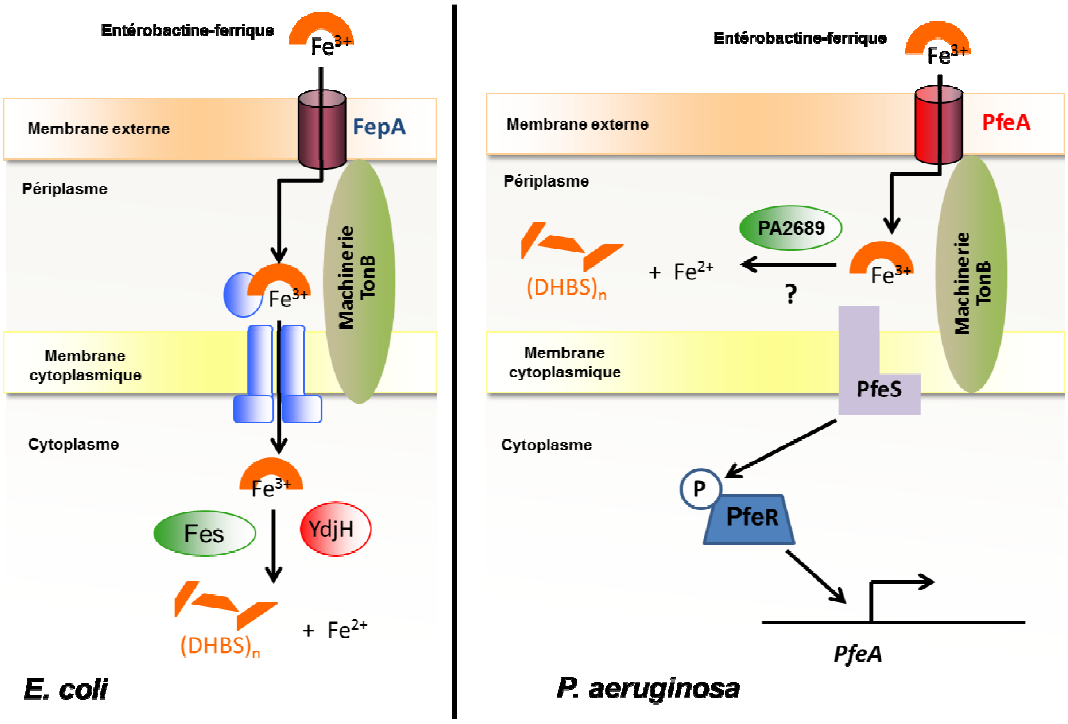


Figure 58 : Comparaison des voies de transport de fer entérobactine-dépendantes chez *E. coli* et chez *P. aeruginosa*.

Les expériences de transport de ^{55}Fe n'ayant pas pu être menées à bien pour des raisons de solubilité. Nous pensions nous appuyer sur les données de protéomique pour évaluer de façon indirecte la capacité des conjugués BCV-oxazolidinones sont capables de rejoindre les compartiments internes de la bactérie pour induire l'expression de la voie entérobactine.

Les études protéomiques menées en collaboration avec l'équipe de Pr. Dirk Bumann (Biozentrum, Bâle, Suisse) ont montrés que lorsque les bactéries sont cultivées en présence de 100 µM des conjugués BCVL5 **112** et BCVL6 **113** ces derniers sont capables d'induire l'expression de PfeA mais de façon bien moindre que le vecteur BCV **64** seul. En outre les deux conjugués n'ont pas d'effet détectable sur l'induction d'autres protéines de la voie entérobactine comme l'estérase PA2689 ou le facteur PfeR. Seul le vecteur BCV **64** semble induire l'estérase, son effet sur l'expression de PfeR n'étant pas détectable. A ce jour, nous ne savons pas qui de l'entérobactine, ou de l'un de ses produits d'hydrolyse, est la molécule reconnue par PfeS et capable d'induire l'expression de la voie entérobactine grâce au système à deux composants PfeS/PfeR. Le vecteur BCV **64** semble mimer très imparfaitement ce composé et la conjugaison des oxazolidinones semble anéantir totalement cette capacité.

VI. Conclusion

Dans cette partie du projet nous avons évalué les capacités de deux sidérophores d'*A. vinelandii* l'aminochéline **63** et l'azotochéline **62** à être utilisés par *P. aeruginosa*. Nous avons montré que ces deux sidérophores exogènes et les deux vecteurs dont ils sont inspirés, MCV **65** et BCV **64**, stimulent la croissance bactérienne. L'azotochéline **62** et le vecteur BCV **64** sont de plus capables de transporter le ^{55}Fe(III) en utilisant le système de transport dépendant de l'entérobactine, un sidérophore non produit par *P. aeruginosa*. Une autre voie de transport semble néanmoins impliquée dans le transport des sidérophores bis-catécholés **62** et **64** restant à découvrir. La voie permettant l'assimilation des sidérophores mono-catécholés **63** et **65** n'a par contre pas pu être définie même si la contribution du système entérobactine peut être exclu compte tenu de nos données. Les vecteurs mono-catécholé **65** et bis-catécholé **64** présentent donc un potentiel prometteur pour pouvoir adresser efficacement des antibiotiques à *P. aeruginosa* dans le cadre d'une approche de type cheval de Troie. Dans ce contexte nous avons conjugués ces vecteurs, présentant une fonction alcyne terminale, avec divers oxazolidinones munies de fonctions azotures, en utilisant la chimie « click ». Six conjugués MCV-oxazolidinones **102** à **107** et six conjugués BCV-oxazolidinones **108** à **113** ont ainsi été obtenus. Ces composés ont ensuite été évalués pour leurs propriétés antibiotiques sur *P. aeruginosa* dans des milieux présentant des concentrations en fer variables. Une grande partie des conjugués testés sont plus actifs que le linézolide, une oxazolidinone de référence. Il s'agit même des oxazolidinones les plus actives décrites sur *P. aeruginosa* même si les meilleures CMI restent à 128 µM. Ces conjugués ne sont donc pas encore au niveau des antibiotiques actuellement utilisés en thérapie mais ont néanmoins permis de valider notre approche. L'optimisation de ces conjugués nécessite de comprendre l'origine de ces activités réelles mais perfectibles. Les biologistes de notre équipe ne sont pas parvenus à montrer en utilisant le ^{55}Fe que ces conjugués sont capables de traverser l'enveloppe comme les vecteurs dont ils sont dérivés. Les expériences de protéomique ont cependant mis en évidence que les conjugués BCVL5 **112** et BCVL6 **113** n'ont qu'une faible capacité à induire l'expression des protéines de la voie entérobactine alors que le vecteur BCV **64** dont ils dérivent induit significativement ce système. Ce résultat peut s'expliquer soit par une efficacité restreinte de l'import des conjugués au travers de la membrane externe, soit par l'incapacité des systèmes

de régulation de la voie entérobactine à reconnaître le vecteur BCV **64** lorsqu'il est couplé à une autre entité chimique. Afin de vérifier cette hypothèse des analogues **116** et **117** des conjugués BCVL5 **112** et BCVL6 **113** où le vecteur est lié à l'antibiotique par une liaison amide, et non par un espaceur triazole, ont été synthétisés sous forme protégée. Au moment d'écrire ce manuscrit ces composés n'ont été ni déprotégés, ni testés.

Si les différents conjugués entre sidérophores catécholés et oxazolidinones n'ont pas pour l'instant conduit à des antibiotiques performants contre *P. aeruginosa*, ils ont été l'occasion pour les biologistes de notre équipe d'étudier la voie de transport du fer entérobactine-dépendante, peu décrite chez *P. aeruginosa*. Dans ce contexte, les vecteurs et conjugués synthétisés durant ce travail se sont révélés des outils moléculaires particulièrement utiles dans l'élucidation du mécanisme de transport dépendant de ce sidérophore exogène. Il a ainsi été montré que la voie de transport entérobactine-dépendante fonctionne de façon complètement différente chez *E. coli* et *P. aeruginosa*. En effet chez ce dernier microoganisme, l'entérobactine une fois entrée par le transporteur de membrane externe spécifique PfeA et probablement hydrolysée par une estérase, la protéine PA2689. Chez *P. aeruginosa* la dégradation du sidérophore et le relargage du fer aurait donc lieu dans le périplasme et non dans le cytoplasme, comme chez *E. coli*. Ce résultat montre donc que si des conjugués sidérophores catécholés-antibiotiques pourraient atteindre le cytoplasme chez *E. coli*, ces mêmes composés auraient par contre un destin périplasmique dans *P. aeruginosa*. Ainsi dans l'état actuel de nos connaissances, les sidérophores et vecteurs mono- et bis-catécholés semblent restreints chez *P. aeruginosa* à la vectorisation d'antibiotiques à cibles périplasmiques comme les β-lactames par exemple.

VECTORISATION D'ANTIBIOTIQUES PAR LA PYOCHELINE

La pyochéline est un sidérophore particulièrement étudié par notre laboratoire. La vectorisation d'antibiotiques par ce sidérophore est un sujet récurrent dans notre équipe depuis plus d'une dizaine d'année. La vectorisation de nouvelles familles d'antibiotiques par ce sidérophore a été donc naturellement intégré au projet dans la continuité des résultats obtenus par les chercheurs précédents.

I. Données antérieures obtenues au laboratoire

Les premiers essais, dans notre laboratoire, de vectorisation d'antibiotiques par la pyochéline **23** ont été effectués, il y a près de 10 ans, par le Dr. Freddy Rivault lors de son stage postdoctoral.[122] Dans l'approche qui avait été développée alors, l'analogue **118** de la pyochéline avait été fonctionnalisée sur sa position C5 par une fonction amine car d'après nos données, cette position n'avait pas d'influence sur la complexation du fer(III). Cette fonction avait permis de conjuguer la norfloxacine, un antibiotique de la famille des fluoroquinolone. Le Dr. Cobessi a résolu la structure tridimensionnelle du transporteur de membrane externe, spécifique de la pyochéline: FptA.[90] La résolution de cette structure a permis de comprendre qu'il existe une interaction stérique défavorable entre le sidérophore et son transporteur dans le cas d'une substitution imposante sur la position C5. Sur la base de modélisations effectuées à partir de la structure de FptA, un nouvel analogue de la pyochéline, le composé **119** a été conçu puis synthétisé par le Dr. Sabrina Noël lors de sa thèse.[163] Cet analogue est fonctionnalisé sur sa position N3" par une extension propylamine (**Figure 59**).

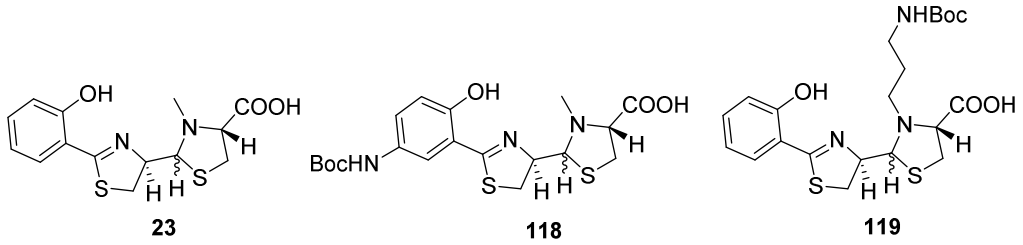


Figure 59 : Structure de la pyochéline **23**, de l'analogue **118** fonctionnalisé en position C5 et de l'analogue **119** fonctionnalisé en N3"

Les propriétés biologiques de l'analogue fonctionnalisé **119** avaient été évaluées. Des expériences de liaison au récepteur FptA, spécifique de la pyochéline ont été réalisées en utilisant le ^{55}Fe. Ainsi le chélate ferrique de l'analogue **119** présente un K_i de 37,4 nM, contre 3,6 nM pour la pyochéline ferrique. Même si il existe un facteur 10 entre les deux valeurs, cette affinité reste dans les ordres du nanomolaire ce qui reste très favorable dans le cadre d'une approche cheval de Troie.[121] En parallèle, il avait été montré que l'analogue **119** est aussi capable de transporter le ^{55}Fe avec une efficacité proche de celle du sidérophore naturel dans *P. aeruginosa* et que ce transport était dépendant de la présence du transporteur FptA et de la force proton motrice.[121] Une étude par modélisation informatique (*docking*) suggère que la pyochéline fonctionnalisée **119** parvient à occuper le même site de liaison hydrophobe que celui utilisé par la pyochéline **23**.[121] Cette étude montre également que l'extension aminée se déploie dans une poche s'évasant vers le milieu extracellulaire ce qui limite les conflits stériques avec le transporteur si des substituants volumineux sont greffés sur ce type de vecteurs. (**Figure 60**)

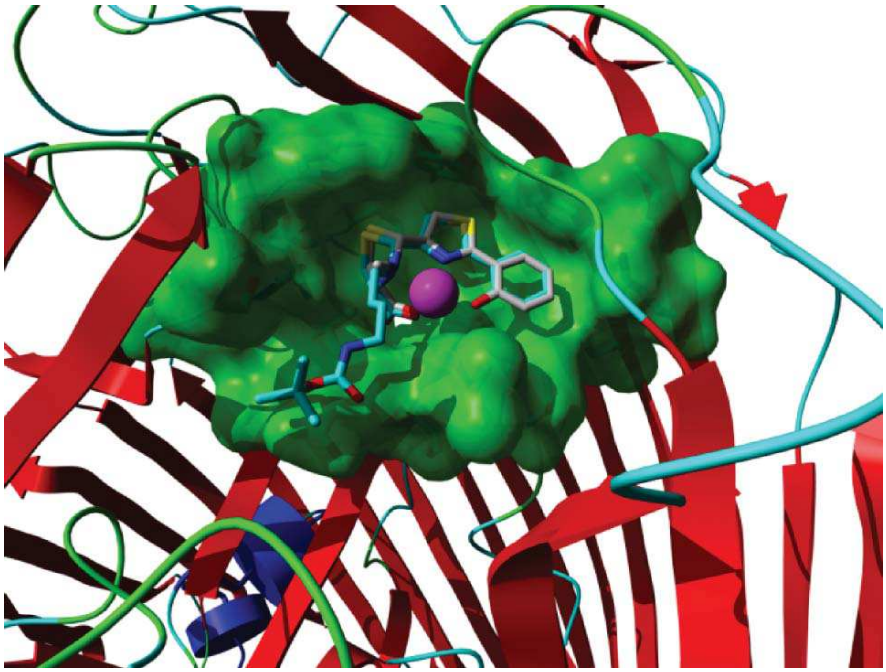


Figure 60 : Modélisation de la pyochéline fonctionnalisée **119** (bleu cyan) et de la pyochéline **23** (gris) dans le site de liaison du récépteur FptA de la pyochéline. L'ion Fe(III) est représenté par la sphère mauve.

L'ensemble de ces données biologiques préliminaires montraient que l'analogue **119** de la pyochéline pouvait être utilisé comme vecteur pour adresser des antibiotiques à *P.*

aeruginosa dans le cadre d'une stratégie de type cheval de Troie. Ainsi des conjugués **39** à **44** entre la pyochéline fonctionnalisée en N3" **119** et des fluoroquinolones (norfloxacine, ofloxacine, ciprofloxacine) ont été synthétisés au laboratoire par le Dr. Sabrina Noël durant sa thèse (**Figure 40**, p. 63).[121] Comme nous avons pu le voir dans l'introduction de ce manuscrit ces conjugués n'ont pas démontré d'activités supérieures à celle des antibiotiques libres. Face à ces résultats, l'équipe a voulu valider cette approche en greffant un fluorophore de type NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diaxole) dont la géométrie est très similaire à celle des fluoroquinolones. La résolution de la fluorescence permet en effet d'observer des effets à des concentrations plus faibles que celle employées avec les conjugués de fluoroquinolones. Les conjugués pyochéline-NBD **120** et **121** ont ainsi été synthétisés (**Figure 61 A.**). L'observation par microscopie de fluorescence de culture de *P. aeruginosa* en présence des conjugués **120** et **121** montre un marquage fluorescent des cellules bactériennes (**Figure 61 B.**).

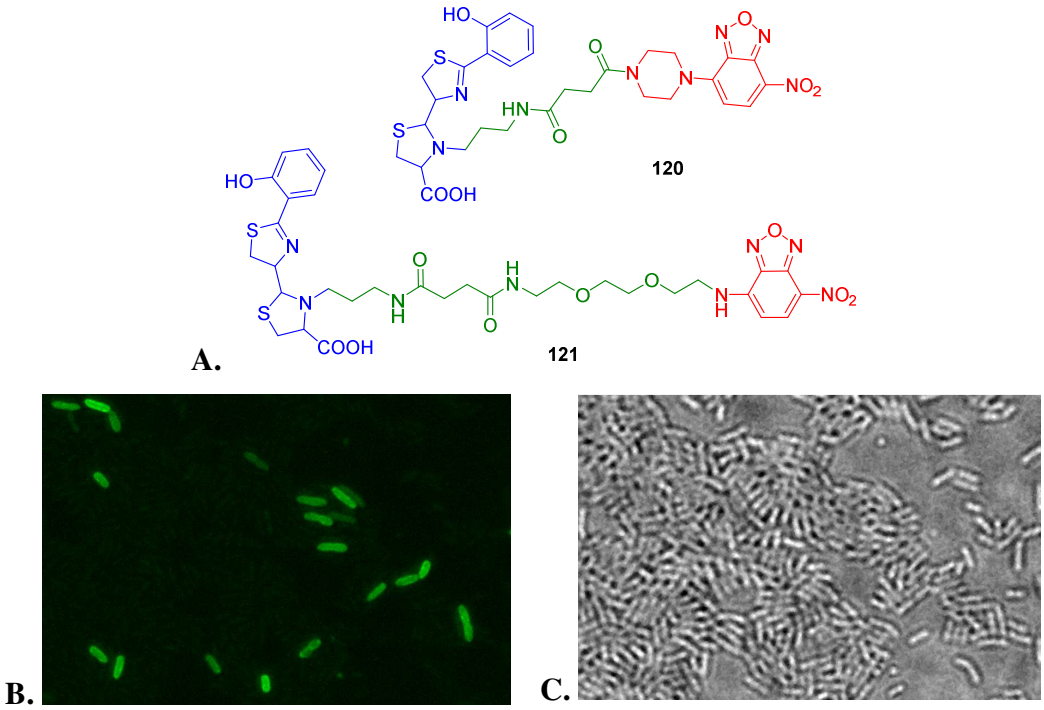


Figure 61 : A. Structures des conjugués pyochéline–NBD **120** et **121** (le sidérophore est représenté en bleu, le bras espaceur en vert et le fluorophore en rouge). **B.** Vue par microscopie à épifluorescence de la souche PAD07 de *P. aeruginosa* en présence du conjugué **120** (jeu de filtres : exc. 472 ± 30 nm/em, 520 ± 30 nm/dichroïque 502-730 nm). **C.** Vue en lumière normale de la même zone de la culture de PAD07.

Ce marquage fluorescent n'est observé que dans les souches où le transporteur de membrane externe FptA est exprimé.[163] Ce qui suggère que les conjugués **120** et **121** sont bien capables de rentrer dans la bactérie en utilisant la voie de transport de fer pyochéline-dépendante. Les tentatives préliminaires de fractionnement cellulaire sur des bactéries ayant poussé en présence des conjugués **120** et **121** ont mis en évidence la présence de fluorescence dans les membranes, dans le périplasme et dans le cytoplasme (Dr. Laurent Guillon, résultats non publiés). Ces résultats valident notre approche utilisant des analogues de la pyochéline comme vecteurs. Les résultats décevants obtenus avec les fluoroquinolones montrent qu'il convient de reprendre cette stratégie mais en tentant de rendre les conjugués plus solubles soit en modifiant l'espaceur, soit la nature de l'antibiotique vectorisé. Afin d'améliorer la solubilité des conjugués l'utilisation de différents bras espaceurs sera étudié. Nous nous intéresserons notamment au couplage de la pyochéline avec des antibiotiques par chimie « click ». Ceci permettra de créer un espaceur muni d'un motif 1,2,3-triazole, qui pourrait améliorer la solubilité de nos conjugués dans les milieux biologiques. Cette approche nécessite le développement de vecteurs analogues de la pyochéline, susceptibles d'être engagés dans des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire.

II. Synthèse des vecteurs pyochélines

Notre stratégie consiste à synthétiser de nouveaux conjugués entre la pyochéline fonctionnalisée sur l'amine N3" et des antibiotiques en utilisant une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre des motifs alcyne vrai et des fonctions azotures, indifféremment présentes sur le vecteur ou sur l'antibiotique. Au vu des propriétés biologiques relevées pour le vecteur **119**, les analogues de pyochéline **122**, **123** et **124** recherchés sont basés sur ce vecteur (**Figure 62**).

La synthèse de l'analogue **119**, structure de base de notre approche, ainsi été notre premier objectif.

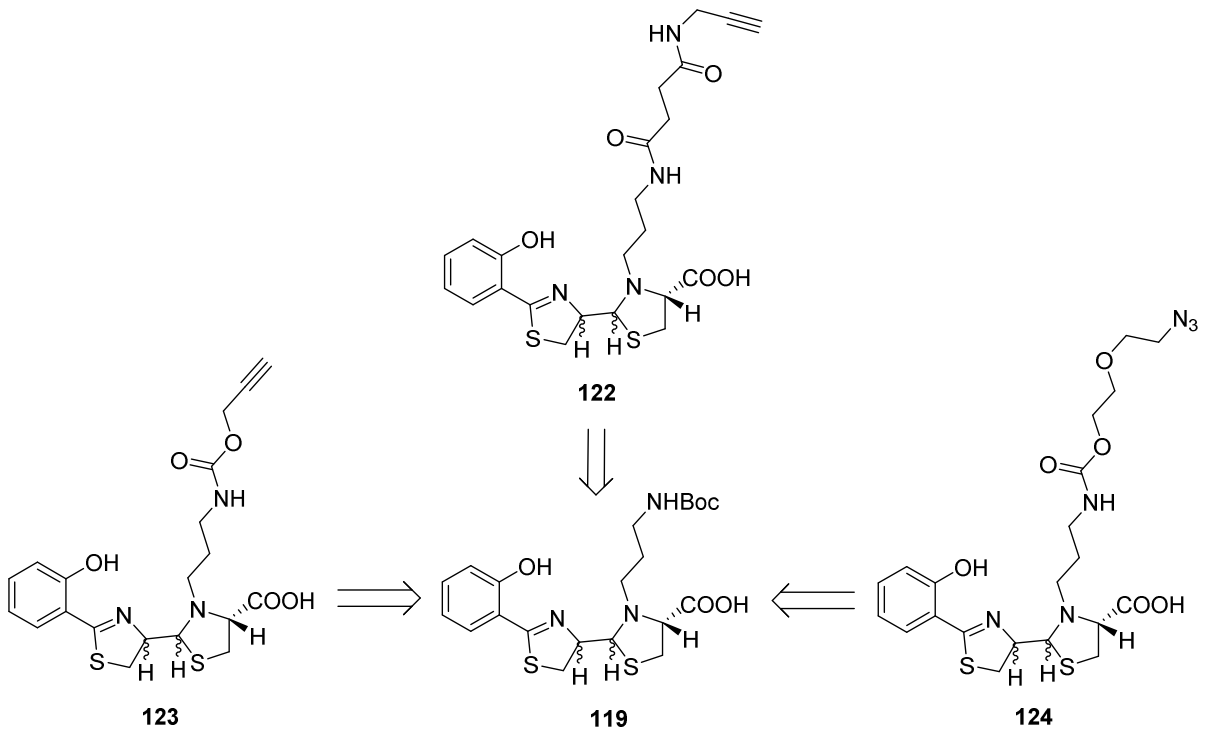


Figure 62 : Structures des vecteurs analogues à la pyochéline **122** à **124**.

A. SYNTHESE DE PYOCHELINE **119** FONCTIONNALISEE EN N3"

La synthèse de la pyochéline fonctionnalisée **119** nécessite de préparer la *nor*-pyochéline **125**. Cette synthèse débute par la condensation de la D-cystéine avec le 2-hydroxybenzonitrile **126** dans un mileu hydrométhanolique tamponné à pH 7.4. La thiazoline **127** est ainsi isolée avec un rendement de 97%. L'acide **127** est ensuite couplé à la *N*,*O*-diméthylhydroxylamine en présence d'EDCI pour conduire à l'amide de Weinreb **128**, isolé avec un rendement de 76%. L'hydroxamate **128** est réduit en aldhéyde **129** en présence de l'hydrure mixte d'aluminium et de lithium à basse température. L'aldéhyde **129** est peu stable et immédiatement mis en réaction avec la L-cystéine en milieu hydroéthanolique en présence de carbonate de potassium. La *nor*-pyochéline **125** est ainsi obtenue avec un rendement de 64% sur ces deux dernières étapes et avec un rendement de 47% à partir du 2-hydroxybenzonitrile de départ (**Schéma 18**).

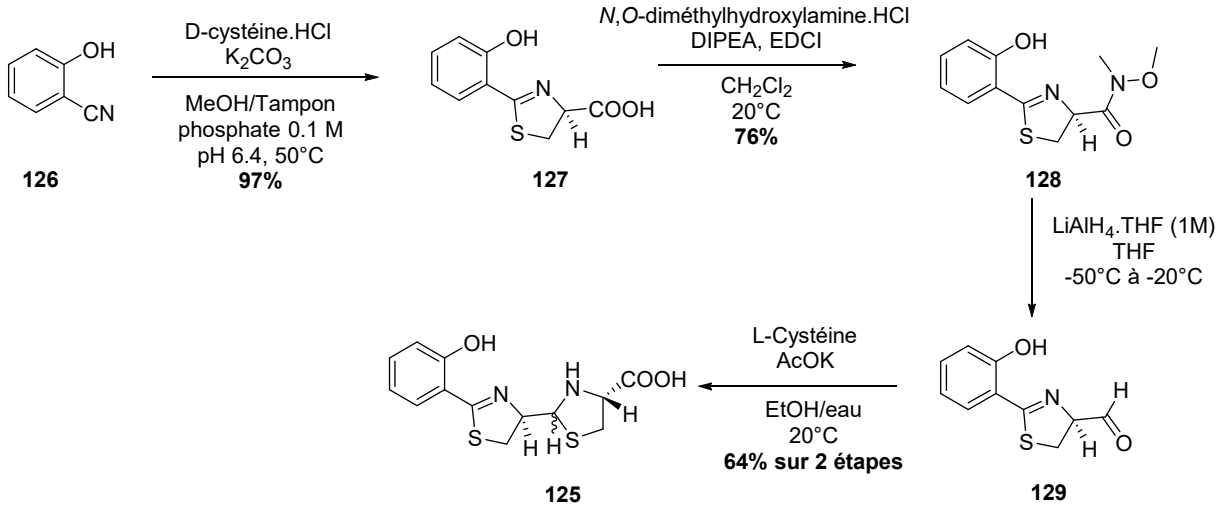


Schéma 18 : Synthèse de *nor*-pyochéline **125**.

Le couplage de la *nor*-pyochéline avec une extension aminée a été mis au point par le Dr. Noël lors de sa thèse. Le rendement décrit pour cette réaction est de 64%,[163] pourtant les essais de reproduction de cette étape par d'autres membres de l'équipe donnaient depuis des rendements aléatoires et souvent inférieurs à 35%. Ainsi nous avons entrepris de trouver des conditions plus favorables à la production des quantités nécessaires de vecteur **119**, indispensables à notre projet. Dans ce contexte, deux précurseurs de l'extension propylamine ont été synthétisés : le bromure **130** et le mésylate **131**. Nous avons ainsi synthétisé une nouvelle extension aminée à partir de la 3-bromopropanamine **132** traité par le di-*tert*-butyl-dicarbonate en en présence de triéthylamine. Le carbamate **130** a ainsi été isolé avec un rendement de 91%. Le dérivé mésylé **131**, utilisé précédement dans l'equipe pour cette synthèse, a également été préparé à partir du 3-aminopropanol **133**. La fonction amine du composé **133** a été tout d'abord protégée par un groupe Boc par un traitement au di-*tert*-butyl-dicarbonate. Le carbamate attendu **134** est ainsi isolé avec 64% de rendement. L'alcool **134** est traité par le chlorure de mésyle en présence de triéthylamine pour conduire au mésylate **131** isolé avec un rendement de 81% (**Schéma 19**).

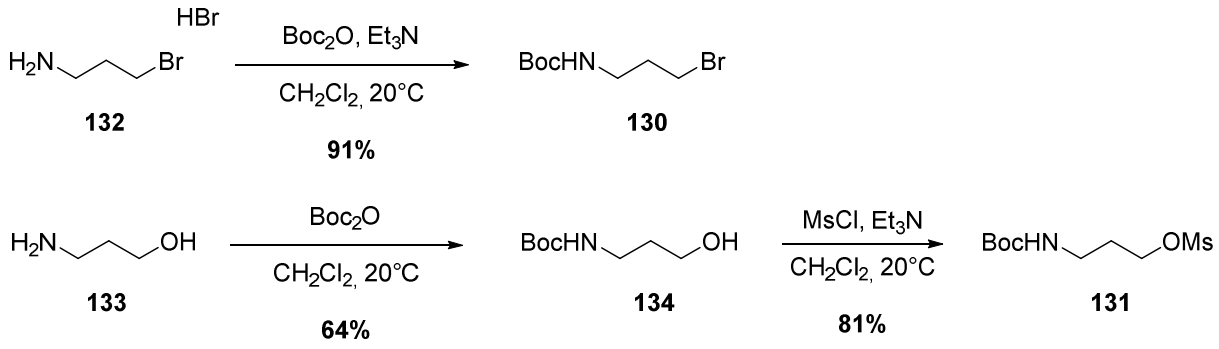


Schéma 19 : Synthèse des précurseurs **130** et **131** de l'extension propylamine.

Un criblages de différentes conditions réactionnelles a été enrepris. Le couplage du dérivé bromé **130** avec la *nor*-pyochéline dans les conditions décrites par le Dr Noël à conduit à un faible rendement de 22%. Afin d'améliorer l'efficacité de la *N*-alkylation nous avons entrepris de réaliser une réaction de Finkelstein en ajoutant du KI au milieu réactionnel, [164,165] sans amélioration significative du résultat. Nous somme alors retourné vers le précurseur **131** développé par le Dr. Noël en tentant de modifier les conditions de *N*-alkylation afin d'obtenir des rendements à la fois plus reproductibles et plus élevés. L'utilisation du dérivé mésylé **131** dans la DMF à conduit au produit attendu mais difficilement purifiable au sein d'un mélange de produits de dégradation de la pyochéline. L'utilisation du carbonate de césium comme base inorganique, ainsi que l'ajout du dérivé mésylé par portions dans le milieu réactionnel, nous a permis d'isoler la pyochéline avec un rendement de 54%. Compte tenu de ce résultat, l'ajout du dérivé mésylé **131** par portions a également été entrepris dans les conditions décrites par le Dr Noël, dans ces conditions nous avons retrouvé des rendements similaires à ceux publiés. Nous avons aussi remarqué au cours de cette étude que la réaction fonctionnait bien mieux avec des lots de mésylate **131** fraîchement synthétisés. Enfin, le laboratoire ayant acquis récemment un réacteur microonde, il nous a paru intéressant de tester l'influence de ce paramètre sur cette réaction. L'utilisation des microondes n'a cependant pas permis d'améliorer les rendements de cette réaction (**Schéma 20** et **Tableau 6**).

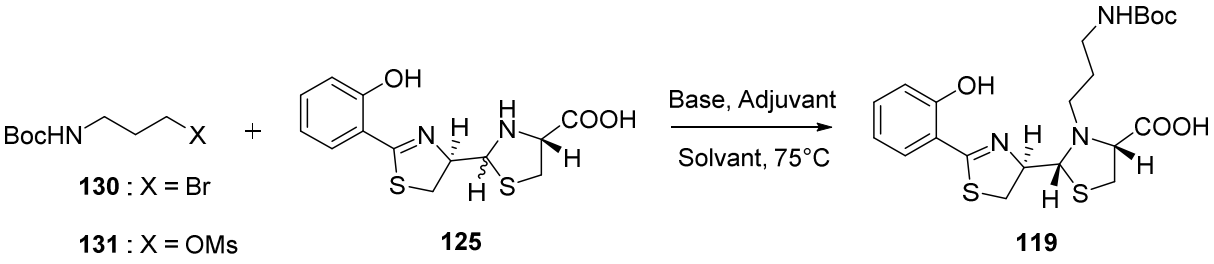


Schéma 20 : *N*-alkylation de la *nor*-pyochéline **125** grâce aux extensions aminées **130** et **131**.

X	Solvant	Base	Adjuvant	Rendement
Br	CH_3CN	K_2CO_3	[18.6]	22%
Br	CH_3CN	K_2CO_3	KI, [18.6]	21%
OMs	DMF	K_2CO_3	[18.6]	Traces
OMs	CH_3CN	Cs_2CO_3	-	54%
OMs	CH_3CN	K_2CO_3	[18.6]	62%
OMs	CH_3CN	K_2CO_3	MW, [18.6]	27%

Tableau 6 : Criblage des conditions réactionnelles pour l'alkylation en N3"

Ainsi, si le Dr Noël avait bien trouvé des conditions optimales pour réaliser cette réaction de *N*-alkylation, notre étude montre que certains détails opératoires non décrits dans le protocole publié, comme l'ajout par portion du dérivé **131** fraichement synthétisé, pouvaient avoir une influence majeure sur le rendement et la reproductivité de l'expérience. Nous avons ainsi pu avoir accès plus facilement aux quantités nécessaires de la pyochéline fonctionnalisée **119** destinées à notre projet et notamment pour la synthèses des vecteurs **122** à **124** utilisables en chimie click.

B. SYNTHESE DES VECTEURS PYOCHELINE **122**, **123** ET **124**

Afin de pouvoir utiliser la cycloaddition 1,3-dipolaire dite de Huisgen, le vecteur **119** a été doté de trois extensions différentes, munies soit d'alcynes terminaux pour les pyochélines **122** et **123**, soit d'un azoture pour le vecteur **124**. Ces fonctions réactives sont ainsi positionnées sur des bras espaceurs de longueur et de propriétés chimiques variables.

Le vecteur **122** est ainsi muni du bras espaceur le plus court. Sa synthèse débute par la déprotection du groupement Boc de la pyochéline **119** en présence de TFA, puis l'amine déprotégée est traitée, sans purification ultérieure, par le propargyl-chloroformate en présence de DIPEA. Le vecteur **122** attendu est ainsi obtenu avec un rendement de 57% sur ces deux étapes successives (**Schéma 21**).

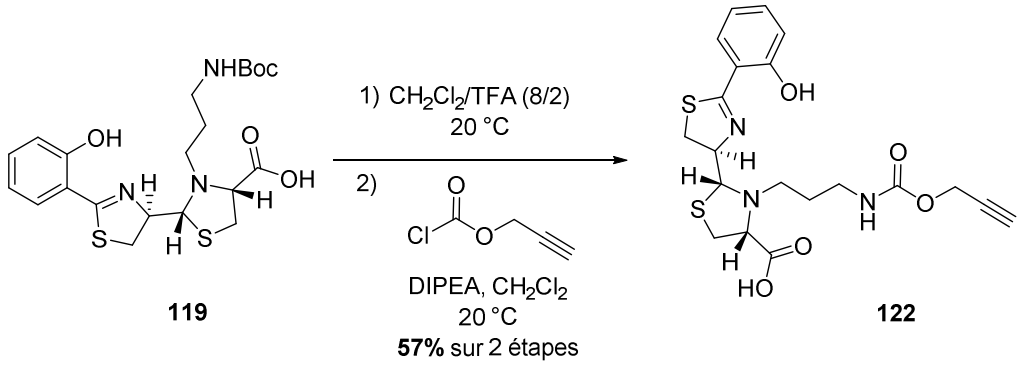


Schéma 21 : Synthèse du vecteur **122**

Pour l'analogue **123**, une extension alcyne plus « longue » a été synthétisée à partir de l'anhydride succinique **135** traité par la propargylamine dans un mélange de pyridine et de DMF. L'acide **136** est ainsi isolé avec une rendement de 40%. L'acide **136** est ensuite acitvé par le pentafluorophénol en présence d'EDCI. Dans ces conditions, l'ester de pentafluorophénol **137** est obtenu avec un rendement de 78%. (**Schéma 22**)

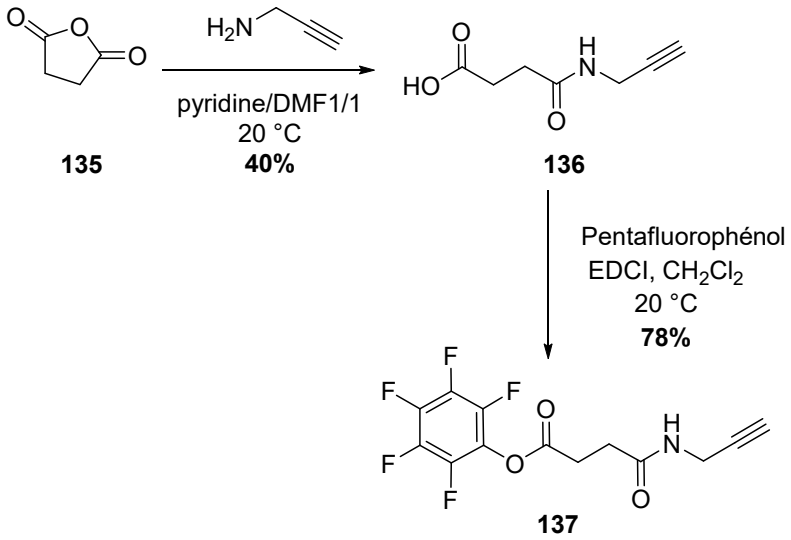


Schéma 22 : Synthèse du bras espaceur **137** muni d'un alcyne terminal

L'extension **137** munie d'un alcyne terminal est greffée sur la fonction amine déprotégée de la pyochéline **119** en présence de DIPEA. Le vecteur **123** est ainsi isolé avec un rendement de 68% sur deux étapes (**Schéma 23**).

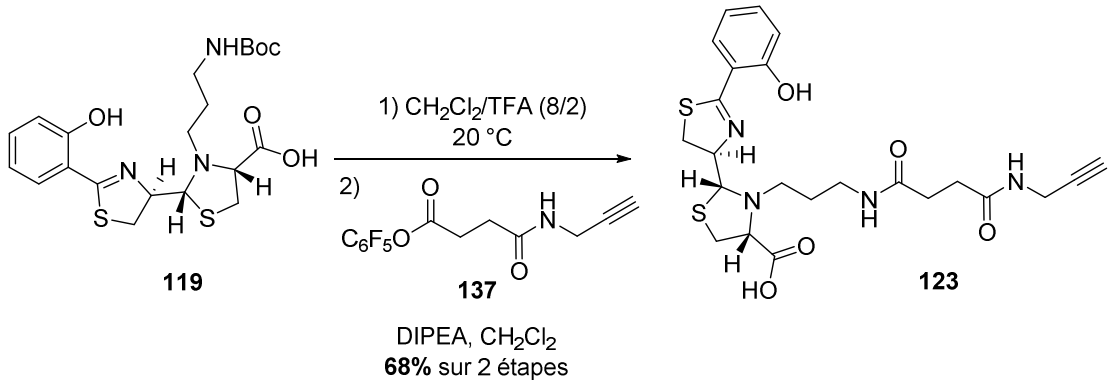


Schéma 23 : Synthèse du vecteur **123**

Les vecteurs **122** et **123** munis d'une fonction alcyne terminale pourront être conjugués avec des antibiotiques munis de fonctions azotures. Afin de diversifier et sécuriser notre projet nous avons développé une stratégie inverse où c'est le vecteur pyochéline qui est doté d'une fonction azoture pour réagir avec des antibiotiques munis de fonctions alcynes. Dans ce but, l'espaceur **138** muni d'un azoture terminal a été synthétisé. Le 2-(2-chloroethoxy)éthan-1-ol **139** est traité par l'azoture de sodium dans l'eau à 90 °C pour conduire à l'azoture **140** isolé avec 94% de rendement. L'alcool **140** est traité par du triphosgène en présence de pyridine pour conduire au chloroformate **138**, isolé avec un rendement de 97% (**Schéma 24**).

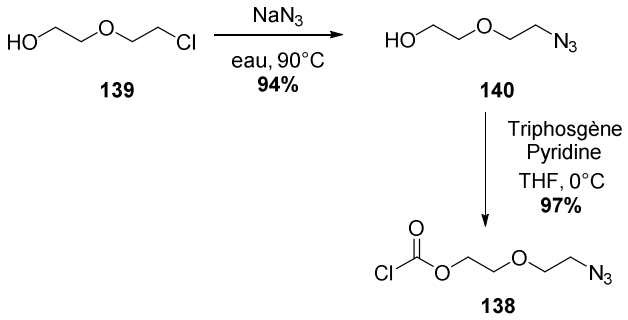


Schéma 24 : Synthèse du bras espaceur **138** muni d'un azoture terminal.

Dans une première étape la pyochéline **119** est déprotégée en présence de TFA, puis l'amine obtenue est traitée par le bras espaceur **138** en présence de DIPEA. Grâce à cette méthode, le vecteur **124** est isolé avec un rendement de 71% sur deux étapes successives (**Schéma 25**).

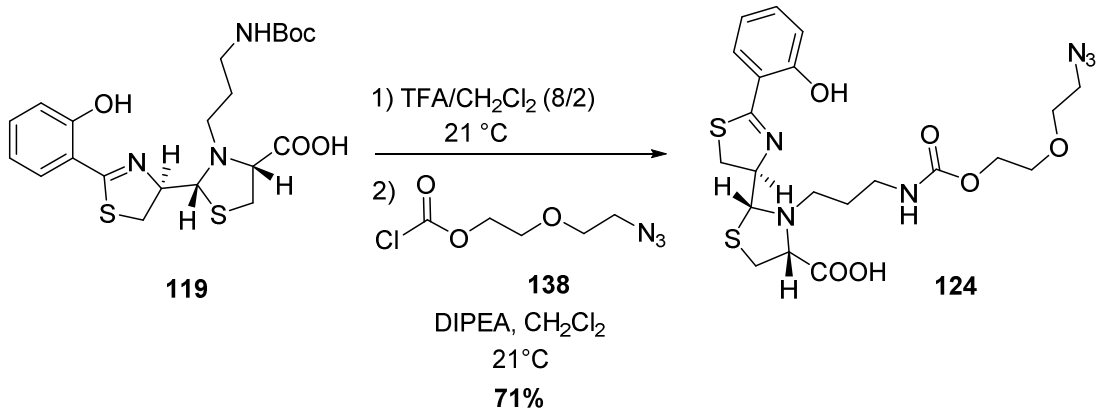


Schéma 25 : Synthèse du vecteur **124**

Avec dans nos mains, les trois nouveaux vecteurs **122**, **123** et **124**, munis soit d'alcynes vrais, soit d'un azoture, à l'extrémité d'espaceurs de longueurs et de propriétés différentes nous avons synthetisé les antibiotiques munis soit d'un azoture soit d'un alcyne.

III. Synthèse des conjugués pyochéline-antibiotiques par chimie click

Lors de nos travaux sur les conjugués antibiotiques-sidérophores catécholés nous avons vu que le choix de l'antibiotique dans une stratégie de type cheval de Troie était crucial. La localisation de la cible biologique de l'antibiotique devant être corrélée au destin, cytoplasmique ou périplasmique, du sidérophore vecteur. Les données actuelles disponibles dans la littérature indiquent que la pyochéline parvient jusqu'au cytoplasme grâce au système de transport du fer correspondant. Dans une première approche, nous avons choisi de vectoriser par le biais de nos vecteurs **122**, **123** et **124** des oxazolidinones, dont la cible est le ribosome et dont nous maîtrisons bien la chimie désormais. Néanmoins, la pyochéline transitant par le périplasme nous avons aussi voulu tester la possibilité de vectoriser des β-lactames dont la cible est périplasmique comme nous l'avons mentionné dans l'introduction.

A. Synthese de β-lactames utilisables en chimie click

La synthèse de conjugués entre les dérivés de pyochéline et des β-lactames nécessite la synthèse de β-lactames non décrits dans la littérature et munis de bras espaceurs présentant une fonction azoture ou un alcyne terminal. Notre objectif était de synthétiser les molécules **141** et **142**. Ces composés sont des dérivés de l'ampicilline, l'un des β-lactames dont la

chimie est le mieux décrite et qui est disponible commerciallement à moindre coût (**Figure 63**).

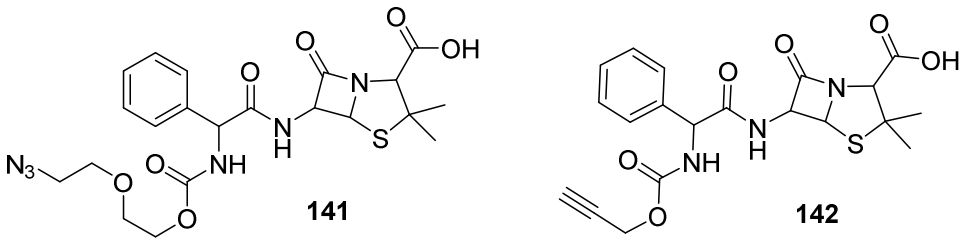


Figure 63 : Structures des ampicillines fonctionnalisées **141** et **142**

Afin de synthétiser l'ampicilline fonctionnalisée **141**, l'ampicilline commerciale **143**, est traitée par le chloroformate **138**, dont la synthèse à été décrite plus haut dans le manuscrit. Cette réaction nécessite une base. La première condition testée utilise la « proton sponge » dans la DMF. Cette réaction a conduit au produit **141** attendu d'après le spectre de masse. Lors de la purification du produit sur colonne de silice, le cycle lactame s'est ouvert sous l'action des solvants nucléophiles (MeOH, EtOH) dont la polarité permet de séparer le produit désiré des sous-produits de la réaction. L'utilisation de la triéthylamine comme base nous a permis d'isoler le produit **141**, après un lavage à l'acide citrique. Mais le produit a été récupéré avec une forte proportion d'acide citrique, qui n'a pas pu être séparé de l'ampicilline **141** sur colonne de silice. Un lavage en milieu faiblement basique a été effectué, mais celui-ci a conduit à une hydrolyse du cycle lactame, conduisant à l'acide **144**.[166] Les molécules **141** et **144** ne sont pas séparables par des méthodes de purification sur colonne de silice, ni par lavage acido-basique. L'utilisation du trihydrate d'ampicilline **145** dans un mélange THF/eau, en présence de triéthylamine[167] nous a conduit majoritairement au produit attendu sans trace du produit d'hydrolyse **144**. Afin d'éviter les étapes de purifications qui semblent dégrader le produit, nous avons tenté le précipiter ou de l'extraire dans différentes conditions. Le chloroformate **138** contamine en général le produit désiré **141**. (**Schéma 26** et **Tableau 7**)

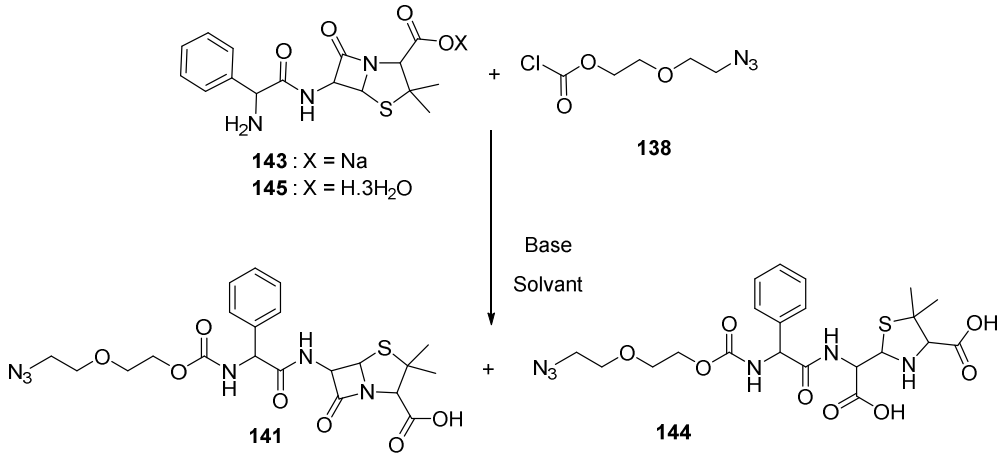


Schéma 26 : Synthèse de l'ampicilline **141**

Ampicilline	Base	Solvant	Molécules obtenues
143	« Proton sponge »	DMF	**141** (Traces)
143	Et_3N	DMF	**141** + **144**
145	Et_3N	THF/H_2O	**141** + **138**

Tableau 7 : Conditions de couplage entre l'ampicilline **143** et le chloroformate **138**

Au vu de la difficulté à obtenir l'azoture **141** recherché, nous avons abandonné le projet d'installer l'azoture sur une ampicilline et privilégié la fonctionnalisation par un alcyne terminal. Dans ce but, nous avons alors utilisé le propargyl-chloroformate pour introduire une triple liaison sur l'ampicilline trihydrate **143**. Après le traitement de l'ampicilline par le propargyl-chloroformate en présence de triéthylamine dans le mélange THF/eau, le produit **142** a pu être isolé par précipitation en milieu acide avec un rendement de 80% (**Schéma 27**).

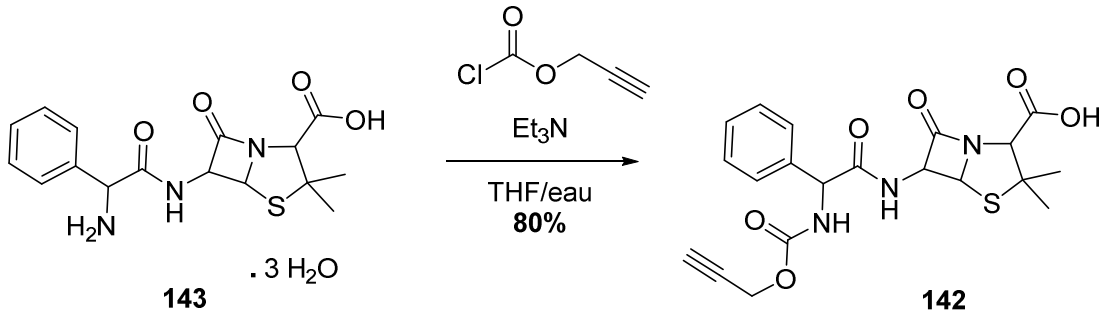


Schéma 27 : Synthèse de l'ampicilline fonctionnalisée **142**

B. TENTATIVES DE CONJUGAISON DE LA PYOCHELINE **124** ET DU β-LACTAME **142**

La réaction de conjugaison entre le vecteur pyochéline **124** muni d'un azoture et l'ampicilline **142** munie d'un alcyne vrai a été testée dans des conditions de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC). Dans un premier temps nous avons utilisé les conditions développées pour la conjugaison des vecteurs catécholés avec les oxazolidinones, soit du sulfate de cuivre(II) en présence d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/eau. Dans ces conditions, la réaction n'a pas eu lieu, pour former le conjugué **146**. La pyochéline ayant la capacité de complexer le cuivre ionique, nous avons tenté d'augmenter la concentration de cuivre dans le milieu réactionnel, sans plus de succès (**Schéma 28**).

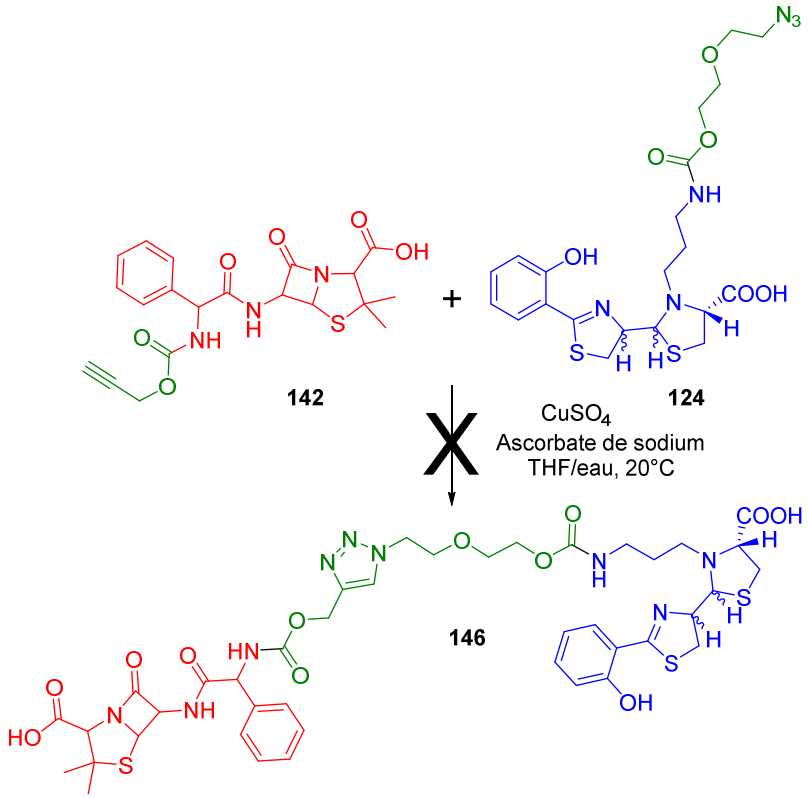


Schéma 28 : couplage de la pyochéline **124** et de l'ampicilline **142** par chimie « click ». Le vecteur est coloré en bleu, l'antibiotique est coloré en rouge et le bras espaceur est coloré en vert.

Afin de stabiliser le cuivre(I) au cours de cette réaction et de limiter la chélation par le vecteur nous avons synthétisé le ligand tris-(benzyltriazolylméthyl)amine (TBTA) **147**.[168,169] La TBTA est synthétisée par une réaction de chimie click entre l'azoture de phényl **148** et la tri(prop-2-yn-1-yl)amine **149** dans le dichlorométhane à température ambiante, en présence de

sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium.[170] Dans ces conditions la TBTA **147** est isolée avec un rendement quantitatif (**Schéma 29**)

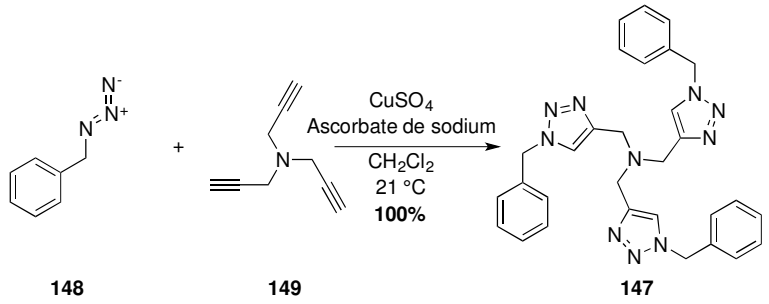


Schéma 29 : Synthèse du ligand TBTA **147**

Le ligand TBTA a montré des capacités à catalyser les réactions click à partir de substrats similaires aux nôtres, quoi qu'avec des rendements finaux très modestes.[130] L'utilisation du ligand **147** dans un mélange eau/*t*-butanol en présence de sulfate de cuivre (II) et d'ascorbate de sodium n'a pas permis de détecter le conjugué **146** recherché. Une recherche à posteriori, montre que les exemples de chimie click appliquée à des composés de type pénicilline sont non seulement rares mais qu'il conduisent en général aux produits attendus avec de faibles rendements.[130] La sensibilité du cycle β-lactame pourrait être une des raisons de ces résultats. L'utilisation de β-lactames de type céphalosporines, plus résistants, mais dont la manipulation est plus complexe (solubilité) pourrait être une solution pour aborder à nouveau ce projet de couplage par chimie click. Face aux difficultés rencontrées dans cette partie du projet et pour des raisons de temps, nous avons préféré avancer ce projet en nous focalisant sur la vectorisation d'antibiotiques de la famille des oxazolidinones.

C. Tentatives de conjugaison des pyochelines **122** et **123** avec des oxazolidinones

La réaction de couplage entre les oxazolidinones et la pyochéline a été entreprise par des réactions de type CuAAC. L'oxazolidinone choisie pour cette étude est le composé **76**, dont la synthèse a été décrite dans le chapitre précédent. Cet azide a été choisi car c'est le simple à synthétiser de toute notre famille, il est donc disponible en plus grande quantité. De plus, lors de notre étude sur les sidérophores catécholés, ce composé a montré une bonne réactivité dans les réactions CuAAC que nous avons menées. Nous avons ainsi testé la possibilité de coupler le vecteur pyochéline **123**, muni d'un alcyne vrai, avec l'azide **76** pour

conduire au conjugué **150**. Dans le mélange de solvant « classique » des réactions CuAAC, *t*-butanol/eau, la spectrométrie de masse effectuée sur le brut montre une prédominance des produits de départ avec le conjugué **150** recherché présent uniquement à l'état de traces. Les deux partenaires de la réaction, l'azide **76** et l'aclyne **123** sont en fait peu solubles dans ce mélange ce qui pourrait expliquer la faible réactivité observée. (**Schéma 30**)

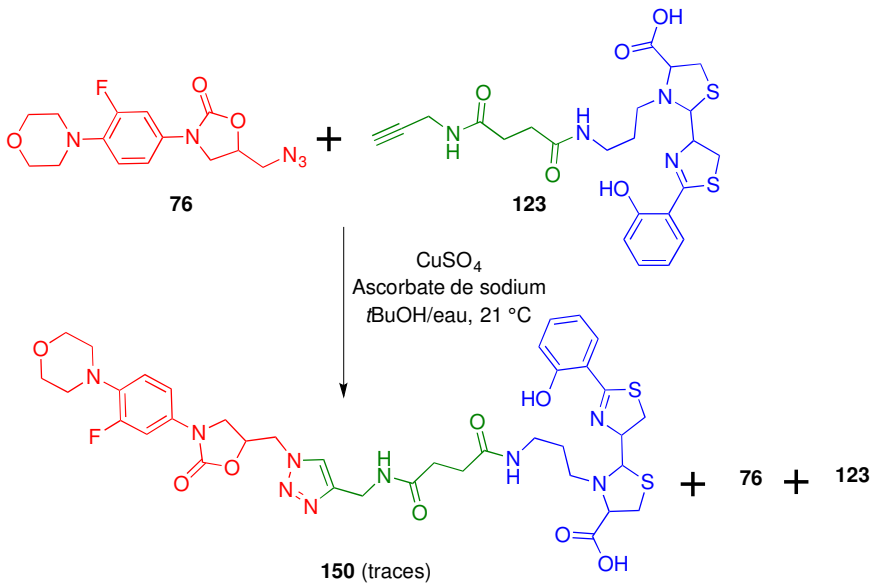


Schéma 30 : Synthèse du conjugué pyochéline-oxazolidinone **150**. Le vecteur est coloré en bleu, l'antibiotique est coloré en rouge et le bras espaceur est coloré en vert.

A température ambiante, dans un mélange THF/eau, les deux produits de départ sont par contre parfaitement solubles. Dans ce mélange de solvant en présence d'ascorbate de sodium et de sulfate de cuivre(II), la réaction de couplage n'a pas eu lieu, et les produits de départ **76** et **123**, sont encore présents dans le milieu réactionnel après 12 h d'agitation. L'augmentation de la stoechiométrie de cuivre dans la réaction n'a pas permis d'améliorer ce résultat. Dans les mêmes conditions de réaction mais avec un chauffage à 70°C, le vecteur pyochéline **123** semble se dégrader. L'analyse du brut réactionnel par spectrométrie de masse montre que le vecteur perd son extension alcyne pour conduire à la pyochéline fonctionnalisée **151** munie d'une simple extension aminée. Un résultat identique est obtenu lorsque du méthanol est utilisé comme co-solvant de la réaction à température ambiante. Nous avons également utilisé une autre source de cuivre (I), l'iodo(triéthyl phosphite)de cuivre(I). Ce sel de cuivre(I) a été utilisé dans le dichlorométhane à 50 °C. Dans ces conditions la réaction conduit à nouveau à une dégradation du vecteur en pyochéline **151**. (**Schéma 31**).

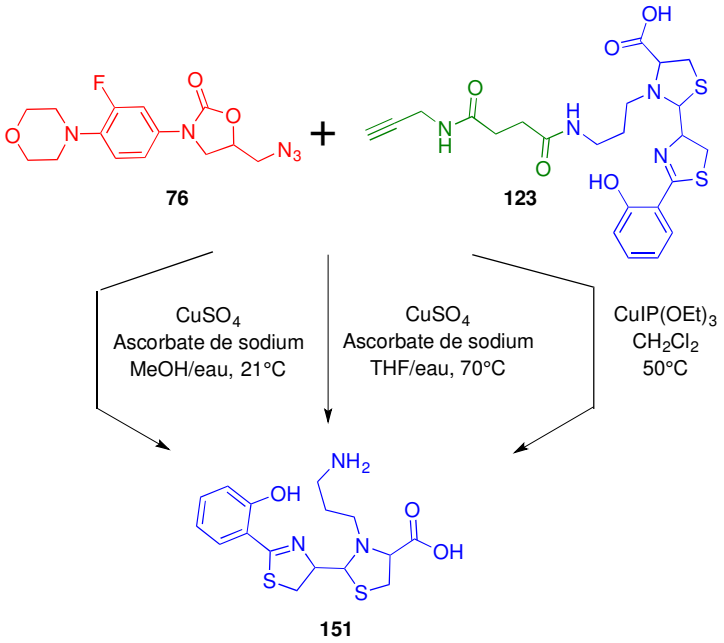


Schéma 31 : Tentative de synthèse du conjugué pyochéline-oxazolidinone **150** et dégradation du vecteur **123**. Le vecteur est coloré en bleu, l'antibiotique est coloré en rouge et le bras espaceur est coloré en vert.

Les raisons de la fragilité particulière de cette fonction amide et le mécanisme de rupture mis en jeu nous échappe encore. Ce résultat hypothèque l'utilisation du vecteur pyochéline **123** pour une conjugaison par chimie click. Conscient que ce problème pouvait exister aussi avec le second vecteur pyochéline **122** doté d'une fonction alcyne terminale, nous avons mis cette approche en suspend et nous nous sommes focalisés sur une autre méthode de conjugaison, a priori moins risquée : la formation d'une liaison amide entre le vecteur et l'antibiotique. Dans ce contexte nos tentatives se sont limitées aux oxazolidinones et n'ont pas été étendues aux β-lactames.

D. Conjugaison de la pyocheline et d'oxazolidinones par liaison peptidique

L'échec de la chimie click nous a mené à synthétiser de nouveaux antibiotiques de la famille des oxazolidinone **79** à **81** muni d'un bras espaceur permettant la création d'une liaison peptidique avec la pyochéline **151** et l'obtention des conjugués de type **152** (**Schéma 32**).

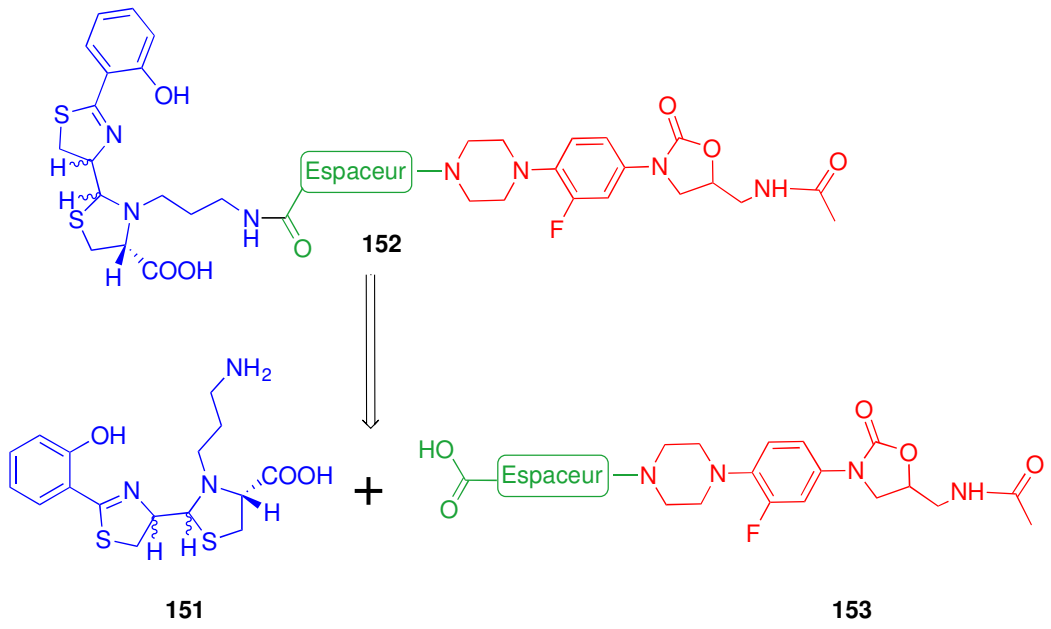


Schéma 32 : Rétrosynthèse des conjugués de type **152.** Le vecteur est représenté en bleu, le bras espaceur en vert et l'antibiotique en rouge.

Cette approche présente néanmoins un risque puisqu'il existe deux fonctions acides carboxyliques et une fonction amine sur les produits de départ envisagés. A priori cette configuration pouvait conduire à des mélanges de plusieurs produits de condensation en présence d'un agent de couplage. Nous avons néanmoins tenté cette approche, risquée et qui nécessite la synthèse de nouveaux dérivés oxazolidinones dotés de fonctions acides terminales.

1. Synthèse des blocs bras espaceur-oxazolidinone

Dans cette approche nous avons à nouveau fait le choix d'utiliser des bras espaceurs de longueurs et de propriétés chimiques variables. Le bras le plus court envisagé est dérivé de l'acide succinique. Pour ce nous avons utilisé le bras espaceur succinique protégé **154** précédement synthétisé au laboratoire et disponible en quantité suffisante pour nos expériences. Ainsi l'acide **154** est activé par du pentafluorophénol en présence de DCC. L'ester activé **155** est isolé avec un rendement de 50%. Le dérivé **155** est ensuite couplé avec l'amine issue de la déprotection du linézolide **94** dans un mélange TFA/CH_2Cl_2. Cette amine est traitée par l'ester activé **155** pour conduire à l'oxazolidinone **156** isolée avec 65% de rendement sur ces 2 étapes. (**Schéma 33**)

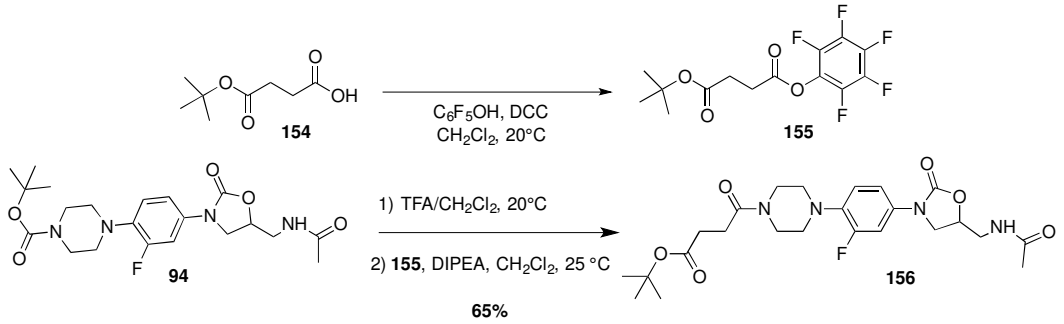


Schéma 33 : Synthèse de l'oxazolidinone **156**.

Afin d'améliorer la solubilité des conjugués en milieu aqueux, nous avons entrepris la synthèse d'un bras espaceur contenant un motif diéthylène-glycol. Le dérivé **157** était ainsi disponible au laboratoire, synthétisé en grande quantité dans le cadre d'un autre projet. L'alcool **157** est traité par du triphosgène en présence de pyridine pour conduire au chlorofomate **158** isolé avec 94% de rendement. Après déprotection de l'oxazolidinone **94** dans un mélange de TFA et de dichlorométhane, l'amine résultante est traitée par le chloroformate **158**. L'oxazolidinone **159** attendue est isolée avec 75% de rendement. (**Schéma 34**).

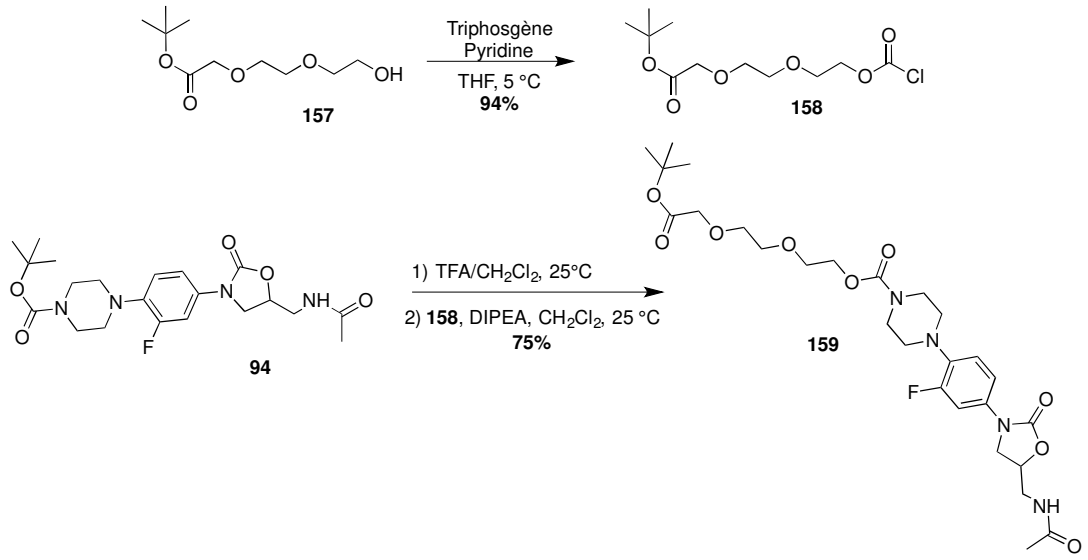


Schéma 34 : Synthèse de l'oxazolidinone **159**.

Enfin nous avons préparé le dérivé oxazolidinone **160**, celui présentant le bras espaceur le plus long. L'oxazolidinone **94** est tout d'abord déprotégée dans un mélange TFA/CH_2Cl_2. L'amine résultante est ensuite traitée par le dérivé de glycine **161,** disponible au laboratoire, en présence de DIPEA dans le dichlorométhane. L'oxazolidinone **162** est ainsi

isolée avec 88% de rendement. Le groupement protecteur Boc du composé **162** est ensuite éliminé en présence de TFA dans le dichlorométhane et l'amine libre est couplée avec le chloroformate **158** en présence de DIPEA. L'oxazolidinone **160** recherchée est isolée avec 65% de rendement. (**Schéma 35**)

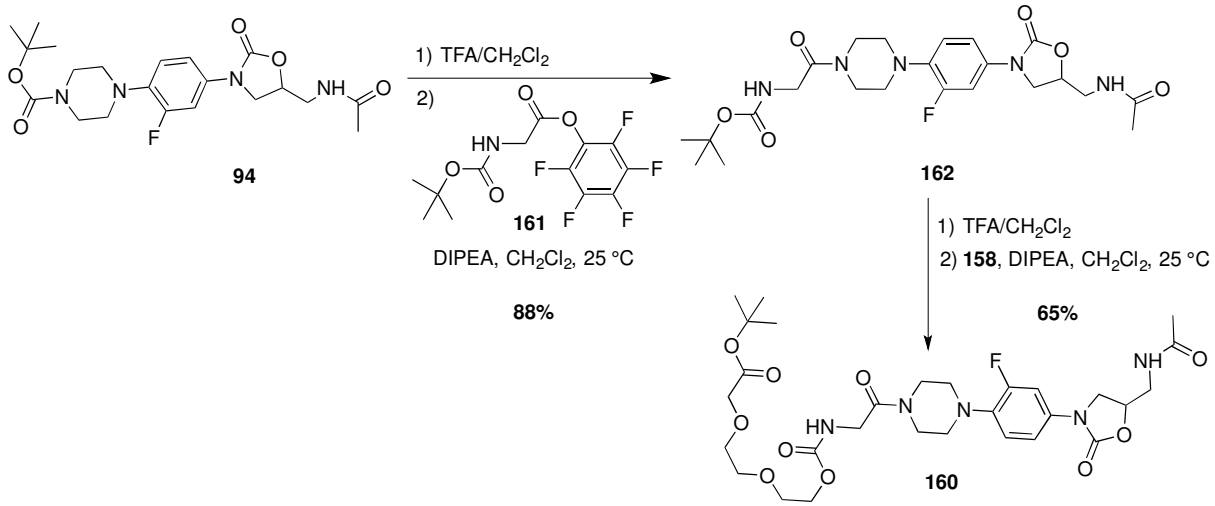


Schéma 35 : Synthèse de l'oxazolidinone **160**.

Les trois différents blocs antibiotiques-bras espaceurs **156**, **159** et **160** ont ensuite été conjugués à un vecteur pyochéline.

2. *Formation des conjugués pyochéline-oxazolidinone*

Nous avons tenté de réaliser la conjugaison entre le vecteur pyochéline **119** et les blocs bras espaceurs-oxazolidinones **156**, **159** et **160** en utilisant un agent de couplage peptidique. Cette réaction évidente n'avait jamais été tentée précédemment au laboratoire par crainte des différents produits pouvant résulter du couplage de deux substrats présentant des fonctions acides à priori de réactivité équivalente.

Tout d'abord, la pyochéline **119** et l'oxazolidinone **156** ont été traitées dans un mélange de dichlorométhane et de TFA afin d'éliminer respectivement les groupes protecteurs Boc et *tert*-butyl. Après évaporation des solvants, les deux composés déprotégés sont traités par le HATU en présence de DIPEA dans le dichlorométhane pour conduire au conjugué **163** attendu. Cependant ce composé est difficilement séparable du dérivé trifluoré **164** (**Schéma 36**).

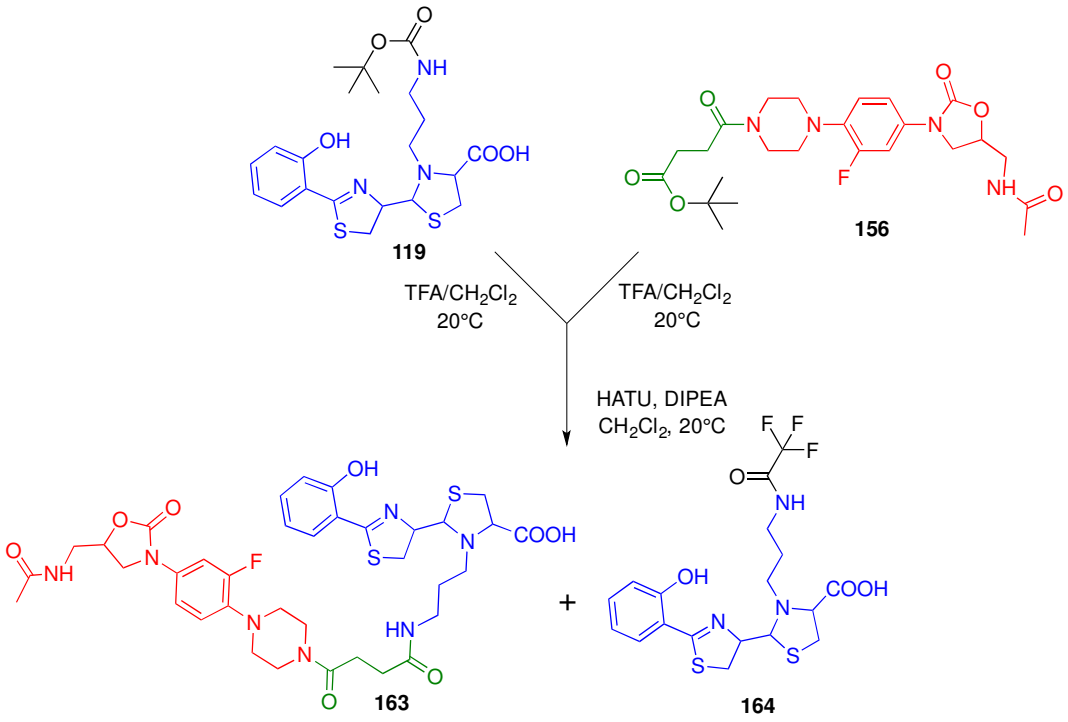


Schéma 36 : Synthèse du conjugué **163**. Le vecteur est représenté en bleu, le bras espaceur en vert et l'antibiotique en rouge.

Ce résultat préliminaire montrait que : 1- les deux fonctions acides carboxyliques ne sont pas équivalentes et qu'il est donc possible d'obtenir spécifiquement le conjugué pyochéline-oxazolidinone recherché. 2-le TFA résiduel issu des réactions de déprotection des produits de départ **119** et **156** parvient à perturber cette régiosélectivité. Aussi, afin d'éviter cette contamination par le composé trifluoré **164** nous avons modifié l'étape de déprotection. La pyochéline **119** ainsi que les oxazolidinones **156**, **159** et **160** sont déprotégées par une solution d'HCl dans l'éther. Après évaporation sous pression réduite, l'amine et l'acide ne sont pas purifiés mais directement couplés en présence de HATU et de DIPEA dans le dichlorométhane. Les conjugués **163**, **165** et **166** sont isolés avec respectivement 30%, 34% et 62% de rendement. (**Schéma 37**)

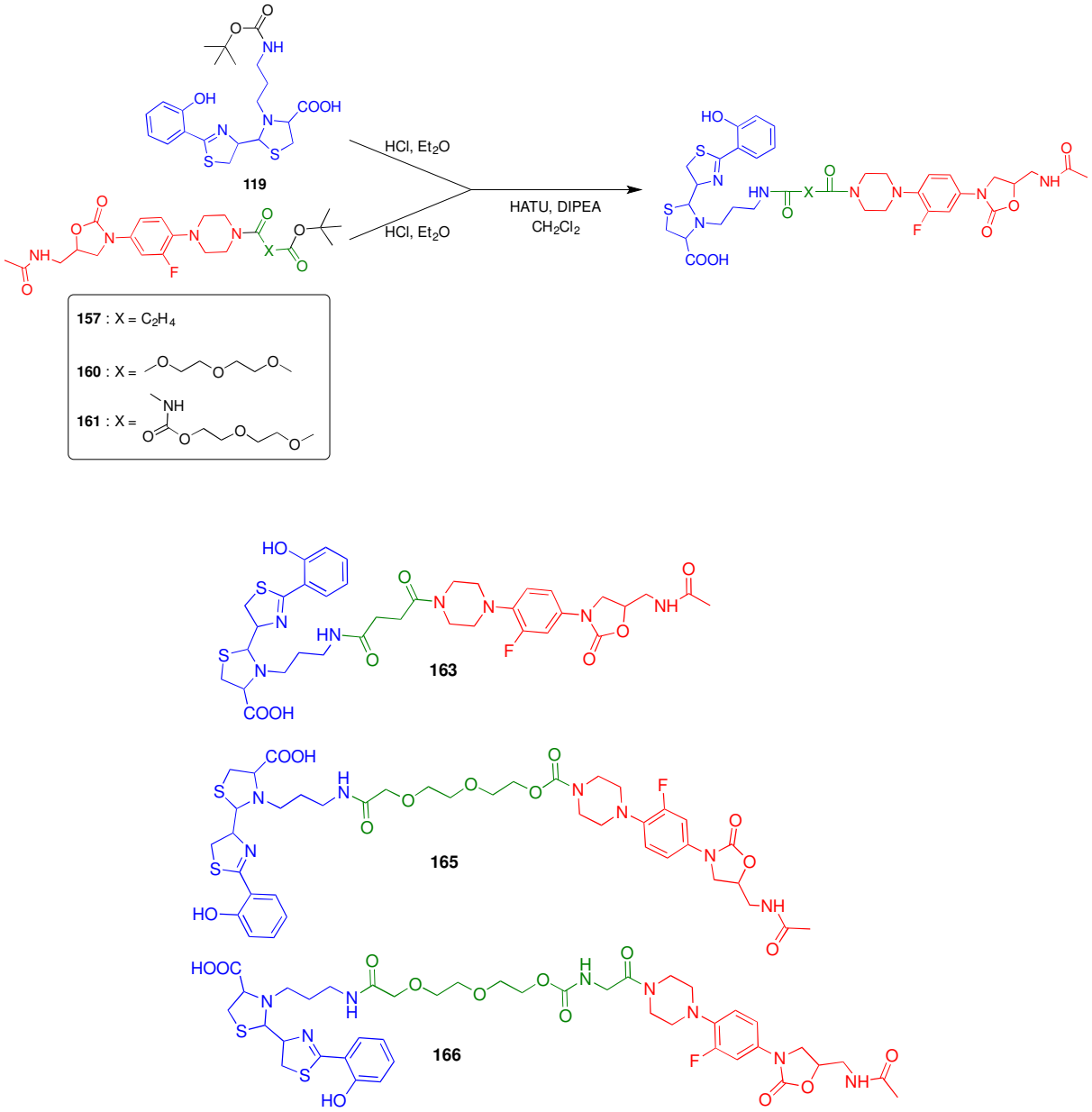


Schéma 37 : Synthèse et structures des conjugués pyochéline-oxazolidinone **163** (PCH-L7), **165** (PCH-L8) et **166** (PCH-L9). Le vecteur est représenté en bleu, le bras espaceur en vert et l'antibiotique en rouge.

Les composés **163**, **165** et **166** sont les premiers conjugués pyochélines-oxazolidinones décrits à ce jour. Les propriétés biologiques des conjugués **163**, **165** et **166** ont ensuite été évaluées sur *P. aeruginosa*. Ce travail a été effectué par le Dr. Béatrice Roche, actuellement en postdoc dans le laboratoire.

E. ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CONJUGUES **163**, **165** ET **166**

1. Activité antibiotique

L'évaluation des conjugués **163**, **165** et **166** s'est d'emblée heurté à un problème pratique : malgré le soin apporté au choix des espaceurs, ces composés se sont montrés peu solubles en milieu physiologique, en particulier à concentration élevée. Les solutions mères des conjugués dans le DMSO ou le méthanol précipitent lors de la dilution dans les milieux de cultures. La solubilisation de nos molécules nécessitant l'ajout de soude, ces conditions se sont révélées incompatibles avec la croissance bactérienne. Il n'a donc pas été possible de déterminer des CMI par la méthode de dilution en cascade en milieu de culture liquide. Pour pallier à ce problème et avoir tout de même une évaluation de l'activité antibiotique. Les conjugués **163**, **165** et **166** ont été testés pour leur activité antibiotique sur *P. aeruginosa* par la technique de diffusion dans un gel d'agar. Cette technique n'a pas permis non plus de mettre en évidence d'activité antibactérienne pour nos composés.

2. Transport du ^{55}Fe

Ces conjugués ne présentent-ils pas d'activité antibiotique car ils n'ont pas d'affinité pour la cible biologique, ou simplement parce qu'ils ne rentrent pas dans la bactérie ? Pour élucider ce point nous avons effectué des expériences de transport de ^{55}Fe. Ces expériences montrent que les conjugués PCH-L7 **163**, PCH-L8 **165** et PCH-L9 **166** semblent capables de promouvoir l'accumulation du ^{55}Fe dans les bactéries (**Figure 64 A.**, **B.** et **C.**). Les expériences contrôles menées en présence de CCCP (inhibiteur de la force proton motrice) montrent que cette accumulation est le fruit d'un transport actif dépendant de la protéine TonB et donc de transporteurs de membrane externe (**Figure 64 A.**, **B.** et **C.**). Lorsque ces expériences de transport sont effectuées avec le conjugué PCH-L9 **166** sur une souche de *P. aeruginosa* n'exprimant pas FptA, le transporteur de membrane externe de la pyochéline, l'efficacité de ce transport est grandement altérée mais non totalement supprimé. Les expériences de contrôle, à pH 8 ou en présence de NaOH, permettent d'exclure un transport lié à une altération de la membrane par les conditions de solubilisation. Ce résultat confirme que le transport observé est lié au transporteur de la pyochéline, FptA. Le transport résiduel

observé peut-être dut à la présence d'un autre transporteur capable d'importer la pyochéline. Ce transporteur n'a pas encore été identifié (**Figure 64 D.**).

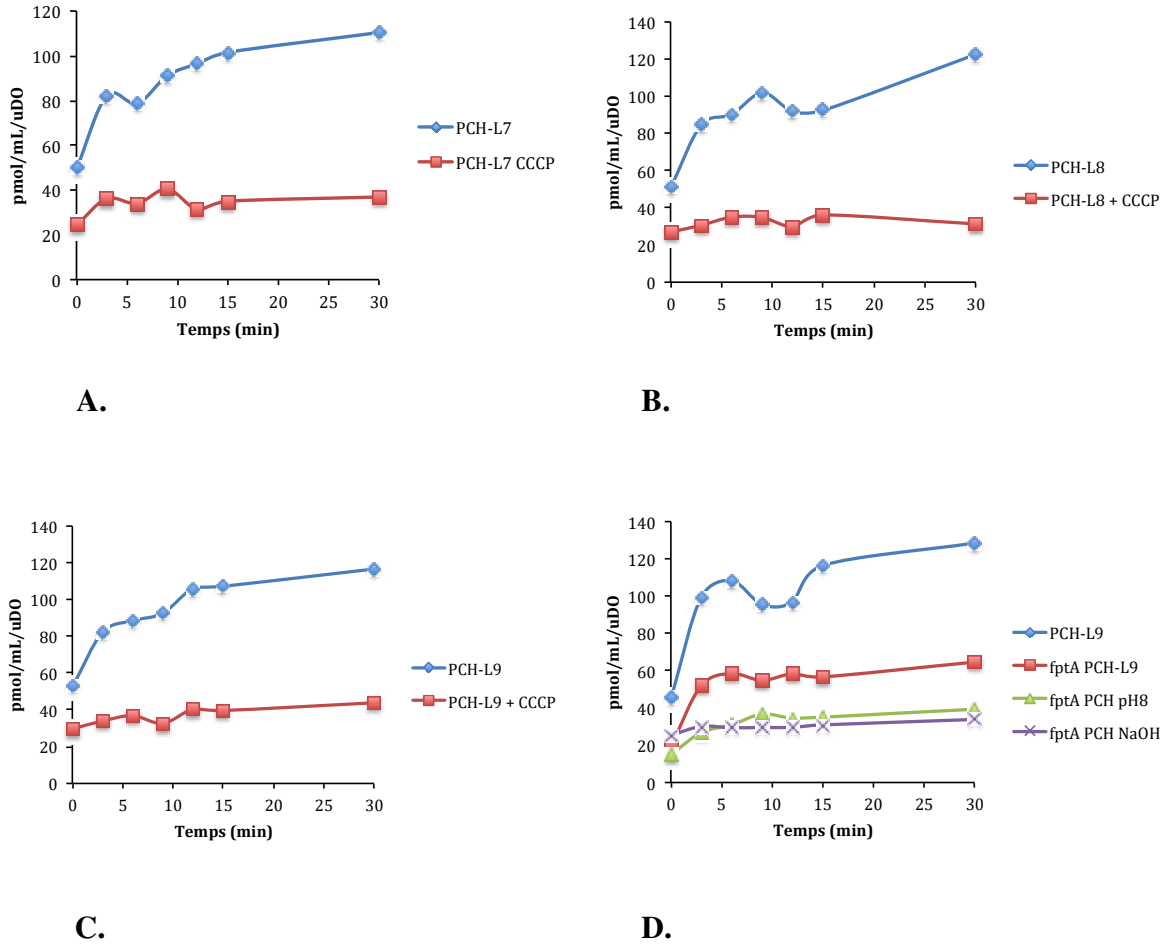


Figure 64 : Expériences de transport de ^{55}Fe en présence des conjugués pyochéline-oxazoldinone et en présence, ou en absence de CCCP. **A.** PCH-L7, **B.** PCH-L8, **C.** PCH-L9. **D.** Expériences de transport de ^{55}Fe en présence du conjugué pyochéline-oxazoldinone PCH-L9 sur *P. aeruginosa* sauvage (courbe bleue) ou sur *P. aeruginosa* muté pour le transporteur FptA (courbe rouge). En contrôle : transport de ^{55}Fe par la pyochéline à pH 8 (courbe verte) et en présence de NaOH (courbe violette) dans la souche mutée pour FptA.

Ces expériences de transport semblaient donc bien montrer que nous conjugués sont capables de traverser la membrane externe de *P. aeruginosa* en utilisant le transporteur FptA comme « porte d'entrée ». Néanmoins la solubilisation préalable de nos conjugués pour ces expériences nécessite l'utilisation de NaOH 1N dans le tampon Tris utilisé dans ces expériences. Ces conditions pouvant être délétère pour nos conjugués, il nous fallait confirmer que ces derniers composés restent parfaitement intègres lors de la solubilisation et que les transports observés sont bien ceux des conjugués et pas ceux de produits de dégradation. Dans ce but une étude de stabilité de PCH-L8 **165** dans les conditions de solubilisation a été menée.

L'analyse par spectrométrie de masse montre qu'après traitement par NaOH dans le tampon Tris, le conjugué PCH-L8 **165** a totalement disparu. Les pics observés à partir de l'extraction de la phase organique acidifiée mettent en évidence des fragments caractéristiques du bras espaceur et de l'oxazolidinone. Aucun fragment ne correspond à la pyochéline dans la phase organique. Cette dernière est en fait retrouvée dans les phases aqueuses issues de l'acidification. Cette pyochéline est en fait le vecteur **151** présentant une extension aminée. Nous retombons donc sur une problématique déjà rencontrée lors de nos tentatives de couplage par chimie click sur la pyochéline : l'instabilité, difficilement explicable, de la fonction amide liant le vecteur et le bloc bras espaceur-antibiotique. Très récemment des tentatives de mises au point d'autres conditions de solubilisation ont été menées en utilisant d'autres bases et d'autres tampons. Ainsi l'utilisation de carbonate de potassium comme base dans un tampon de type PBS pourrait convenir d'après les études menées par spectrométrie de masse. Notons que ces études de stabilité n'ont été effectuées que sur le conjugué PCH-L8 **165**, mais il est vraisemblable que ce problème affecte aussi les deux conjugués **163** et **166**.

IV. Conclusions et perspectives

Dans le cadre de ce projet nous voulions nous servir de la pyochéline comme vecteur pour l'adressage d'antibiotiques par la stratégie du cheval de Troie. Ainsi, à partir du vecteur **119**, déjà décrit par notre laboratoire pour sa capacité à être transporté efficacement dans *P. aeruginosa*, nous avons développé les trois vecteurs **122**, **123** et **124** munis soit d'une fonction azoture soit d'alcynes terminaux. Ces vecteurs sont donc particulièrement adaptés à la conjugaison d'antibiotiques par des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire dite aussi chimie click. Nous avons ainsi tenté de conjuguer, soit des antibiotiques de la famille des β-lactames soit des oxazolidinones, famille d'antibactérien déjà testé avec les vecteurs catéchols. Malheureusement les conditions de la chimie click semblent avoir un effet néfaste à la fois sur les vecteurs pyochéline mais aussi sur les antibiotiques de type β-lactame, qui se dégradent. Aucun conjugué pyochéline-antibiotique n'a ainsi pu être obtenue par chimie click dans le cadre de notre projet. A défaut nous avons tenté de greffer des oxazolidinones directement sur le vecteur **119**, sans passer par des esters activés. De façon très étonnante, nous avons ainsi pu isoler trois conjugués pyochéline-oxazolidinone **163**, **165** et **166**, totalement inédits, et pourvus de bras espaceur de longueurs et de propriétés chimiques

variables. Outre d'importants problèmes de solubilité dans les milieux physiologiques, ces conjugués n'ont malheureusement pas présenté les activités antibiotiques espérées. En outre, le protocole de dissolution des composés **163**, **165** et **166**, utilisant de la soude 1N semble dégrader les conjugués qui sont clivés au niveau de l'amide liant le vecteur au bloc bras espaceur-antibiotique. Les transports de ^{55}Fe observés avec nos conjugués sont donc probablement le résultat de la capacité du vecteur seul **151** à transporter le métal dans la bactérie. La chimie de la pyochéline est une chimie complexe, principalement à cause de la stabilité relative de ce sidérophore et de la présence de centres asymétriques. Ceci explique pourquoi les groupes travaillant sur ce type de vecteurs dans le cadre d'approche de type cheval de Troie restent rares. Les résultats obtenus au cours de ce projet de thèse ont permis d'accroitre les connaissances de notre équipe sur ce système de vectorisation particulièrement prometteur dans le cadre d'approches thérapeutiques contre *P. aeruginosa.* Les résultats obtenus montrent que la conjugaison entre des vecteurs pyochéline et des antibiotiques par chimie click n'est pas favorable compte tenu de la dégradation des vecteurs pyochéline et des antibiotiques β-lactames dans ces conditions réactionnelles. Afin de poursuivre le développement de ce type d'approches fondées sur la pyochéline il sera donc nécessaire de mettre au point de nouveaux bras espaceurs et de nouveaux modes de connexion chimique entre le vecteur et son antibiotique. Un autre point crucial dans cette stratégie est le manque de solubilité des conjugués antibiotique pyochéline ; C'est un problème récurrent, déjà rencontré par notre équipe pour les conjugués avec les fluoroquinolones. [121] Ce problème handicape fortement l'évaluation biologique et donc l'optimisation itérative de nos conjugués. Ne pouvant diminuer l'hydrophobicité du sidérophore, ni celle de la majorité des antibiotiques vectorisables, le développement futur de ce projet passe par la découverte de bras espaceurs capable d'apporter à la fois stabilité et solubilité aux conjugués. La vectorisation d'antibiotiques plus solubles en milieu aqueux, comme des peptides ou de peptidomimétiques pourrait aussi apporter de nouveaux développements pour ce projet.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES

La recherche de nouvelles stratégies antibactériennes est aujourd'hui une nécessité face à l'émergence de souches de plus en plus résistantes à l'arsenal thérapeutique actuel. Dans ce contexte tout un ensemble de nouvelles techniques se développent comme la photothérapie, d'autres réémergent, comme la phagothérapie. Ainsi la vectorisation des antibiotiques par des nutriments est une stratégie ancienne qui réapparait régulièrement depuis les années 70, retrouvant cycliquement l'intérêt à la fois de la communauté académique et de l'industrie pharmaceutique. Ce type de vectorisation s'est tout d'abord intéressé à la vectorisation par des nutriments réputés nécessaires comme les glucides, dont les voies de transport étaient mieux décrites. Cette approche a rapidement montré ses limites puisque les voies métaboliques étant interconnectées, les sources d'hydrates de carbone peuvent être substituées sans affecter la croissance de la bactérie tout en impactant fortement l'efficacité des conjugués. Cette stratégie renait au début des années 90 avec l'idée que l'utilisation d'un nutriment non métaboliquement substituables pouvait conduire à des applications plus robustes dans le temps. Le fer est apparu comme une évidence tant ce métal est nécessaire à la croissance et à la prolifération de la quasi-totalité des pathogènes bactériens. Evaluées sur *Escherichia coli* les premières approches ont amenés les premières preuves de concept mais le manque de données fondamentales sur les systèmes de transport du fer chez des organismes de pathogénicité plus affirmée conduit une nouvelle fois cette stratégie à être temporairement délaissée. La fin des années 90 et surtout le début des années 2000, le séquençage exhaustif du génome de nombreux pathogènes, dont *Pseudomonas aeruginosa*, a permis un bond dans l'étude et la compréhension des mécanismes de transport du fer chez nombre de bactéries pathogènes pour l'être humain. Cette connaissance a permis de rationaliser la conception de nouvelles générations de conjugués sidérophores-antibiotiques. Mentionnons ici les travaux de l'équipe du Professeur Marvin Miller aux Etats-Unis ou ceux des Pr. Lothar Heinisch et Ute Möllmann à Tübingen en Allemagne qui restent des initiateurs significatifs de la chimie des sidéromycines de synthèse. Ce souffle aurait pu retomber, comme précédemment, mais il a bénéficié de la prise de conscience institutionnelle et industrielle de la menace croissante que faisait peser la résistance aux antibiotiques pour l'ensemble de la population mondiale. Les compagnies pharmaceutiques, qui ont délaissé ce secteur de la recherche il y a une trentaine d'année pour se tourner préférentiellement vers des pathologies de civilisation, réinvestissent massivement dans le domaine de la recherche anti-infectieuse depuis quelques années seulement. Il y a donc actuellement une conjonction d'évènements très favorables qui

offre à la vectorisation d'antibiotique par les sidérophores une audience particulièrement attentive et…des financements. Le nombre de groupes travaillant de ce domaine s'accroit si on se base sur les publications récentes et ce domaine de recherche trusté par quelques groupes en Europe et aux Etats-Unis a largement essaimé. L'intérêt industriel pour ce type d'approche s'est confirmé avec le passage en phases cliniques de plusieurs conjugués sidérophores-antibiotiques par de grands groupes comme *GSK* ou *Pfizer* mais aussi d'entreprises plus petites qui ont choisi cette niche pour se développer comme *Basilea Pharmaceutica.* Ces molécules actuellement dans les pipelines sont finalement très similaires : un vecteur catéchol, ou mimant un catéchol, lié de façon covalente, et stable *in vivo*, à un antibiotique de la famille des β-lactames. Des structures convenues, efficaces mais dont le développement n'a que peu exploité les énormes quantités de données amassées notamment par les équipes académiques sur les systèmes de transport du fer chez les bactéries pathogènes. Ces molécules ont le mérite de montrer que cette stratégie longtemps qualifiée de théorique et illusoire est désormais une piste majeure pour la découverte de nouveaux antibiotiques en particulier contre les bactéries Gram-négatives pour lesquelles les alternatives thérapeutiques restent retreintes, même en tenant compte des molécules actuellement dans les pipelines. Avec le début de phases cliniques apparaissent les premiers revers, abandon du MC1 pour des questions de résistance, toxicité significative pour le BAL30072, etc. Le risque est donc grand de voir s'éteindre cet intérêt des industriels de la pharmacie pour notre sujet d'étude. Il y a donc une nécessité pour les laboratoires académiques de continuer à fournir des données permettant d'amplifier l'essor de cette stratégie et son application dans le domaine thérapeutique. Il revient aux chercheurs du domaine de « voir plus loin », de tester des approches plus risquées, de diversifier la palette des vecteurs sidérophores utilisables, de multiplier les familles d'antibiotiques vectorisables, d'approfondir la connaissance des mécanismes du fer sur l'ensemble des bactéries pathogènes, de valider de nouveaux bras espaceurs clivables *in vivo*, etc. Notre projet s'inscrit parfaitement dans cet optique et se veut une contribution, modeste, à ce domaine actuellement en plein bouillonnement.

Dans le cadre de ce projet nous nous sommes attachés à ne jamais séparer la synthèse chimique de l'évaluation biologique, tant des vecteurs mis au point que des conjugués synthétisés. Nous avons ainsi synthétisé des sidérophores d'*Azotobacter vinelandii*, l'aminochéline (mono-catécholé) et l'azotochéline (bis-catécholé) et montré que ces sidérophores exogènes sont utilisables par *P. aeruginosa* et sont capables de promouvoir sa croissance en milieu carencé en fer. Nous avons aussi montré que l'azotochéline ferrique

utilise notamment le système de transport entérobactine-dépendant pour entrer dans la bactérie. L'azotochéline induit d'ailleurs l'expression du transporteur PfeA spécifique de l'entérobactine chez *P. aeruginosa*. La voie de transport empruntée par l'aminochéline reste elle indéterminée mais nos résultats permettent d'exclure l'implication de la voie entérobactine-dépendante. En nous inspirant des structures de l'aminochéline et de l'azotochéline nous avons synthétisé deux vecteurs sidérophore, respectivement le MCV et le BCV qui présente les mêmes propriétés biologiques que les sidérophores pères vis-à-vis de *P. aeruginosa*. Les vecteurs BCV, et dans une moindre mesure MCV, sont des candidats particulièrement prometteurs pour être conjugués à des antibiotiques. BCV et MCV ont été dotés lors de la synthèse d'une fonction alcyne terminale. Cette dernière est susceptible de réagir avec la fonction azoture d'un antibiotique pour générer le conjugué attendu grâce à une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire (chimie click). Dans la construction des conjugués, nous avons choisi de faire un pari risqué : tenter d'utiliser ces vecteurs pour améliorer les performances d'antibiotiques connus pour ne pas avoir d'activité sur notre pathogène modèle. Dans ce contexte, notre choix s'est porté sur les oxazolidinones, une famille d'antibiotiques récents, dont le linézolide est le composé phare. Cet inhibiteur de la synthèse des protéines qui interagit avec le ribosome est un antibiotique très puissant utilisé dans les infections dues à des bactéries Gram-positives résistantes à la vancomycine. Cet antibiotique n'a pas contre que peu d'activité sur les bactéries Gram-négatives. Ce différentiel d'activité provient de l'incapacité des oxazolidinones à s'accumuler dans les microorganismes Gram-négatifs, principalement par défaut de perméabilité de l'enveloppe et de mécanismes d'efflux. Ces antibiotiques semblaient donc pouvoir bénéficier de la vectorisation par les sidérophores et voir ainsi leur spectre d'activité élargi à de nouvelles espèces bactériennes dont *P. aeruginosa*. Six oxazolidinones munies de fonctions azotures terminales ont été synthétisées puis mises en réaction dans les conditions de chimie click avec les vecteurs MCV et BCV, munis eux d'une fonction alcyne terminale. Six conjugués MCV-oxazolidinones et six conjugués BCV-oxazolidinones ont ainsi été synthétisés. Antibiotiques et vecteurs sont liés par l'intermédiaire d'un motif 1,2,3-triazole. Ce motif est considéré comme non hydrolysable par le bagage enzymatique connu de *P. aeruginosa*. Ces composés ont ensuite été évalués pour leur capacité à inhiber la croissance de *P. aeruginosa* dans différents milieux de culture. La totalité des conjugués testés sont plus actifs que le linézolide utilisé comme référence ce qui fait de ces composés les oxazolidinones les plus actives contre *P. aeruginosa* décrites à ce

jour. Néanmoins les meilleures CMIs relevées ne dépassent pas 128 µM ce qui reste tout de même un résultat très éloigné des antibiotiques utilisés actuellement contre ce microorganisme. De plus, parmi les conjugués testés, certains étaient dotés d'un bras de type [(1,2,3-triazol-1-yl)]-méthyl-carbamate que nous avons mis au point dans le cadre de ce projet afin de tester si ce type de motif pouvait être clivé *in vivo*. Les résultats obtenus ne semblent pas confirmer notre hypothèse. L'optimisation des propriétés de nos conjugués passait par l'étude de leurs propriétés biologiques. En nous focalisant sur des conjugués issus du couplage du BCV avec les oxazolidinones nous n'avons pas été en mesure de prouver que ces conjugués étaient capables de transporter le fer dans la bactérie à l'image du vecteur BCV isolé. Le manque de solubilité des chélates ferrique des conjugués n'a pas permis de mener à bien les expériences de transport de ^{55}Fe nécessaires pour conclure sur ce point. Nous avons alors utilisé une méthode indirecte, utilisant les conjugués seuls, plus solubles que les chélates correspondants. La protéomique a ainsi montré que si le BCV semble capable d'induire l'expression des protéines impliquées dans le système de transport entérobactine-dépendant, les conjugués d'oxazolidinones présentent quant à eux un effet bien moindre sur cette induction. Ce résultat pourrait indiquer une moindre capacité pour le BCV à rejoindre les compartiments internes de la bactérie lorsqu'un antibiotique y est conjugué. Un autre facteur expliquant la faiblesse relative des CMIs est venue par les biologistes de l'équipe qui étudient la voie de transport de fer entérobactine-dépendante chez *P. aeruginosa*. Nous avions débuté ce travail avec la conviction, que les mécanismes de transport de ce sidérophore étaient similaires chez *E.coli* et chez *P. aeruginosa*. A l'issue des recherches menées par les biologistes, en partie sur la base des molécules décrites dans ce manuscrit, il est désormais clair que ces deux systèmes diffèrent principalement sur le destin de l'entérobactine ferrique une fois le périplasme atteint. Chez *E. coli*, le complexe est importé dans le cytoplasme où le fer est libéré, alors que chez *P. aeruginosa*, l'entérobactine ferrique est dissociée dans le périplasme et seul le fer continue sa route vers le cytoplasme. Ce détail à son importance dans le cadre de notre approche puisque si l'entérobactine ne dépasse pas le périplasme lors du transport, la vectorisation efficace d'antibiotiques à cible cytoplasmique comme les oxazolidinones reste problématique. Les CMI observées avec les conjugués BCV-oxazolidinones sont probablement le reflet de l'accumulation des conjugués dans le périplasme et leur diffusion lente et parcimonieuse au travers de la membrane interne.

Si les conjugués MCV- et BCV-oxazolidinones n'ont pas pour l'instant conduit à des antibiotiques efficaces, ils ont été des outils moléculaires sans pareil pour disséquer finement

la voie de transport entérobactine-dépendante chez *P. aeruginosa* et ont mis en lumière toute la complexité et l'importance des systèmes d'import du fer dépendants de sidérophores exogènes chez *P. aeruginosa.* Les molécules décrites dans ce manuscrit sont actuellement au centre des recherches entreprises par le consortium ND4BB Translocation, où la biologie structurale (Université de St Andrews), la protéomique (Pr. Dirk Bumann, Biozentrum, Suisse) ou la modélisation (Pr. Matteo Ceccarelli, Université de Cagliari, Italie) contribuent aujourd'hui à décrire de façon exhaustive cette voie de transport. L'implication d'entreprises telle *GSK*, *Sanofi* ou *Basilea Pharmaceutica* dans ce consortium montre tout l'intérêt thérapeutique que pourrait avoir cette voie d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa.*

En parallèle notre projet s'est intéressé à la vectorisation d'antibiotiques par la pyochéline, cette fois un sidérophore endogène de *P. aeruginosa.* Les études antérieures menées au laboratoire ont montré que ce sidérophore a un destin cytoplasmique. Il devait donc être plus adapté à la vectorisation des oxazolidinones que les sidérophores catécholés mimant l'entérobactine. En utilisant comme base une pyochéline fonctionnalisée en position N3" nous avons synthétisé trois pyochéline « clickables». Afin d'augmenter nos chances d'obtenir des conjugués pyochélines-antibiotiques actifs nous avons cette fois choisi deux familles d'antibiotiques : les oxazolidinones mais aussi l'ampicilline, dont la cible est périplasmique. Malheureusement, les conditions de chimie click semblent à la fois défavorable à la stabilité de nos vecteurs pyochéline mais aussi à celle de l'ampicilline utilisée comme antibiotique. A l'issue des nombreux tests de couplage il ressort qu'il ne sera pas possible d'obtenir de conjugués entre les vecteurs pyochéline et les deux antibiotiques choisis dans cette approche en utilisant la chimie click. Afin de valoriser les synthons obtenus au cours de cette partie du projet, nous avons tenté un couplage de type peptidique entre la fonction amine d'un vecteur pyochéline et la fonction acide carboxylique de trois oxazolidinones munies de bras espaceurs de longueurs et de propriétés chimiques variables. Grâce à cette stratégie, trois conjugués inédits entre la pyochéline et des dérivés du linézolide ont pu être isolés. Ces conjugués étant peu solubles dans les conditions physiologiques, l'utilisation de soude 1N est requise pour une solubilisation parfaite lors des différentes évaluations biologiques. Malheureusement nos expériences montrent que ces conditions sont délétères pour l'antibiotique et les bras espaceurs, qui sont clivés par la soude à cette

concentration. Le vecteur pyochéline qui est relargué est le seul composé responsable des transports de ^{55}Fe observés dans ces conditions.

Notons que cette réactivité doit aussi nous alerter sur les CMI obtenus sur les conjugués catécholés qui ont été dissouts suivant le même type de protocole. Les mêmes conditions pouvant conduire aux mêmes effets, il convient de reprendre ces expériences et de contrôler quelles sont réellement les molécules en solution au moment du test après traitement à la soude. Une hydrolyse même partielle du conjugué peut signifier que la CMI a été sous-évaluée (destruction de l'antibiotique) et que nos conjugués sont peut-être plus actifs que ce qui est observé. D'un point de vue plus globale, la mise au point de conditions de solubilisation adéquates à la fois pour les conjugués catéchol-oxazolidinones et pyochéline-oxazolidinones est une nécessité avant de pouvoir conclure définitivement sur les propriétés et la portée de ces molécules.

Avec le recul offert par la rédaction de ce manuscrit et par ses trois ans passés à la paillasse il apparaît que grâce à ce projet et aux résultats obtenus des portes ont été fermées mais que d'autres ont été ouvertes, dans ce domaine en pleine expansion de la vectorisation d'antibiotiques par les sidérophores. Les perspectives les plus immédiates sont bien évidemment en relation avec la mise au point de nouveaux vecteurs, s'inspirant d'autres sidérophores exogènes reconnus par *P. aeruginosa* (mycobactine, cépabactine, vibriobactine…) afin de pouvoir donner toute l'efficacité recherchée à notre stratégie. Mais le vecteur n'est peut-être pas la seule partie des conjugués qui requiert un effort de recherche soutenu. L'analogie du Cheval de Troie fausse peut être notre démarche. L'avenir ressemble plus à une fusée à trois étages : la coiffe contenant la charge (antibiotique), le propulseur (sidérophore) et l'étage intermédiaire (le bras espaceur). En prenant cette analogie, l'importance du bras espaceur prend tout son sens. Quelle que soit la nature de la charge, quelle que soit la performance du propulseur, c'est bel et bien l'étage intermédiaire qui permet l'exacte mise en orbite. Si la traversée de l'enveloppe reste cruciale (cheval de Troie), il apparaît avec cette nouvelle analogie que **la découverte de nouveaux bras espaceurs clivables spécifiquement par des enzymes autochtones est l'un des défis principaux à relever pour pérenniser nos approches**. Ce défi ne pourra être relevé que par une connaissance exhaustive du bagage enzymatique exprimé en conditions d'infection. Cette connaissance n'est que très limitée à ce jour pour *P. aeruginosa*. La découverte d'enzymes lytiques spécifiques à un compartiment (périplasme ou cytoplasme) et à un substrat pourrait conduire au développement d'un bras de ce type. La résolution de la structure de l'enzyme et

la modélisation du site actif étant un préalable à la conception d'un tel bras. A titre d'exemple, notre équipe a mis en évidence que la protéine PA2689 est une estérase responsable de l'hydrolyse de l'entérobactine dans le périplasme de *P. aeruginosa*. Cette enzyme a été purifiée, cristallisée et sa structure résolue il y a peu par nos collaborateurs de St Andrews University et le site actif est en cours de modélisation par l'équipe du Pr. Ceccarelli à Cagliari pour mettre au point un tel bras susceptible d'être substrat de PA2689. Nul doute que l'étude des mécanismes de transport de fer, ou de la biosynthèse des sidérophores, chez *P. aeruginosa* pourrait mettre en valeur d'autres enzymes utilisables à notre profit dans ce type de stratégie.

Dans ce contexte, **le nouvel horizon est le relargage contrôlé de l'antibiotique dans le cytoplasme**. Les molécules actuellement en cours de développement par l'industrie pharmaceutique atteignent le périplasme. C'est une chose aisée quand on sait que la taille du cargo importe peu dans le transport au travers des transporteurs de membrane externe. L'exemple de la microcine E492 et de son peptide antibiotique de plus de 80 acides aminés montre l'ampleur des changements conformationnels qui permettent l'ouverture d'un pore au sein du transporteur. Par contre, le passage des ferri-sidérophores au travers de la membrane interne est lié à la présence de protéine ABC ou de perméases, protéines permettant le transfert transmembranaires grâce à des changements conformationnels plus discrets. La taille du cargo s'en retrouve limitée et les interactions fortes existant parfois entre ces transporteurs et leurs substrats spécifiques peuvent être impactées par la présence de l'antibiotique vectorisé. A nouveau, seule une parfaite connaissance, tant structurale que fonctionnelle, des protéines de membrane interne en charge de l'import des sidérophores vers le cytoplasme peut nous permettre d'avancer dans ce type de projet. Il reste donc énormément de travail aux biologistes pour éclairer notre connaissance de l'aval des systèmes de transport du fer.

Enfin, à ce jour les conjugués sidérophore-antibiotique décrits à ce jour se contentent de vectoriser des antibiotiques déjà mis sur le marché. **L'avenir est probablement dans la vectorisation d'entités chimique bactéricides ou bactériostatiques innovantes**. Dans un premier temps, la conjugaison avec des antibiotiques « déclassés » par les industriels au cours des phases cliniques pour des raisons de toxicité ou de résistance précoce pourrait permettre de redonner un potentiel thérapeutique à ce type de molécule. La vectorisation par un sidérophore peut en effet contrer certains mécanismes de résistance (suppression des voies d'import, processus d'efflux) en favorisant l'accumulation du composé actifs dans la bactérie.

L'effet de concentration attendu dans la bactérie pourrait dans le même temps limiter l'exposition des cellules de l'hôte aux effets secondaires observés avec l'antibiotique non vectorisé.

La vectorisation d'entités chimiques dont le potentiel antibiotique est moins consensuel pourrait aussi amener des avancées importantes dans notre domaine. Les peptides sont souvent des molécules présentant d'intéressantes propriétés pharmacologiques avec des propriétés inhibitrices sur un grand nombre de cibles biologiques isolées. Les peptides sont ainsi souvent des composés « tête de série » intéressants mais leurs utilisations thérapeutiques restent très limitées compte tenu de leur faible capacité à traverser les membranes, leur sensibilité aux hydrolases et leur immunogénicité. Ces défauts ont limité fortement, l'utilisation de peptides comme antibiotiques. Dans ce contexte **la vectorisation par les sidérophores pourrait permettre d'améliorer notablement les propriétés thérapeutiques de certains peptides d'intérêt**, dans le contexte de la lutte anti-bactérienne. En effet, la conjugaison avec un sidérophore devrait permettre aux peptides d'utiliser les systèmes de transport du fer pour traverser les membranes. En outre, la conjugaison avec un sidérophore peut aussi rendre le peptide « furtif », en diminuant sa sensibilité aux exoprotéases. Dans le cadre de cette approche le remplacement d'un peptide par un peptidomimétique peut aussi contrer l'effet des hydrolases. De telles approches sont déjà en cours d'étude au laboratoire, principalement en collaboration, sur la protéine TonB, le régulateur Fur ou la β clamp (PCNA bactérien). Une autre thématique actuellement en plein développement au laboratoire bénéficiera des données recueillies par notre projet et traite de **l'utilisation des sidérophores pour vectoriser des métaux antibactériens**. Si les métaux sont pour certains nécessaires au métabolisme des êtres vivants, d'autres métaux sont plutôt délétères aux processus biologiques. Ils ont donc été d'emblée bannis des pharmacopées occidentales modernes à part dans le cas de pathologies lourdes comme le cancer, où l'usage de métaux comme les dérivés de platine présente souvent une balance risque/bénéfice en faveur du patient. Si des traitements contre les pathologies infectieuses par les métaux ont été utilisées au début du siècle dernier (la tuberculose par les sels d'or, la syphilis par les sels de mercure, la maladie du sommeil par des dérivés d'arsenic, etc.) ils ont été abandonnés avec l'émergence de composés organiques plus efficaces et bien moins toxiques. Après un siècle de compétition entre l'ingéniosité des chimistes médicinaux et la capacité des bactéries à muter rapidement, la résistance croissante des pathogènes à l'arsenal antibiotique classique est devenue une réalité. Les décès de patients en impasse thérapeutique deviennent de plus en plus fréquents,

en particulier en milieu hospitalier où des souches particulièrement résistantes peuvent exister malgré les progrès de l'hygiène. L'usage d'antibiotiques efficaces mais présentant une toxicité croissante est ainsi devenu une nécessité. Les antibiotiques de dernière ligne, utilisés actuellement présentent ainsi des profils de toxicité particulièrement importants se rapprochant même des syndromes post-chimiothérapie (modification de la formule sanguine, troubles neurologiques, oto-, néphro-, hépato-toxicité, etc.) dans ce nouveau contexte, les composés organométalliques retrouvent tout leur intérêt, en particulier dans le cadre d'approches par vectorisation. Les propriétés bactéricides des métaux ont été utilisées, notamment par les médecines traditionnelles, depuis la plus haute antiquité. L'utilisation des sidérophores et de leurs propriétés chélatrices pourraient donc être exploitées pour importer des métaux antibactériens à l'intérieur de la bactérie. Cette stratégie souffre néanmoins de nombreuses limitations liées notamment aux mécanismes de régulation, et d'efflux mais aussi à l'impact délétère d'ions métalliques libres sur les cellules de l'hôte.

L'approche est ici radicalement différente : conserver le site de complexation du fer sur le sidérophore afin de préserver la capacité du complexe ferrique à rejoindre les compartiments internes de la bactérie sans être efflué. Le métal antibactérien est quant à lui greffé de façon covalente sur le vecteur, en lieu et place de l'antibiotique ou du peptide/peptido-mimétique antibactérien : l'antibiotique est ici un métal. Cette liaison covalente diminue ainsi la quantité de métal libre, potentiellement toxique pour l'hôte. Les approches actuellement en plein développement au laboratoire se focalisent sur des métaux intrinsèquement bactéricides (or, cuivre), des métaux générant du CO *in situ* (cobalt carbonyle) ou des complexes de métaux générant des radicaux (ruthénium, iridium).

Enfin une des leçons les plus importantes de ma thèse est que lorsque l'on traite un sujet principal, il arrive, comme c'est le cas pour les projets présentés dans ce manuscrit que les résultats peuvent apparaitre moins ambitieux qu'espérés. Il arrive aussi qu'un sujet accessoire prenne parfois une dimension inattendue. Ce fut le cas lors de ce travail ou certains synthons développés, et dont la structure n'est pas mentionnée dans ce manuscrit, ont conduit à des résultats très prometteurs. Ces composés ont montré une activité exceptionnelle sur des bactéries…Gram-positives. Certains de ces molécules ont ainsi atteint des CMI de 0.125 µg/mL contre des souches de référence de *Staphylococcus aureus*, d'*Enterococcus faecium* et d'*Enterococcus faecalis* résistantes à la vancomycine. Des valeurs de CMI comprises entre 1

et 0.125 µg/mL ont été obtenues sur un panel de 50 souches cliniques de ces trois microorganismes. La toxicité aigüe évaluée sur hépatocytes sains en culture a été estimée à 20 µM pour le composé tête de série, ce qui le place de façon satisfaisante parmi les antibiotiques de dernière ligne utilisés actuellement pour ce type d'infection. Ces résultats ont conduit la SATT conectus à contribuer à un fond de maturation pour évaluer la brevetabilité de ces structures.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les produits obtenus ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice commerciale ou demetallée Merck Kieselgel 60 (63-200 µm) ou par une chromatographie Flash sur Reveleris (Grace) avec des cartouches de « Silice Haute Performance » 30 µm Interchim. Les pyochélines fonctionnalisées sont purifiées sur colonne de silice démétallée. Tous les solvants de réactions proviennent de sources commerciales 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 CCM Merck SilicaGel 60 F_{254} (0.25 mm) en plaque d'aluminium. Les plaques CCM sont révélées sous UV, par une solution de $KMnO_4$, par une solution de ninhydrine, ou par des vapeurs d'iode. Les spectres RMN ^{1}H, ^{13}C et ^{19}F ont été effectués dans le chloroforme, l'acétone ou le méthanol deutérés sur un spectromètre Bruker Avance 400 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm, en utilisant le pic résiduel du solvant comme référence interne. La multiplicité des signaux est 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 indiqués par un "l" après la multiplicité du signal. Le cas échant, les constantes de couplage sont données en Hz. 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. Les spectres de masse basse résolution sont enregistrés sur un appareil Bruker Daltonic MicroTOF et ceux de haute résolution sur un appareil QToF.

I. Procédures générales

Procédure générale 1 Réduction de l'azoture et acylation en présence de DIPEA

A une solution d'azoture dans du méthanol (0,01 mol/L), est ajouté le chlorure de cobalt hexahydraté (2,0 eq) dissout dans 5 mL d'eau. Le $NaBH_4$ (5,0 eq) est ajouté en portion à 0 °C. Après 30 min à 20 °C, la solution est diluée dans l'eau milliQ, et est extraite trois fois avec du CH_2Cl_2. Les phases organiques sont assemblées, lavées avec une solution de NaCl saturée, séchées sur Na_2SO_4, filtrées et évaporées sous pression réduite. L'amine résultante est reprise dans le CH_2Cl_2 (0,05 mol/L) puis la DIPEA (3,0 eq) est ajoutée, puis l'anhydride acétique

(2 eq). Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/ EtOH).

Procédure générale 2 Réduction de l'azoture et acylation en présence d'EDCI.

A une solution d'azoture (1 eq) dans du méthanol (0,01 mol/L), est ajouté le chlorure de cobalt hexahydraté (2,0 eq) dissout dans 5 mL d'eau. Le $NaBH_4$ (5,0 eq) est ajouté en portion à 0 °C. Après 30 min à 20 °C, la solution est diluée dans l'eau milliQ, et est extraite trois fois avec du CH_2Cl_2. Les phases organiques sont assemblées, lavées avec une solution de NaCl saturée, séchées sur Na_2SO_4, filtrées et évaporées sous pression réduite. L'amine résultante est reprise dans le CH_2Cl_2 (0,05 mol/L) puis l'acide (1,2 eq) et l'EDCI.HCl (1,2 eq) sont ajoutés successivement. La solution est agitée à température ambiante puis le milieu réactionnel est adsorbé sur silice et est purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH).

Procédure générale 3 Substitution par un azoture

L'azoture de sodium (5 eq) est ajouté à une solution du dérivé mésylé ou chloré dans la DMF (0,1 mL). La solution est portée 75 °C pendant 5 à 18 h. Le milieu réactionnel est versé dans un mélange eau/glace. Le produit est isolé par filtration sous pression réduite.

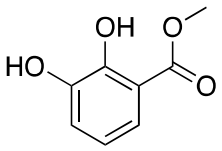
Procédure générale 4 Synthèse des conjugués catéchols – oxazolidinones par chimie click.

L'azoture (1 eq) et le l'alcyne (1,2 eq) sont solubilisé dans le THF (0,1 M). Une solution de cuivre (200 mg/mL, 1 eq), puis l'ascorbate de sodium (5 eq.) sont ajoutés. Le milieu est soniqué puis agité à 25 °C sous argon pendant 2 h. Le milieu réactionnel est filtré sur célite puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice (CH_2Cl_2/EtOH) pour conduire au conjugué protégé. Le produit est ensuite déprotégé dans un mélange CH_2Cl_2/TFA/TIS/EtOH (70/20/5/5, 5 mL pour 0,1 mmol d'alcyne). Le milieu réactionnel est agité à 25 °C, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans un minimum de THF puis du cyclohexane est ajouté jusqu'à précipitation du produit. Le précipité est filtré sur un entonnoir de Hirsch.

II. Protocoles et caractérisation des produits

Méthyl 2,3-dihydroxybenzoate 68

L'acide 2,3-dihydroxybenzoique **66** (5 g, 32,4 mmol) est solubilisé dans le chlorure de thionyle (15 mL). La solution est portée à reflux à 79 °C. A l'arrêt de l'émission gazeuse, l'excès de chlorure de chlorure thionyle est éliminé sous pression réduite. A 0 °C, l'huile jaune obtenue est solubilisée dans un mélange MeOH/Et_3N (17 mL/ 7 mL). La solution est agitée pendant une nuit à 20°C, puis est adsorbée sur silice avant d'être purifié par chromatographie sur gel de silice (CH_2Cl_2 puis CH_2Cl_2 /EtOH 9:1) pour conduire au composé **68** isolé sous forme d'un solide blanc (5,27 g, 31,3 mmol, rendement : 97%).

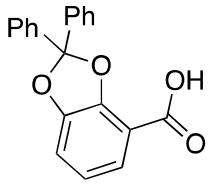


Rf : 0.41 (cyclohexane/ CH_2Cl_2 1/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.77 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 171.8, 150.9, 147.0, 121.6, 121.0, 120.0, 113.5, 53.0. MS (ESI) *m/z* : 169 $[M+H]^+$

Acide 2,2-diphénylbenzo[*d*][1,3]dioxole-4-carboxylique 69

Le dichloro-diphénylmethane (6,78 mL, 35,2 mmol) est ajouté au produit **68** (4,92 mg, 29,3 mmol) sous argon. Le milieu est alors agité et chauffé à 160 °C jusqu'à l'arrêt de l'émission de gaz (environ 2 h). Le milieu, revenu à température ambiante sous argon, est dissout dans de l'acétate d'éthyle (150 mL) puis est lavé par une solution saturée de $NaHCO_3$ puis par une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans le THF (150 mL), le potassium triméthylsilanolate est ajouté, et le milieu laissé à 25 °C pendant une nuit. Le THF est éliminé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans une solution aqueuse saturée d'acide citrique. Après plusieurs extractions au chloroforme, les phases organiques sont collectées, lavées à la saumure, séchées sur Na_2SO_4, filtrées avant d'être adsorbées sur gel de silice. Le produit est

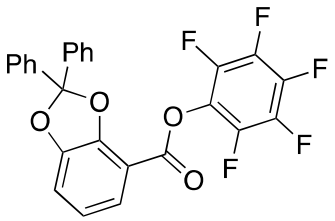
alors purifié par chromatographie sur colone de silice (Cyclohexane/CH_2Cl_2 1/1 puis CH_2Cl_2/EtOH 9/1) pour conduire au dérivé **69** isolé sous la forme d'un solide jaune. (5,10 g, 16,0 mmol, rendement : 55%)



Rf : 0.40 (CH_2Cl_2/EtOH 96:4). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.63-7.60 (m, 4H), 7.47 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.40-7.35 (m, 6H), 7.06 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.87 (dd, J = 7.7, 8.2 Hz, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 169.5, 149.0, 148.6, 139.8, 129.6, 128.6, 126.6, 123.5, 121.6, 118.5, 113.4, 112.3. MS (ESI) *m/z* : 319.1 $[M+H]^+$, 341.1 $[M+Na]^+$.

Pentafluorophényl 2,2-diphényl-2H-1,3-benzodioxole-4-carboxylate 67

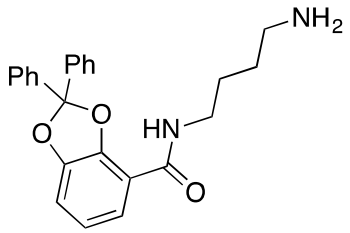
Une solution d'acide **69** (500 mg, 1,57 mmol), de pentafluorophénol (362 mg, 1,97 mmol) et de DCI (248 mg, 300 µL, 1,97 mmol) dans un mélange acétonitrile/pyridine (9:1, 5 mL) est agitée à 21 °C pendant 12 h. Le milieu réactionnel est adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur colonne de silice (Cyclohexane puis cyclohexane/CH_2Cl_2 80/20). L'ester **67** est ainsi isolé sous la forme d'un solide blanc (709 mg, 1,46 mmol, rendement : 93%).



Rf : 0.50 (Cyclohexane/CH_2Cl_2 1/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.71-7.67 (m, 4H), 7.59 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.46-7.39 (m, 6H), 7.18 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.96 (dd, J = 7.7, 8.3 Hz, 1H). RMN ^{19}F (400 MHz, $CDCl_3$) δ -152.0, -158.1. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 160.5, 149.6, 148.9, 139.7, 136.9, 129.6, 128.6, 126.5, 123.4, 121.9, 119.0, 114.2, 109.8. MS (ESI) *m/z* : 485.0 $[M+H]^+$.

***N*-(4-aminobutyl)-2,2-diphénylbenzo[d][1,3]dioxole-4-carboxamide 70**

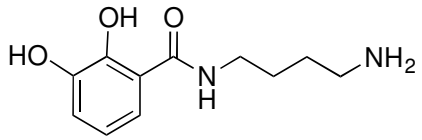
A une solution de 1,4-diaminobutane (311 µL, 3,01 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) est ajouté goutte à goutte une solution de l'ester de pentafluorophénol **67** (300 mg, 0,619 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL). La réaction est agitée à 20 °C pendant 2 h. Le milieu réactionnel est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (CH_2Cl_2/NH_4OH 99/1 puis $CH_2Cl_2/EtOH/NH_4OH$ 90/19/1) pour conduire à l'amine **70** sous forme d'un solide amorphe. (233 mg, 0,60 mmol, rendement : 97%).



Rf : 0.28 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.56-7.49 (m, 5H), 7.39-7.36 (m, 6H), 7.19 (dd, J = 6.6, 4.5 Hz, 1H), 6.98 (dd, J = 1.45, 7.66 Hz, 1H), 6.91 (t, J = 7.91 Hz, 1H), 3.51-3.46 (m, 2H), 2.71 (t, J = 6.91 Hz, 2H), 1.69-1.62 (m, 2H), 1.56-1.50 (m, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 163.7, 147.3, 144.7, 139.3, 129.8, 128.6, 126.5, 122.6, 122.2, 118.2, 116.2, 111.7, 41.9, 39.7, 31.1, 27.2. HRMS (ESI): $C_{24}H_{24}N_2O_3$: calculée: 388.17869, trouvée: 388.17916.

Aminochéline 63

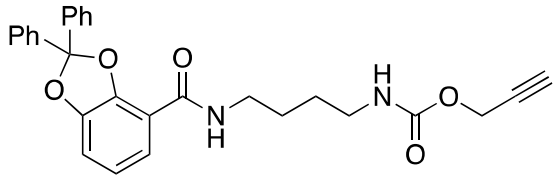
A une solution du catéchol **70** (87 mg, 0,18 mmol) dans le CH_2Cl_2 (2 mL) est ajouté le TFA (0,5 mL, 6,73 mmol), du triisopropylsilane (0,15 mL, 0,73 mmol), et l'éthanol (0,15 mL, 2,57 mmol). Le milieu réactionnel est agité 12 h à 22 °C puis les solvants sont éliminés sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans le THF, et du cyclohexane est ajouté jusqu'à précipitation du produit. Le précipité est isolé par filtration. L'aminochéline **63** est ainsi isolé sous forme d'un solide blanc (22 mg, 0,10 mmol, rendement : 55%).



RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.7 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 7.74 (sl, 3H), 7.28 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.69 (dd, J = 8.4, 7.7 Hz, 1H), 3.33-3.31 (m, 2H), 2.82 (sl, 2H), 1.62-1.55 (m, 4H) RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 170.3, 150.2, 146.7, 119.3, 118.4, 117.6, 115.4, 39.3, 38.7, 26.4, 25.1.

Prop-2-yn-1-yl (3-(2,2-diphénylbenzo[d][1,3]dioxole-4-carboxamido)propyl) carbamate 71

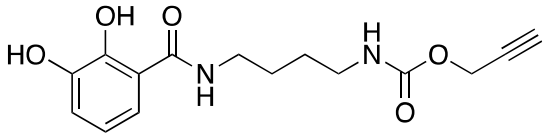
L'amine **70** (800 mg, 2,06 mmol) est solubilisée dans le dichlorométhane (10 mL, puis la DIPEA (1 mL, 6,05 mmol) et le propargylchloroformate (0,25 mL, 2,47 mmol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 12 h à 24 °C sous argon. Le milieu réactionnel est adsorbé sur ssilice puis purifié sur colonne de silice (CH_2Cl_2/EtOH 95/5) pour conduire à l'alcyne **71** isolé sous forme d'un solide blanc (871 mg, 1,85 mmol, rendement : 90%).



Rf : 0.41 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.49-7.42 (m, 5H), 7.35-7.28 (m, 6H), 7.09 (dd, J = 6.2, 4.9 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 6.83 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 5.1 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.41 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.13 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.43 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.61-1.47 (m, 4H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 163.7, 155.6, 147.2, 144.6, 139.1, 129.7, 128.5, 126.4, 122.5, 122.1, 118.2, 115.9, 111.7, 78.4, 74.5, 52.3, 40.8, 39.3, 27.3, 27.0. HRMS (ESI): $C_{28}H_{26}N_2O_5$: calculée: 470.18417, trouvée: 470.18502.

Prop-2-yn-1-yl (3-(2,3-dihydroxybenzamido)propyl)carbamate 65

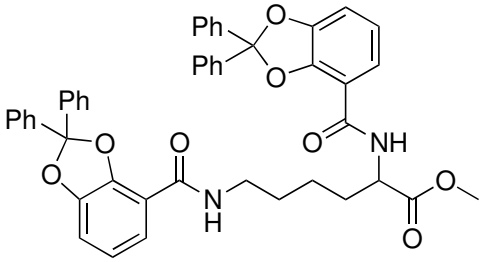
A une solution du catéchol **71** (200 mg, 0,42 mmol) dans le CH_2Cl_2 (2 mL) est ajouté le TFA (0,5 mL, 6,73 mmol), du triisopropylsilane (0,15 mL, 0,73 mmol), et l'éthanol (0,15 mL, 2,57 mmol). Le milieu réactionnel est agité 12 h à 22 °C puis les solvants sont éliminés sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans le THF, et du cyclohexane est ajouté jusqu'à précipitation du produit. Le précipité est isolé par filtration. Le catéchol **65** est ainsi isolé sous forme d'un solide blanc (113 mg, 0,37 mmol, rendement : 87%).



RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 13.04 (sl, 1H), 8.04 (sl, 1H), 7.12 (dd, J = 1.5, 8.1 Hz, 1H), 6.82 (dd, J = 1.4, 7.8 Hz, 1H), 6.57 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.30 (sl, 1H), 4.5 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.31 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 3.31 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 2.82 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 2.72 (s, 1H), 1.57-1.42 (m, 4H). RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD): δ 171.6, 158.1, 150.4, 147.4, 119.6, 118.7, 116.9, 79.6, 75.7, 53.1, 41.6, 40.2, 28.3, 27.7.

Méthyl N^2,N^6-bis(2,2-diphénylbenzo[*d*][1,3]dioxole-4-carbonyl)lysinate 73

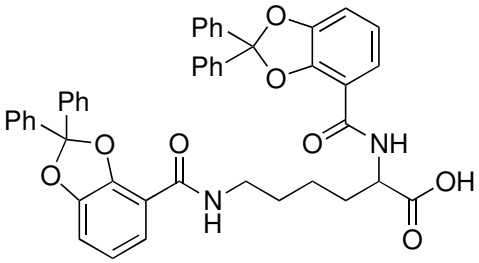
A une solution d'ester méthylique de (L)-lysine **72** (750 mg, 3,22 mmol) et de DIPEA (1,64 mL, 10,1 mmol) dans le CH_2Cl_2 (10 mL) est ajoutée au goutte à goutte l'ester de pentafluorophénol **67** (3,27 g, 6,76 mmol) en solution dans le CH_2Cl_2 (20 mL). Le milieu réactionnel est agité à 30 °C pendant 16 h, avant d'être lavé avec une solution aqueuse d'acide citrique (10 %). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 puis adsorbé sur silice. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 8/2) pour conduire à l'ester **73** isolé sous la forme d'un solide blanc. (2,11 g, 2,77 mmol, rendement : 86%).



Rf : 0.35 (CH_2Cl_2/EtOH 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.01 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 2.0, 7.2 Hz, 2H), 7.6 (dd, J = 2.3, 7.5 Hz, 2H), 7.56–7.50 (m, 6H), 7.43–7.33 (m, 12H), 7.19 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.02 (dd, J = 7.9, 10.7 Hz, 2H), 6.93 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 4.88 (dt, J = 5.5, 6.9 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.53–3.38 (m, 2H), 2.11–2.02 (m, 1H), 1.96–1.87 (m, 1H), 1.71–1.67 (m, 2H), 1.52–1.44 (m, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 172.8, 164.1, 163.4, 147.5, 147.4, 145.3, 144.9, 139.7, 139.6, 139.2, 129.9, 129.7, 129.6, 128.7, 126.5, 126.2, 122.6, 122.4, 122.3, 118.6, 118.4, 115.9, 115.4, 112.2, 112.0, 52.7, 39.8, 32.6, 29.6, 22.8. MS (ESI) *m/z* 761.3 $[M+H]^+$, 783.3 $[M+Na]^+$. HRMS (ESI): $C_{47}H_{40}N_2O_8$: calculée : 760.2785, trouvée : 760.2792.

N^2,N^6-bis(2,2-diphénylbenzo[*d*][1,3]dioxole-4-carbonyl)lysine 74

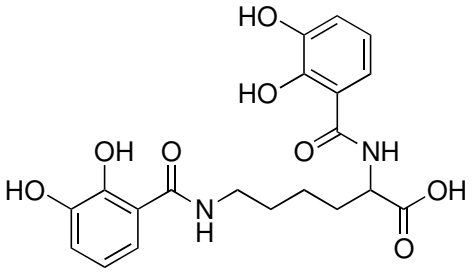
Une solution de l'ester méthylique **73** (2,11 g, 2,77 mmol) dans le THF (13 mL) est traitée par une solution de LiOH monohydrate (1,50 g, 35,8 mmol) dans une solution aqueuse de H_2O_2 35% (13 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 18 h à 23 °C. Le THF est évaporé sous pression réduite. Le résidu aqueux acidifié par ajout d'acide citrique puis est extrait au chloroforme. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4, filtrées puis évaporées sous pression réduite pour conduire à l'acide **74** isolé sous la forme d'un solide blanc. (2,22 g, 2,77 mmol, rendement : 100%).



Rf : 0.50 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.03 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.57–7.48 (m, 8H), 7.35–7.20 (m, 12H), 7.19 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.02 (dd, J = 7.5, 13.9 Hz, 2H), 6.9 (td, J = 6.6, 8.0 Hz, 2H), 4.86 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 3.50–3.34 (m, 2H), 2.11–2.08 (m, 1H), 1.96–1.94 (m, 2H), 1.68–1.63 (m, 2H), 1.54–1.50 (m, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 174.6, 163.8, 147.6, 147.4, 145.0, 139.7, 139.6, 139.2, 129.9, 129.7, 129.6, 128.7, 126.6, 126.2, 122.7, 122.4, 122.3, 115.8, 115.4, 112.3, 112.1, 52.8, 40.0, 32.2, 29.6, 22.7. MS (ESI) *m/z* 747.2 $[M+H]^+$, 770.0 $[M+Na]^+$.

Azotochéline 62

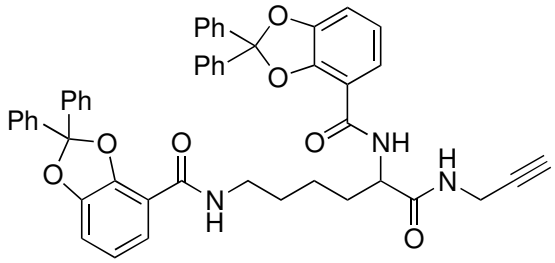
A une solution du azotochéline protégé **74** (150 mg, 0,20 mmol) dans le CH_2Cl_2 (4 mL) est ajouté le TFA (1 mL, 13,5 mmol), du triisopropylsilane (0,2 mL, 0,98 mmol) ; Le milieu réactionnel est agité 48 h à 23 °C puis les solvants sont éliminés sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans le THF, et du pentane est ajouté jusqu'à précipitation du produit. Le précipité est isolé par filtration. Le catéchol **62** est ainsi isolé sous la forme d'un solide blanc (40 mg, 0,096 mmol, rendement : 48%).



RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD): δ 7.32 (dd, J = 8.2, 1.6 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 6.82 (ddd, J = 7.8, 12.4, 1.6 Hz, 2H), 6.70 (dt, J = 14.5, 8.0 Hz, 2H), 4.63 (dd, J = 9.0, 4.9 Hz, 1H), 3.39 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.09–1.99 (m, 1H), 1.96–1.90 (m, 1H), 1.73–1.65 (m, 2H), 1.57–1.52 (m, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 147.3, 138.9, 136.1, 119.8, 119.7, 119.6, 118.7, 53.8, 40.4, 32.4, 30.1, 24.7. HRMS (ESI) : calculée : 418.13762, trouvée : 418.13736

***N,N'*-(6-oxo-6-(prop-2-yn-1-ylamino)hexane-1,5-diyl)bis(2,2-diphénylbenzo[*d*][1,3]dioxole-4-carboxamide) 75**

A une solution de l'acide carboxylique **74** (200 mg, 0,27 mmol) dans le CH_2Cl_2 (7 mL) sont ajouté successivement le HBTU (152 mg, 0,42 mmol), la DIPEA (1 mL, 6,05 mmol), et la propargylamine (34 µL, 0,67 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 20 h à 23 °C. Le milieu réactionnel est ensuite lavé successivement par une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$, à l'eau et par une solution aqueuse d'acide citrique (10%). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée, puis évaporée sous pression réduite avant d'être purifiée par chromatographie sur colonne de silice silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 9/1) pour conduire au BCV protégé **75** sous la forme d'un solide blanc. (183 mg, 0,23 mmol, rendement : 87%).

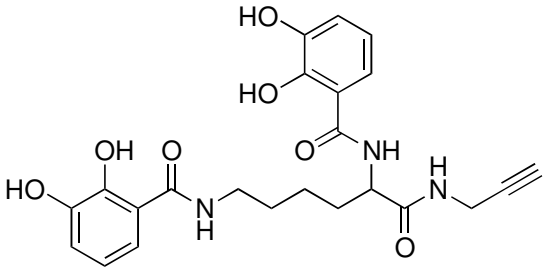


Rf : 0.33 (cyclohexane/AcOEt 1/1). RMN ^{1}H (400 MHz, Acétone-d_6): δ 8.33 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.10 (t, J = 5.2 Hz, 1H) 7.89 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.75–7.70 (m, 4H), 7.67 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 7.58–7.43 (m, 14H), 7.25 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.05 (dt, J = 6.5 Hz, 7.7 Hz, 2H), 4.90 (dt, J = 5.1, 7.1 Hz, 1H), 4.18 (sl, 2H), 3.54 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 2.75 (s, 1H), 2.20-2.11 (m, 2H), 2.06–1.96 (m, 2H), 1.82–1.74 (m, 2H), 1.68–1.61 (m, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6): δ 172.2, 171.0, 163.6, 163.0, 148.3, 145.8, 145.6, 140.9, 140.8, 140.5, 130.4, 130.3, 129.5, 129.4, 127.1, 126.9, 126.8, 123.2, 123.0, 122.9, 118.9, 118.8, 117.7, 117.2, 112.6, 112.2, 81.1, 72.4, 53.9, 40.3, 34.1, 30.4, 29.3, 23.4. MS (ESI) *m/z* 784.2 $[M+H]^+$, 807.2 $[M+Na]^+$. HRMS (ESI): $C_{49}H_{41}N_3O_7$: calculée 783.2945, trouvée 783.2960.

***N,N'*-(6-oxo-6-(prop-2-yn-1-ylamino)hexane-1,5-diyl)bis(2,3-dihydroxybenzamide) 64**

A une solution du catéchol protégé **75** (102 mg, 0,13 mmol) dans le CH_2Cl_2 (6,8 mL) est ajouté le TFA (2 mL, 26,9 mmol), du triisopropylsilane (1 mL, 4,88 mmol), et l'éthanol (0,2 mL, 3,43 mmol). Le milieu réactionnel est agité 24 h à 25 °C puis les solvants sont éliminés

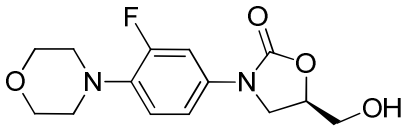
sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans le THF, et du cyclohexane est ajouté jusqu'à précipitation du produit. Le précipité est isolé par filtration sous pression réduite. Le catéchol **64** est ainsi isolé sous la forme d'un solide blanc (21 mg, 0,046 mmol, rendement : 35%).



Rf : 0.50 (CH_2Cl_2/EtOH 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3CN): δ 7.49 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.39–7.35 (m, 1H), 7.19 (dd, J = 1.7, 8.2 Hz,1H), 7.10 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 1.6, 8.2 Hz, 1H), 6.96 (ddd, J = 1.6, 7.9, 12.2 Hz, 2H), 6.72 (dt, J = 8.0, 9.6 Hz, 2H), 4.51 4.45 (m, 1H), 3.92 (dd, J = 2.6, 5.9 Hz, 2H), 3.36 (dq, J =1.9, 7.1 Hz, 2H), 1.97–1.89 (m, 1H), 1.86–1.76 (m, 1H),1.69–1.56 (m, 2H), 1.51–1.39 (m, 2H), 1.26 (s, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3CN): δ 171.9, 171.0, 170.9, 150.1, 150.0, 146.5, 119.3, 119.1, 118.9, 118.8, 118.1, 117.5, 115.2, 114.9, 80.7, 71.5, 54.1, 39.4, 31.7, 29.1, 28.9, 23.4. MS (ESI) *m/z* 456.0 $[M+H]^+$. HRMS (ESI): $C_{23}H_{25}N_3O_7$: calculée : 455.16925, trouvée : 455.16913.

(5*R*)-3-[3-fluoro-4-(morpholin-4-yl)phényl]-5-(hydroxyméthyl)-1,3-oxazolidin-2-one 84

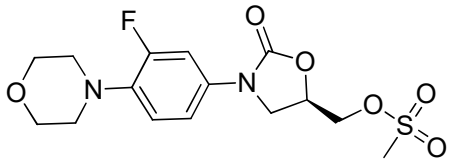
Une solution du composé **83** (550 mg, 1,66 mmol) dans du THF anhydre (12 mL) est refroidi à -70°C puis du *n*-BuLi (2,5 M dans le cyclohexane) est ajouté jusqu'à coloration jaune persistante. Le mélange est agité pendant 30 min en laissant la température remonter à -10 °C. La solution est à nouveau refroidi à -70°C pour ajouter le (*R)*-glycidylbutyrate (1,65 mmol, 232 µL) goutte à goutte. La solution est agitée 12 h à 20 °C. Le mélange réactionnel est hydrolysé par une solution aqueuse saturée en NH_4Cl avant d'être extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice grâce à un gradient cyclohexane/éther/éthanol (5/5/0 à 0/9/1). L'alcool **84** est isolé sous la forme d'un solide blanc (345 mg, 1,16 mmol, rendement : 70%).



Rf : 0.05 (CH_2Cl_2/Acétone 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.43 (dd, 1H, J = 2.8, 14 Hz), 7.10 (dd,1H, J = 1.6, 8.8 Hz), 6.93 (t, 1H, J = 9.2 Hz), 4.74-4.69 (m, 1H), 4.00-3.90 (m, 3H), 3.85 (t, 4H, J = 4.4 Hz), 3.75 (dl, 1H, J = 12 Hz), 3.04 (t, 4H, J = 4.8 Hz). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ -120.27. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.0, 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 $[M+H]^+$.

{3-[3-fluoro-4-(morpholin-4-yl)phényl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl}méthyl méthanesulfonate 85

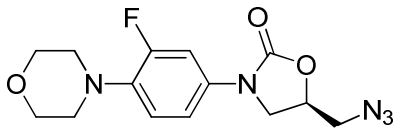
A une solution à 0 °C de l'alcool **84** (100 mg, 0,34 mmol) dans du CH_2Cl_2 (5 mL) sont ajoutés successivement la triéthylamine (70 µL, 0,51 mmol) et le chlorure de mésyle (40 µL, 0,51 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à 20 °C. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau puis avec une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$ et une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire au mésylate **85** isolé sous la forme d'un solide blanc (117 mg, 0,31 mmol, rendement : 93%).



Rf : 0.91 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) : δ 7.43 (dd, 1H, J = 2.4, 14 Hz), 7.07 (dd, 1H, J = 1.6, 8.8 Hz), 6.97 (t, 1H, J = 9.2 Hz), 4.92-4.86 (m, 1H), 4.47 (dd, 1H, J = 3.6, 12 Hz), 4.39 (dd, 1H, J = 4.0, 12 Hz), 4.09 (t, 1H, J = 9.2 Hz), 3.90 (dd, 1H, J = 6.0, 9.2 Hz), 3.59 (tl, 4H, J = 4.4 Hz), 3.08 (s, 3H), 2.99 (tl, 4H, J = 4.4 Hz), 1.46 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6) : δ -119.67. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) : δ 157.0, 154.7, 153.7, 120.0, 114.2, 108.0, 107.8, 69.6, 68.1, 50.9, 46.6, 38.1, 28.6. MS *m/z* 374.0 $[M-Boc]^+$, 418.0 $[M-tBu]^+$, 496.2 $[M+Na]^+$.

(*R*)-5-(Azidométhyl)-3-(3-fluoro-4-morpholinophényl)oxazolidin-2-one 76

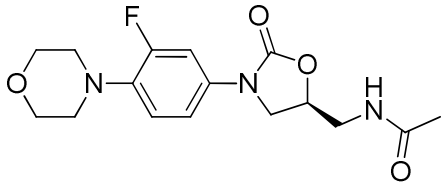
L'azoture **76** (306 mg, 0,95 mmol, rendement 76%) a été synthétisé en suivant la Procédure générale 3 à partir du mésylate **85** (470 mg, 1,25 mmol).



Rf : 0.66 (CH_2Cl_2/Acétone 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.42 (dd, J = 2.6, 14.3 Hz, 1H), 7.12-7.09 (m, 1H), 6.92 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 4.79-4.72 (m, 1H), 4.03 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 3.86-3 .84 (m, 4H), 3.8 (dd, J = 6.4, 8.9 Hz, 1H), 3.68 (dd, J = 4.7, 13.1 Hz, 1H), 3.57 (dd, J = 4.4, 13.2 Hz, 1H), 3.05-3.02 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ -120.13. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 156.9, 154.5, 154.0, 133.1, 119.2, 114.1, 107.8, 107.6, 70.7, 67.1, 53.2, 51.2, 47.7. MS *m/z* 322.2 $[M+H]^+$.

Linézolide 10

Le composé **10** est synthétisé suivant la Procédure générale 1 à partir de l'azoture **76** (200 mg, 0,62 mmol) et de l'anhydride acétique (72 µL, 0,77 mmol). La réaction est agitée à 21 °C pendant 3 h. Le brut réactionnel est purifié sur une colonne de silice (CH_2Cl_2/ EtOH 95/5) pour conduire au linézolide **10** isolé sous la forme d'un solide blanc (0,27 mmol, 91 mg, rendement : 43%).

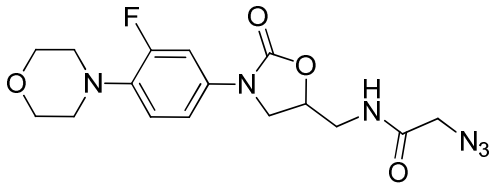


Rf : 0.55 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40 (dd, J = 2.6, 14.3 Hz, 1H), 7.06-7.03 (m, 1H), 6.89 (dd, J = 8.8, 9.4 Hz, 1H), 6.25 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 4.77-4.71 (m,1H), 3.99 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.85-3.83 (m, 4H), 3.74-3.71 (m, 1H), 3.70-3.56 (m, 2H), 3.03-3.01 (m, 4H), 1.99 (s, 3H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ -120.11. RMN ^{13}C (125

MHz, $CDCl_3$) : δ 171.1, 156.7, 154.5, 136.7, 133.0, 119.0, 114.1, 107.8, 107.5, 72.1, 67.1, 51.1, 47.8, 43.5, 42.1, 23.2. MS (ESI) *m/z* 338.2 $[M+H]^+$

2-azido-N-({3-[3-fluoro-4-(morpholin-4-yl)phényl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl}méthyl)acétamide 77

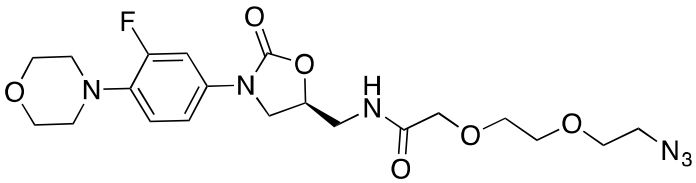
Le composé **77** est synthétisé à partir de la Procédure générale 2, à partir de l'azoture **76** (170 mg, 0,53 mmol) et d'acide azidoacétique (48 µL, 0,64 mmol). La solution est agitée 3 h à 18 °C. Le brut est purifié sur silice (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). L'azoture **77** est isolé sous la forme d'un solide blanc (115 mg, 0,30 mmol, rendement : 57%).



Rf : 0.18 (CH_2Cl_2/acétone 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38 (dd, J = 2.6, 14.3 Hz, 1H), 7.05-7.01 (m, 2H), 6.88 (dd, J = 8.8, 9.4 Hz, 1H), 4.78-4.71 (m, 1H), 4.01 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.84-3.81 (m, 4H), 3.75-3.56 (m, 3H), 3.02-3.00 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ -120.05. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 168.0, 156.8, 136.8, 132.9, 119.0, 114.1, 107.7, 71.7, 67.1, 52.5, 51.1, 47.9, 42.2. MS (ESI) *m/z* 379.2 $[M+H]^+$.

(*S*)-2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)-*N*-((3-(3-fluoro-4-morpholinophényl)-2-oxooxazolidin-5-yl)méthyl)acétamide 78

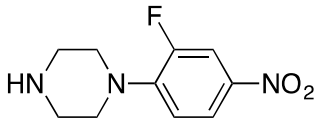
Le composé **78** est synthétisé à partir de la Procédure générale 2, à partir de l'azoture **76** (276 mg, 0,93 mmol) et d'acide 2-[2-(2-azidoéthoxy)éthoxy]acétique (176 mg, 0,93 mmol). La solution est agitée 3 h à 18 °C. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). L'azoture **78** est isolé sous la forme d'un solide amorphe incolore (341 mg, 0,73 mmol, rendement : 78%).



Rf : 0.78 (CH_2Cl_2/EtOH 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.44-7.40 (m, 2H), 7.07-7.04 (m, 1H), 6.90 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 4.78-4.74 (m, 1H), 4.04-3.95 (m, 3H), 3.85-3.83 (m, 4H), 3.78-3.62 (m, 9H), 3.51-3.40 (m, 2H), 3.04-3.01 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -120.2. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 171.0, 154.2, 136.6, 133.0, 131.5, 118.9, 113.9, 107.6, 71.7, 71.0, 70.3, 70.2, 70.1, 66.9, 51.0, 50.7, 47.8, 41.5. MS (ESI) *m/z* 467.2 $[M+H]^+$.

1-(2-Fluoro-4-nitro-phényl)pipérazine 88

La pipérazine (500 mg, 5,80 mmol) est solubilisée dans l'acétonitrile (5 mL) puis est portée à 80 °C. Le dérivé 3,4-difluoronitrobenzène (462 mg, 2,90 mol) solubilisé dans l'acétonitrile (10 mL) est ensuite ajouté au goutte à goutte sur 15 min. Le milieu réactionnel est agité à 70 °C pendant 1 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est reprise dans du *tert*-butyl méthyl ether, entrainant la précipitation de l'excès de piperazine. Cette dernière est éliminée par filtration. Le filtrat est évaporé pour conduire au produit désiré **88** isolé sous la forme d'un solide jaune (685 mg, 2,90 mmol, rendement : 100%).

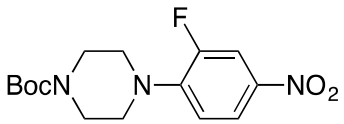


Rf : 0.06 (CH_2Cl_2/EtOH 99/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.94 (dd, J = 2.0, 9.2 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 2.8, 13.2 Hz, 1H), 6.87 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.24-3,22 (m, 4H), 3.02-3,00 (m, 4H),. RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -118.71. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 154.6, 146.2, 140.7, 121.2, 117.2, 112.9, 112.5, 51.1, 50.9. MS (ESI): *m/z* 226.0 $[M+H]^+$.

4-(2-fluoro-4-nitrophényl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyl 89

L'amine **88** (1500 mg, 6,66 mmol) est suspendue dans le THF (30 mL), puis le Boc_2O (1744 mg, 7,99 mmol) et le NaHCO3 (20 mL d'une solution aqueuse 1 M) sont ajoutés. La suspension jaune est agitée pendant 18 h à 25 °C. Le THF est évaporé sous pression réduite puis le résidu aqueux est extrait au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous pression réduite avant d'être purifiée sur colonne de silice

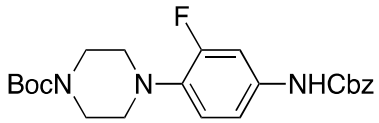
(gradient cyclohexane/Et_2O 9/1à 7/3). Le produit **89** est obtenu sous forme d'une poudre jaune (453 mg, 1,92 mmol, rendement : 90%).



Rf : 0.88 (CH_2Cl_2/EtOH 99/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.96 (ddd, J = 0.8, 2.4, 9.2 Hz, 1H), 7.89 (dd, J = 2.8, 13.2 Hz, 1H), 6.89 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.58 (t, J = 5.2 Hz, 4H), 3.21 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 1.46 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -118.71. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 154.6, 145.5, 141.0, 121.0, 117.3, 112.8, 112.5, 80.3, 49.6, 49.5, 28.4. MS (ESI): *m/z* 226.2 [M-Boc]$^+$, 270.0 [M-*t*Bu]$^+$.

tert-butyl 4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-fluorophényl)pipérazine-1-carboxylate 90

Le dérivé nitré **89** (500 mg, 1,54 mmol) est dissout dans un minimum de THF. Le méthanol (60 mL) est ajouté à cette solution, refroidie par un bain de glace. La solution saturée en $CuSO_4$ (2,5 mL) est ajoutée. Le $NaBH_4$ (5,82 mg, 15,4 mmol) est ajouté par portion à 0 °C. La solution est agitée 1 h à 0 °C. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite, extrait au dichlorométhane et est évaporé sous pression réduite pour conduire à une huile jaune. L'amine résultante est solubilisée dans le dichlorométhane anhydre (60 mL) et est placée sous atmosphère inerte. La DIPEA (762 µL, 1,53 mmol) puis le chloroformate de benzyle (400 µL, 2,81 mmol) sont ajoutés au milieu. Le milieu réactionnel est agité à 24 °C sous argon pendant 4 h. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution saturée d'acide citrique puis à la saumure. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous pression réduite. L'huile rose obtenue est triturée dans l'éther pour conduire à un solide rose. (276 mg, 0,642 mmol, rendement : 42%)

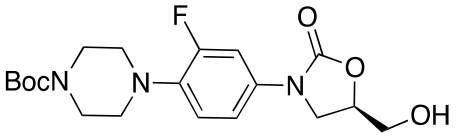


Rf : 0.43 (CH_2Cl_2/EtOH, 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.38-7.24 (m, 6H), 6.94 (dd, J = 1.6, 9.2 Hz, 1H), 6.83 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.58 (sl, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.55 (t, J = 5.0 Hz,

4H), 2.94 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 1.46 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -120.93. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 154.9, 153.4, 136.1, 128.9, 128.6, 128.5, 119.9, 114.7, 108.3, 104.6, 80.1, 67.4, 51.1, 28.7. MS (ESI): *m/z* 330.2 $[M\text{-}Boc]^+$, 374.2 $[M\text{-}t\text{Bu}]^+$, 430.2 $[M+H]^+$.

tert-butyl (_R_)-4-(2-fluoro-4-(5-(hydroxyméthyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)phényl)pipérazine-1-carboxylate 91

Une solution du carbamate **90** (2010 mg, 4,68 mmol) dans du THF anhydre (40 mL) est refroidi à -70°C puis du *n*-BuLi (2,5 M dans le cyclohexane, 2,8 mL) est ajouté. Le mélange est agité pendant 30 min en laissant la température remonter à -10 °C. La solution est à nouveau refroidi à -70°C pour ajouter le (*R)*-glycidylbutyrate (701 µL, 5,04 mmol) goutte à goutte. La solution est agitée 12 h à 25 °C. Le mélange réactionnel est hydrolysé par une solution aqueuse saturée en NH_4Cl avant d'être extrait avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH jusqu'à 9/1). L'alcool **91** est isolé sous la forme d'un solide blanc (1290 mg, 3,26 mmol, rendement : 70%).

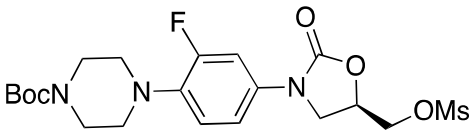


Rf : 0.05 (CH_2Cl_2/acétone 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.43 (dd, J = 2.4, 14 Hz, 1H), 7.10 (ddd, J = 0.8, 1.6, 8.8 Hz, 1H), 6.93 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.75-4.69 (m, 1H), 4.00-3.90 (m, 3H), 3.73 (dl, J = 12 Hz, 1H), 3.57 (tl, J = 4.4 Hz, 4H), 2.97 (tl, J = 4.4 Hz, 4H), 1.46 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -120.27. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 157.0, 154.7, 154.5, 119.6, 114.0, 107.8, 107.6, 80.1, 72.9, 63.0, 50.9, 46.6, 28.6. MS (ESI): *m/z* 296.0 $[M\text{-}Boc]^+$, 340.2 $[M\text{-}t\text{Bu}]^+$, 418.2 $[M+Na]^+$.

tert-butyl (_R_)-4-(2-fluoro-4-(5-(((méthylsulfonyl)oxy)méthyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)phényl)pipérazine-1-carboxylate 92

A une solution de l'alcool **91** (500 mg, 1,26 mmol) dans le dichlorométhane (7 mL), refroidie à 0 °C, sont ajoutés successivement la triéthylamine (351 µL, 2,53 mmol) et le chlorure de mésyle (147 µL, 1,90 mmol). Après retour à température ambiante, la solution est agitée

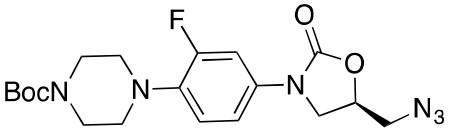
pendant 12 h. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau, puis avec une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$ et enfin avec solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire à un solide jaune. Ce dérivé est purifié sur colonne de silice (CH_2Cl_2 puis gradient CH_2Cl_2/EtOH pour atteindre 9/1). Le produit **92** est isolé sous la forme d'un solide jaune pâle (595 mg, 1,26 mmol, rendement : 100%)



Rf : 0.91. (CH_2Cl_2/EtOH, 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7.43 (dd, J = 2.4, 14 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 1.6, 8.8 Hz, 1H), 6.97 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.92-4.86 (m, 1H), 4.47 (dd, J = 3.6, 12 Hz, 1H), 4.39 (dd, J = 4.0, 12 Hz, 1H), 4.09 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 6.0, 9.2 Hz, 1H), 3.59 (tl, J = 4.4 Hz, 4), 3.08 (s, 3H), 2.99 (tl, J = 4.4 Hz, 4H), 1.46 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -119.67. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 157.0, 154.7, 153.7, 120.0, 114.2, 108.0, 107.8, 69.6, 68.1, 50.9, 46.6, 38.1, 28.6. MS (ESI): *m/z* 374.0 $[M\text{-}Boc]^+$, 418.0 $[M\text{-}t\text{Bu}]^+$, 496.2 $[M+Na]^+$.

tert-butyl 4-{4-[5-(azidométhyl)-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-2-fluorophényl}pipérazine-1-carboxylate 93

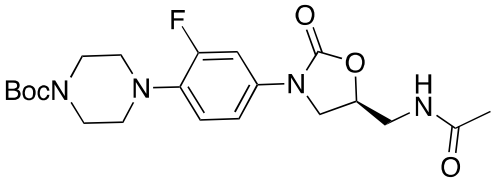
L'azoture **93** (169 mg, 0,40 mmol, rendement : 100%) est synthétisé en suivant la <u>Procédure générale 3</u> à partir du mésylate **92** (190 mg, 0,40 mmol).



Rf : 0.56 (CH_2Cl_2/acétone 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.42 (dd, J = 2.4, 14 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 1.6, 8.8 Hz, 1H), 6.93 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.78-4.72 (m, 1H), 4.02 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 6.0, 8.8 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 4.8, 13 Hz, 1H), 3.59-3.54 (m, 5H), 2.98 (tl, J = 4.4 Hz, 4H), 1.46 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -119.96. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 157.1, 154.9, 154.0, 119.8, 114.2, 107.9, 107.7, 80.2, 70.8, 53.3, 50.9, 47.7, 28.6. MS (ESI): *m/z* 421.2 $[M+H]^+$.

***tert*-butyl 4-{4-[5-(acétamidométhyl)-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-2-fluorophényl}pipérazine-1-carboxylate 94**

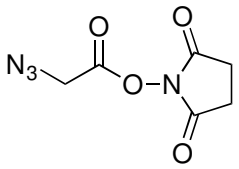
Le composé **94** est synthétisé suivant la Procédure générale 1 à partir de l'azoture **93** (0,95 mmol, 400 mg) et de l'anhydride acétique (1,90 mmol, 179 µL). La réaction est agitée à 20°C pendant 12 h. Le milieu réactionnel est purifié sur colonne de silice (DCM/ EtOH 95/5) pour conduire à l'oxazolidinone **94** isolé sous la forme d'un solide blanc (338 mg, 0,77 mmol, rendement : 81%).



Rf : 0.57 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1).RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.36 (dd, J = 14.2, 2.6 Hz, 1H), 7.00-6.97 (m, 1H), 6.85 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 6.42 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 4.73-4.67 (m, 1H), 3.95 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.69 (dd, J = 9.1, 6.7 Hz, 1H), 3.60-3.55 (m, 2H), 3.52 (t, J = 4.9 Hz, 4H), 2.92 (dd, J = 5 Hz, 4H), 1.94 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -120.0. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 171.37, 156.93, 154.84, 154.5, 136.6, 133.4, 119.6, 114.1, 107.8, 80.1, 72.1, 50.8, 47.8, 42.1, 28.6, 23.2. HRMS: $C_{21}H_{29}FN_4O_5$: calculée : 436.2122 trouvée: 436.21186.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-azidoacétate 96

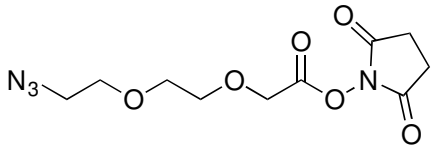
A une solution d'acide azido-acétique (805 µL, 1087 mg, 10,8 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (50 mL) sont ajoutés l'EDCI.HCl (2061 mg, 10,8 mmol) et le *N*-hydroxysuccinimide (1125 mg, 9,78 mmol). Le mileiu réactionnel est agité 48 h à 20 °C avant d'être lavé à l'eau, puis avec une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire à l'ester activé **96** sous la forme d'une huile jaune pâle cristallisant à froid (1210 mg, 6,11 mmol, rendement : 62%).



Rf : 0.67 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1).RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.21 (s, 2H), 2.85 (s, 4H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 168.5, 164.3, 48.2, 25.7.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)acétate 98

A une solution d'acide 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)acétique (200 mg, 1,06 mmol) dans le CH_2Cl_2 (20 mL) est ajouté l'EDCI.HCl (243 mg, 1,27 mmol) et le *N*-hydroxysuccinimide (146 mg, 1,27 mmol). La solution est agitée 1 h à 18 °C. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau, avec une solution saturée en NaCl, séché sur Na_2SO_4, filtré et évaporé sous pression réduite pour conduire à l'ester activé **98** isolé sous forme d'une huile jaune (570 mg, 1,99 mmol, rendement : 80%).

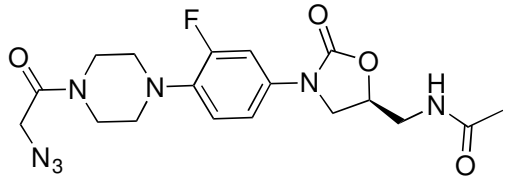


Rf: 0.32 (CH_2Cl_2/EtOH 95/5). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.49 (s, 2H), 3.79–3.79 (m, 2H), 3.69–3.68 (m, 2H), 3.66–3.63 (m, 2H), 3.39–3.36 (m, 2H), 2.82 (sl, 4H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): 168.7, 166.0, 71.5, 70.7, 70.1, 66.7, 50.7, 25.6. HRMS (ESI): $C_{10}H_{14}N_4O_6$: calculée: 286.09133, trouvée: 286.09111.

Azidométhyl (*S*)-4-(4-(5-(acétamidométhyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-fluorophényl)pipérazine-1-carboxylate 79

L'amine protégée **94** (310 mg, 0,71 mmol) est solubilisée dans un mélange TFA/CH_2Cl_2 (2/8, 5 mL). Le milieu réactionnel est agité 12 h à 21 °C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. L'amine **95** est reprise dans le dichlorométhane (13 mL) puis la DIPEA (1,1 mL, 6,64 mmol) et l'ester activé **96** (169 mg, 0,85 mmol) sont ajoutés. La réaction est agitée 12 h à 21 °C. Le milieu réactionnel est adsorbé sur silice puis purifié sur colonne de silice (gradient

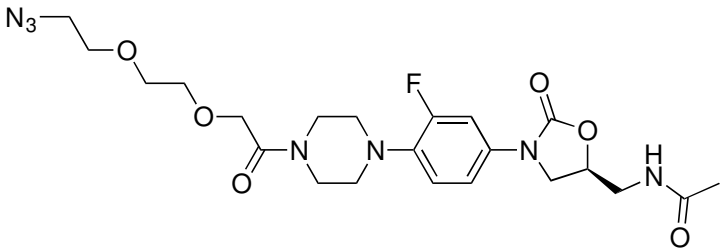
CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 9/1). L'azoture **79** est isolé sous la forme d'un solide blanc (150 mg, 0,36 mmol, rendement : 50%).



Rf : 0.59 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1) RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O): δ 7.22 (dd, J = 2.57, 14.6 Hz, 1H), 6.87 (dd, J = 2.4, 8.9 Hz, 1H), 6.79 (t, J = 9.23 Hz, 1H), 4.57-4.51 (m, 1H), 3.90-3.86 (m, 3H), 3.52 (dd, J = 6.6, 9.4 Hz, 1H), 3.43-3.40 (m, 2H), 3.32-3.30 (m, 2H), 3.28-3.26 (m, 2H), 2.78-2.71 (m, 4H), 1.81-1.79 (m, 1H), 1.67 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O): δ 173.4, 167.3, 157.0, 155.7, 154.6, 136.2, 134.5, 120.5, 115.0, 107.7, 72.7, 51.2, 50.9, 50.7, 48.3, 45.3, 42.4, 42.3, 22.4. HRMS (ESI): $C_{18}H_{22}FN_7O_4$: calculée : 419.17173, trouvée : 419.17121.

(*S*)-*N*-((3-(4-(4-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)acétyl)piperazin-1-yl)-3-fluorophényl)-2-oxooxazolidin-5-yl)méthyl)acétamide 80

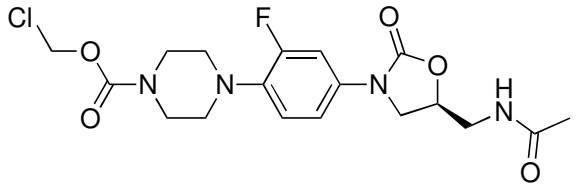
L'amine protégée **94** (150 mg, 0,34 mmol) est solubilisée dans un mélange TFA/CH_2Cl_2 (2/8, 10 mL). Le milieu réactionnel est agité 5 h à 22 °C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. L'amine **95** est reprise dans le dichlorométhane (5 mL). La DIPEA (1,5 mL, 9,08 mmol) puis l'ester activé **98** (111 mg, 0,39 mmol) sont ajoutés. La réaction est agitée 12 h à 22 °C Le milieu réactionnel est lavé avec une solution d'acide citrique 1 M, séché sur Na_2SO_4, filtré, puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 9/1). L'azoture **80** est isolé sous la forme d'un solide amorphe. (167 mg, 0,33 mmol, rendement : 96%).



Rf : 0.78 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.41 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.87 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 6.4 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.76-4.71 (m, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.98 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.74-3.55 (m, 13H), 3.36 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.02-2.97 (m, 4H), 1.99 (s, 3H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -75.8, -120.0. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 171.3, 167.8, 156.9, 154.5, 154.5, 136.3, 136.2, 133.5, 119.6, 114.0, 107.8, 72.1, 70.9, 70.8, 70.7, 70.2, 51.2, 50.8, 50.6, 47.8, 45.3, 42.1, 42.0, 23.2. HRMS (ESI): $C_{22}H_{30}FN_7O_6$: calculée : 507.22416, trouvée : 507.22526

(*S*)-*N*-((3-(4-(4-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)acétyl)pipérazin-1-yl)-3-fluorophényl)-2-oxooxazolidin-5-yl)méthyl)acétamide 99

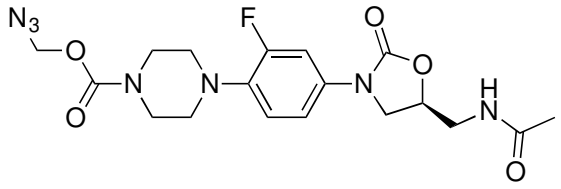
L'amine protégée **94** (250 mg, 0,58 mmol) est solubilisée dans un mélange TFA/CH_2Cl_2 (2/8, 8 mL). Le milieu réactionnel est agité 12 h à 20 °C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. L'amine **95** est reprise dans le dichlorométhane (13 mL). La DIPEA (0,9 mL, 5,35 mmol) puis le chlorométhylchloroformate (56 µL, 0,63 mmol) sont ajoutés. La réaction est agitée 4 h à 21 °C. Le milieu réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 100/0 à 95/5). Le chlorure **99** est isolé sous la forme d'un solide blanc (208 mg, 0,49 mmol, rendement : 85%).



Rf : 0.76 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.48 (dd, J = 2.6, 14.1 Hz, 1H), 7.11-7.08 (m, 1H), 6.96 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 6.12 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.84 (s, 2H), 4.82-4.76 (m, 1H), 4.04 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.79-3.60 (m, 7H), 3.09-3.04 (m, 4H), 2.04 (s, 1H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ -68.94, -120.37. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 171.2, 157.0, 154.5, 154.4, 152.7, 135.8-135.7, 133.9-133.8, 119.9, 114.0, 107.8, 107.6, 72.1, 71.0, 50.6, 47.8, 44.2, 23.2. HRMS (ESI): $C_{18}H_{22}ClFN_4O_5$: calculée : 428.12628, trouvée : 428.12504.

(*S*)-*N*-((3-(4-(4-(2-azidoacétyl)pipérazin-1-yl)-3-fluorophényl)-2-oxooxazolidin-5-yl)méthyl)acétamide 81

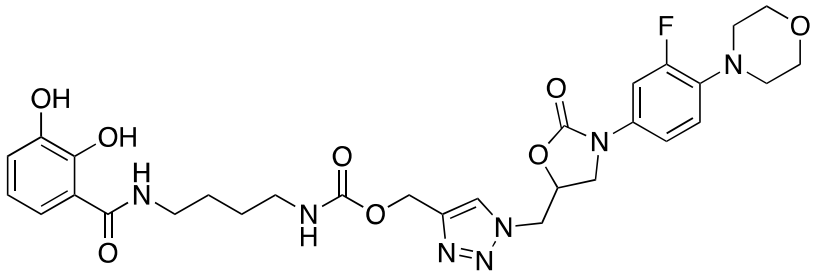
Le composé **81** est synthétisé suivant la Procédure générale 3 à partir du chlorure **99** (75 mg, 0,18 mmol) pour conduire à l'azoture **81** sous forme d'un solide blanc (63 mg, 0,145 mmol, rendement : 83%).



Rf : 0.41 (CH_2Cl_2/EtOH 95/5) RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.23 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.5 (dd, J = 2.6, 14.8 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 2.7, 8.8 Hz, 1H), 7.12-7.05 (m, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.73-4.67 (m, 1H), 4.08 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.7 (dd, J = 6.5, 9.1 Hz, 1H), 3.57 (sl, 4H), 3.4 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 2.97 (sl, 4H), 1.84 (s, 3H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d$_6$): δ -67.9, -121.2. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 169.9, 155.8, 153.9, 153.5, 153.3, 135.2, 133.7, 119.8, 114.9, 106.5, 75.5, 71.5, 50.0, 47.2, 43.7, 43.4, 41.4, 22.4. HRMS (ESI): $C_{18}H_{22}FN_7O_5$: calculée : 435.16665, trouvée : 435.16703.

MCVL1 102

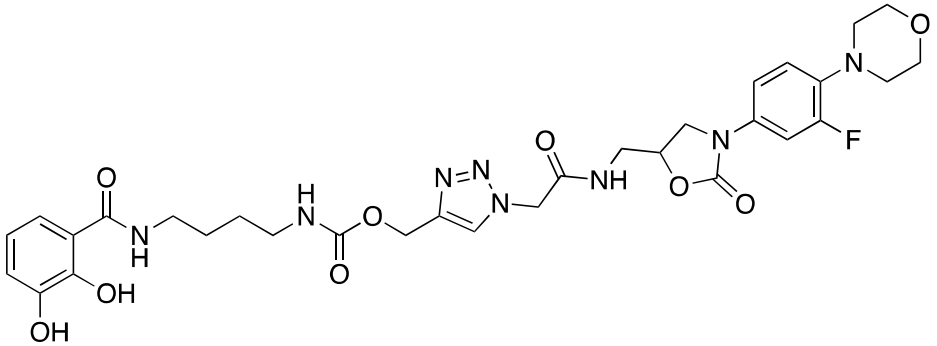
Le conjugué **102** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **71** (51 mg, 0,16 mmol) et de l'azoture **76** (82 mg, 0,18 mmol) pour conduire à un solide blanc (53 mg, 0,084 mmol, rendement : 53%).



Rf : 0.61 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 13.1 (s, 1H), 8.03 (sl, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.48 (dd, J = 2.0, 14.9 Hz), 7.14-7.12 (m, 1H), 7.07 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.95 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.61 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 6.45 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 5.10-4.93 (m, 3H), 4.78-4.71 (m, 2H), 4.14 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 3.87-3.83 (m, 1H), 3.75-3.73 (m, 4H), 3.39 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 3.13 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.98-2.96 (m, 4H), 1.63-1.51 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -78.1, -123.8. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 168.7, 154.7, 154.3, 152.4, 151.2, 148.4, 145.1, 142.2, 134.3, 131.9, 122.9, 116.8, 116.1, 115.6, 114.0, 112.6, 111.6, 104.9, 104.6, 69.0, 55.5, 50.0, 49.2, 45.4, 38.4, 37.0, 24.9, 24.7, 23.5. HRMS (ESI): $C_{29}H_{34}FN_7O_8$: calculée : 627.24529, trouvée : 627.24484.

MCVL2 103

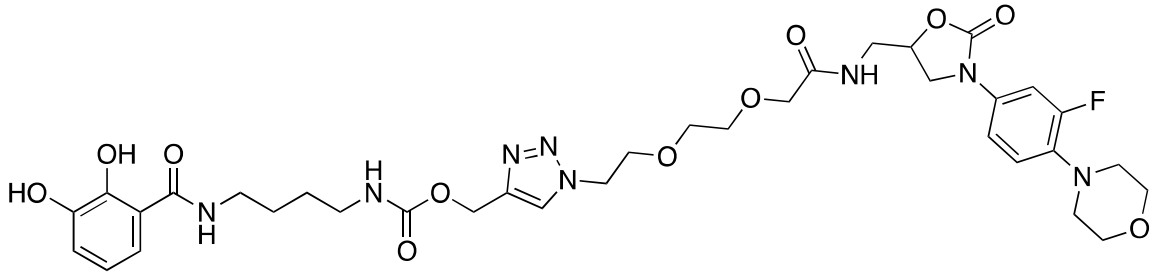
Le conjugué **103** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **71** (94 mg, 0,20 mmol) et de l'azoture **77** (69 mg, 0,18 mmol) pour conduire à un solide blanc (84 mg, 0,12 mmol, rendement : 74%).



Rf : 0.60 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.8 (sl, 1H), 9.1 (sl, 1H), 8.78-8.75 (m, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.50 (dd, J = 2.5, 15.0 Hz, 1H), 7.28-7.25 (m, 2H), 7.19 (dd, J = 2.5, 8.8 Hz, 1H), 7.08 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 6.68 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.75-4.73 (m, 1H), 4.1 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.75-3.69 (m, 5H), 3.54-3.45 (m, 2H), 3.31-3.25 (m, 2H), 3.04-2.95 (m, 6H), 1.53-1.40 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -73.8, -121.3. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 170.2, 166.7, 156.3, 154.4, 153.8, 150.2, 146.7, 142.9, 136.0, 133.8, 126.5, 119.7, 119.2, 118.3, 117.5, 115.4, 114.6, 107.3-107.1, 71.9, 66.6, 57.3, 51.9, 51.2, 47.7, 42.1, 39.1, 27.4, 26.7. HRMS (ESI): $C_{31}H_{37}FN_8O_9$: calculée : 684.26675, trouvée : 684.26885.

MCVL3 104

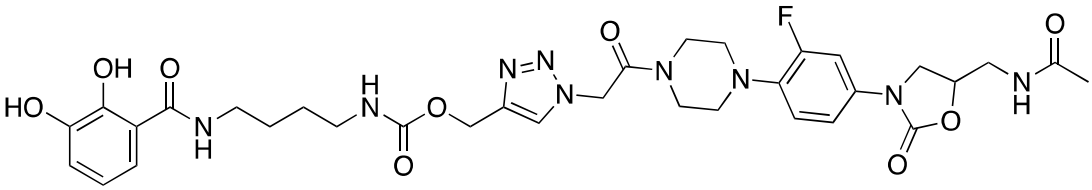
Le conjugué **104** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **71** (67 mg, 0,14 mmol) et de l'azoture **78** (60 mg, 0,13 mmol) pour conduire à un solide blanc (65 mg, 0,084 mmol, rendement : 67%).



Rf : 0.54 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.85 (sl, 1H), 9.10 (sl, 1H), 8.75 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.01 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 15.0, 2.5 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.23-7.16 (m, 2H), 7.06 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 6.67 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.03 (sl, 2H), 4.78-4.72 (m, 1H), 4.53 (t, J = 5.1, 2H), 4.09 (t, J = 9.1Hz, 1H), 3.89 (s, 2H), 3.81 (t, J = 5.2, 2H), 3.78-3.76 (m, 1H), 3.74-3.72 (m, 4H), 3.52 (s, 4H), 3.48 (t, J = 5.7 Hz, 2 H), 3.27 (q, J = 6.2 Hz, 2H), 3.01 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 2.97-2.94 (m, 4H), 1.56-1.41 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ - 73.3, - 121.3. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 169.9, 169.6, 155.8, 154.5, 153.9, 149.6, 146.1, 142.6, 135.5, 133.3, 124.8, 119.2, 119.1, 118.6, 117.7, 117.0, 114.8, 114.0, 106.6, 71.2, 69.9, 69.7, 69.2, 68.6, 66.1, 56.8, 50.6, 49.2, 47.3, 41.1, 39.9, 38.5, 26.8, 26.1. HRMS (ESI): $C_{35}H_{45}FN_8O_{11}$: calculée : 772.31918 trouvée : 772.31979

MCVL4 105

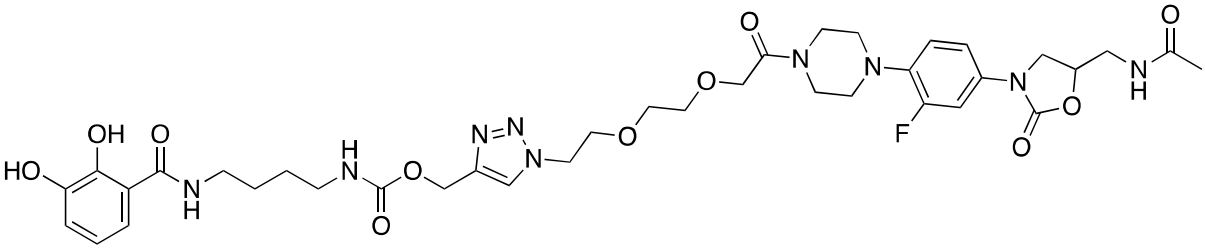
Le conjugué **105** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **71** (150 mg, 0,32 mmol) et de l'azoture **79** (112 mg, 0,28 mmol) pour conduire à un solide blanc (132 mg, 0,18 mmol, rendement : 68%).



Rf : 0.30 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.80 (sl, 1H), 9.10 (sl, 1H), 8.76 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 8.23 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.51 (dd, J = 2.6, 14.8 Hz, 1H), 7.28-7.26 (m, 2H), 7.19 (dd, J = 2.5, 8.8 Hz, 1H), 7.09 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 1.5, 7.7 Hz, 1H), 6.67 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 4.74-4.76 (m, 1H), 4.09 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.72-3.60 (m, 5H), 3.40 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.27 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.06-2.96 (m, 6H), 1.83 (s, 3H), 1.55-1.39 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -73.4, -121.1. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6): δ 170.4, 170.2, 164.8, 156.4, 154.5, 150.2, 146.7, 142.8, 135.6, 134.2, 126.7, 120.4, 119.2, 118.3, 117.5, 115.4, 114.6, 107.2-107.0, 72.0, 57.4, 51.1, 51.0-50.6, 47.8, 44.8, 42.1, 41.9, 39.1, 27.4, 26.7, 22.9. HRMS (ESI): $C_{33}H_{40}FN_9O_9$: calculée : 725.2933, trouvée : 725.29308.

MCVL5 106

Le conjugué **106** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **71** (53 mg, 0,11 mmol) et de l'azoture **80** (50 mg, 0,098 mmol) pour conduire à un solide blanc (34 mg, 0,042 mmol, rendement : 43%).

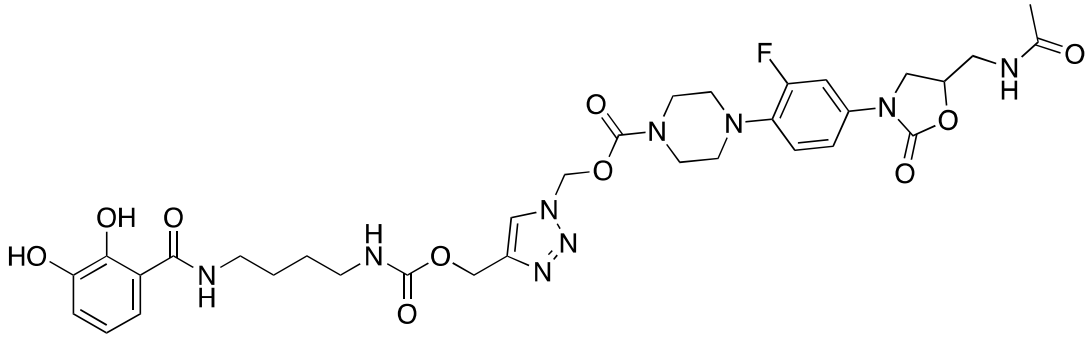


Rf : 0.33 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.86 (sl, 1H), 9.11 (sl, 1H), 8.76 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.24 (dd, J = 6.5, 5.4 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.50 (dd, J = 14.9, 2.5 Hz, 1H), 7.28 (dd, J = 8.0, 1.3 Hz), 7.22 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 7.06 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 6.67 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.74-4.68 (m, 1H), 4.53 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 4.08 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.82 (t, J =

5.3 Hz, 2H), 7.71 (dd, *J* = 8.9, 6.4 Hz, 1 H), 3.56-3.48 (m, 8H), 3.41 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.27 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.01 (q, *J* = 6.4, 2H), 2.94 (sl, 4H), 1.84 (s, 3H), 1.56-1.42 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -121.2. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 169.9, 169.7, 167.2, 155.8, 154.6, 154.0, 149.6, 146.1, 142.2, 135.2, 133.7, 124.8, 119.7, 118.7, 117.8, 117.0, 114.8, 114.0, 106.6, 71.5, 69.6, 69.3, 69.2, 68.6, 67.0, 56.8, 50.6, 50.3, 49.3, 47.3, 44.3, 41.4, 41.1, 39.9, 38.6, 26.9, 26.2. HRMS (ESI): $C_{37}H_{48}FN_9O_{11}$: calculée : 813.34573 trouvée : 813.34619.

MCVL6 107

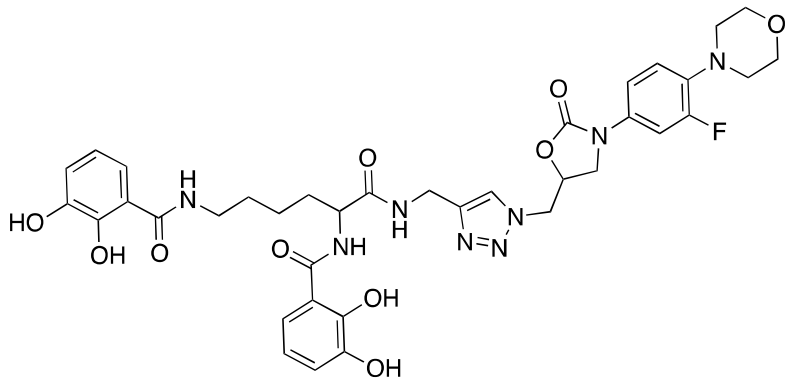
Le conjugué **107** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **71** (58 mg, 0,12 mmol) et de l'azoture **81** (45 mg, 0,10 mmol) pour conduire à un solide blanc (43 mg, 0,058 mmol, rendement : 56%).



Rf : 0.57 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.80 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.76 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.24-8.21 (m, 2H), 7.49 (dd, *J* = 2.6, 14.8 Hz, 1H), 7.28-7.25 (m, 2H) , 7.16 (dd, *J* = 2.5, 8.4 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 1.5, 7.8 Hz, 1H), 6.67 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 4.07 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 6.4, 9.2 Hz, 1H), 3.54-3.51 (m, 4H), 3.39 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.27 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.01 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.93 (sl, 4H) , 1.82 (s, 3H), 1.55-1.42 (m, 4H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -73.9, -121.2. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 169.9, 169.6, 155.8, 153.9, 153.3, 152.8, 149.6, 146.1, 143.1, 135.2-135.1, 133.8-133.7, 125.7, 119.8, 118.7, 117.7, 117.0, 114.9, 114.0, 106.7-106.4, 71.5, 70.7, 56.6, 50.0, 47.2, 43.7, 43.4, 41.4, 38.5, 26.8, 26.1, 22.4. HRMS (ESI): $C_{33}H_{40}FN_9O_{10}$: calculée : 741.28822 trouvée : 741.28911

BCVL1 108

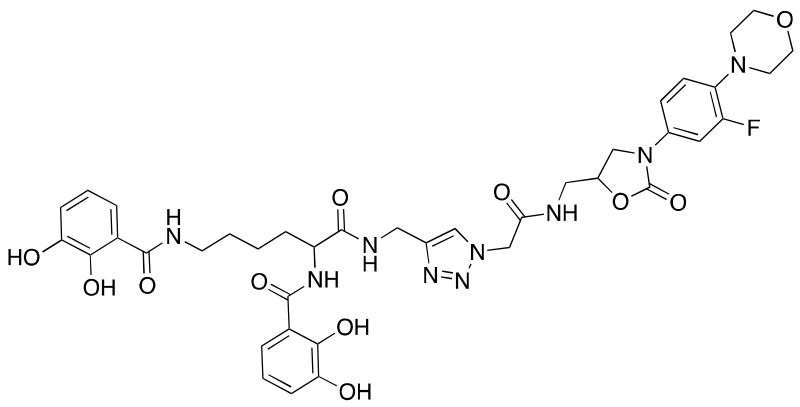
Le conjugué **108** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **75** (200 mg, 0,25 mmol) et de l'azoture **76** (98 mg, 0,31 mmol) pour conduire à un solide blanc (121 mg, 0,16 mmol, rendement : 61%).



Rf : 0.57 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.86 (sl, 1H), 12.07 (sl, 1H), 8.78-8.74 (m, 2H), 8.62 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.47-7.42 (m, 2H), 7.25 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 7.05 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.71-6.63 (m, 2H), 5.12-5.06 (m, 1H), 4.79 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.51-4.45 (m, 1H), 4.34 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.2 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.84 (dd, J= 9.6, 6.5 Hz, 1H), 3.74-3.72 (m, 4H), 3.28-3.22 (m, 2H), 2.97-2.95 (m, 4H), 1.81-1.76 (m, 2H), 1.58-1.53 (m, 2H), 1.40-1.31 (m, 2H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -74.55, -121.2. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 171.8, 170.2, 169.4, 155.9, 154.0, 150.2, 149.2, 146.6, 146.5, 145.5, 136.2, 136.1, 124.2, 119.7, 119.2, 118.8, 118.2, 117.5, 116.1, 115.4, 114.8, 107.4-107.2, 71.4, 66.6, 65.4, 53.5, 52.4, 51.1, 47.7, 39.3, 34.7, 31.8, 28.9, 23.6. HRMS (ESI) : $C_{37}H_{41}FN_8O_{10}$: calculée : 776.29297 trouvée : 776.28996.

BCVL2 109

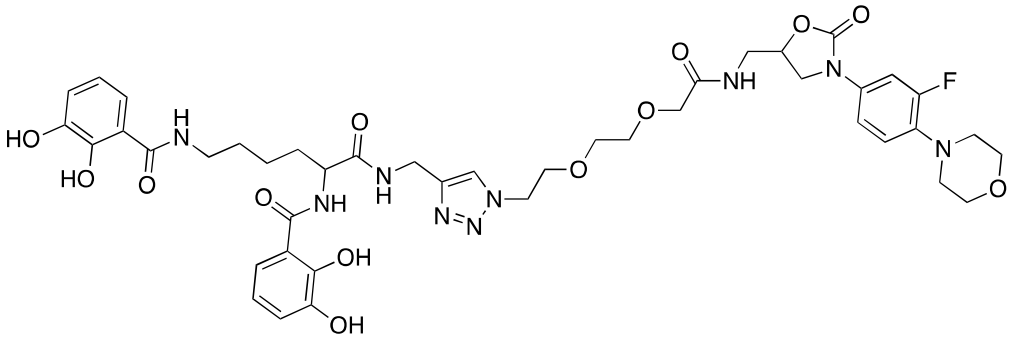
Le conjugué **109** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **75** (100 mg, 0,13 mmol) et de l'azoture **77** (58 mg, 0,15 mmol) pour conduire à un solide blanc (86 mg, 0,10 mmol, rendement : 81%).



Rf : 0.31 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.85 (sl, 1H), 12.07 (s, 1H), 9.25 (sl, 1H), 9.10 (sl, 1H), 8.76-8.73 (m, 3H), 8.61 (sl, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.57-7.40 (m, 2H), 7.25 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.06 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.71-6.64 (m, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.78-4.72 (m, 1H), 4.51-4.44 (m, 1H), 4.34 (s, 2H), 4.09 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 3.74-3.68 (m, 5H), 3.52-3.48 (m, 2H), 3.29-3.22 (m, 2H), 2.97-2.95 (m, 4H), 1.82-1.74 (m, 2H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.39-1.30 (m, 2H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -71.6, -121.2. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 171.8, 170.2, 169.5, 166.7, 156.2, 154.4, 153.8, 150.2, 149.3, 146.6, 146.5, 136.1, 133.9, 124.9, 119.7, 119.2, 118.8, 118.4, 118.3, 117.5, 116.2, 115.4, 114.6, 107.3-107.0, 71.8, 66.6, 53.5, 51.9, 51.1, 47.7, 42.1, 39.3, 34.8, 31.9, 28.9, 23.6. HRMS (ESI) : $C_{39}H_{44}FN_9O_{11}$: calculée : 833.31443 trouvée : 833.31476.

BCVL3 110

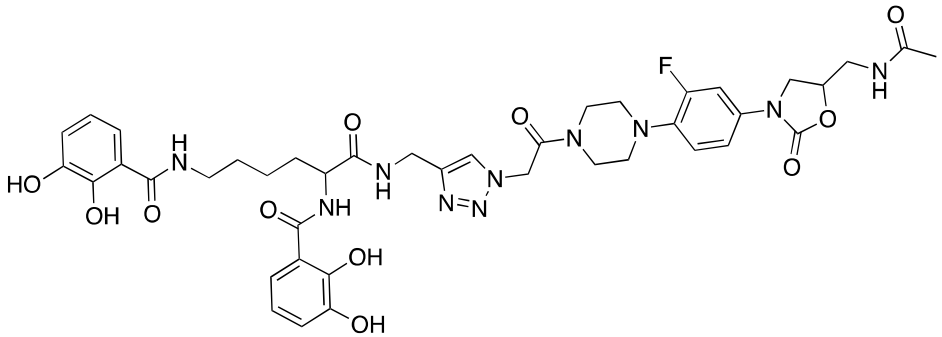
Le conjugué **110** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **75** (150 mg, 0,19 mmol) et de l'azoture **78** (107 mg, 0,23 mmol) pour conduire à un solide blanc (81 mg, 0,088 mmol, rendement : 46%).



Rf : 0.42 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.85 (s, 1H), 12.08 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.78-8.73 (2H, m), 8.58 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.02 (t, J = 6.02 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.48 (dd, J = 2.4, 14.5 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.25 (dd, J = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.05 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 6.94-6.88 (m, 2H), 6.71-6.64 (m, 2H), 4.78-4.71 (m, 1H), 4.51-4.46 (m, 3H), 4.33 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.08 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.82-3.76 (m, 3H), 3.74-3.72 (m, 4H), 3.51 (sl, 4H), 3.48 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.30-3.22 (m, 2H), 2.96-2.94 (m, 4H), 1.81-1.74 (m, 2H), 1.57-1.51 (m, 2H), 1.42-1.28 (m, 2H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -73.4, -121.3. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6): δ 171.8, 170.5, 170.2, 169.5, 156.2, 154.5, 153.8, 150.2, 149.3, 146.7, 146.5, 145.1, 136.1, 136.0, 133.9-133.8, 123.6, 119.7, 119.2, 118.8, 118.5, 118.3, 117.5, 116.2, 115.4, 114.6, 107.3, 107.0, 71.7, 70.5, 70.3, 69.8, 69.3, 66.6, 53.5, 51.2, 59.8, 47.8, 41.6, 39.2, 34.8, 31.8, 28.9, 23.6. HRMS (ESI) : $C_{43}H_{52}FN_9O_{13}$: calculée : 921.36686 trouvée : 921.36956.

BCVL4 111

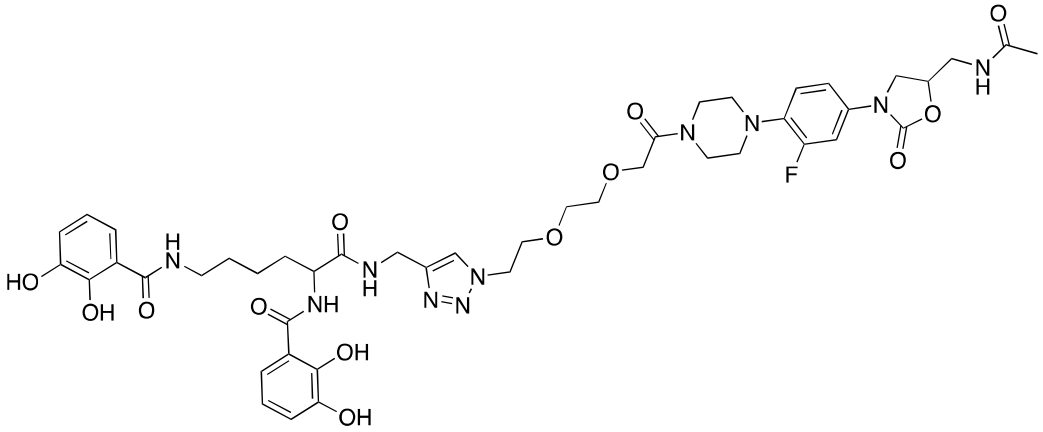
Le conjugué **111** est synthétisé suivant la <u>Procédure générale 4</u> à partir du catéchol **75** (94 mg, 0,12 mmol) et de l'azoture **79** (60 mg, 0,14 mmol) pour conduire à un solide blanc (75 mg, 0,086 mmol, rendement : 72%).



Rf : 0.20 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.83 (s, 1H), 12.05 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.77 (m, 2H), 8.63 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (dd, J = 14.6, 2.3 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.19 (dd, J = 8.6, 1.2 Hz, 1H), 7.08 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.7 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.66 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H), 4.74-4.69 (m, 1H), 4.51-4.74 (m, 1H), 4.39-4.32 (m, 2H), 4.09 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.72-3.61 (m, 5H), 3.30-3.21 (m, 2H), 3.02-2.95 (m, 4H), 1.84-1.76 (m, 5H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.39-1.29 (m, 2H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -73.2, -121.1. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 171.8, 170.5, 170.2, 169.4, 164.8, 156.1, 154.5, 154.1, 150.1, 149.2, 146.6, 146.5, 145.1, 135.7-135.6, 134.3-134.2, 124.9, 120.3, 119.2, 118.8, 118.5, 118.3, 117.5, 116.2, 115.4, 114.6, 107.2-106.9, 72.0, 53.5, 51.1, 50.9, 50.6, 47.8, 44.9, 42.1, 41.9, 39.3, 34.8, 31.9, 28.9, 26.8, 22.9. HRMS (ESI) : $C_{41}H_{47}FN_{10}O_{11}$: calculée : 874.34098 trouvée : 874.34086.

BCVL5 112

Le conjugué **112** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **75** (120 mg, 0,15 mmol) et de l'azoture **80** (93 mg, 0,18 mmol) pour conduire à un solide blanc (77 mg, 0,080 mmol, rendement : 52%).

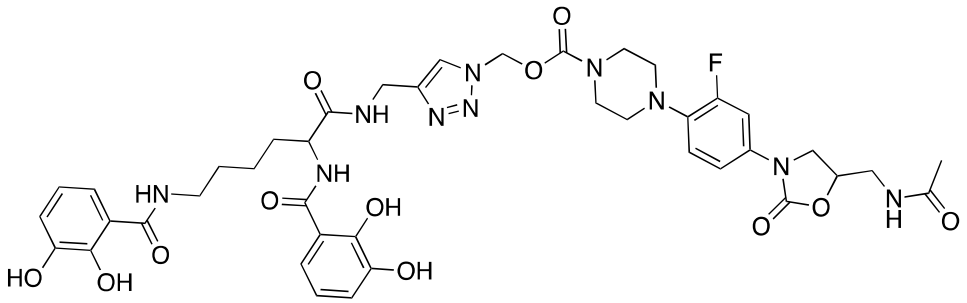


Rf : 0.25 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.85 (sl, 1H), 12.09 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 9.10 (sl, 1H), 8.77-8.74 (m, 2H), 8.58 (sl, 1H), 8.24 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.50 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.04 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 6.93-6.88 (m, 2H), 6.70-6.64 (m, 2H), 4.73-4.68

(m, 1H), 4.51-4.45 (m, 3H), 4.32 (sl, 2H), 4.16 (s, 2H), 4.08 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.81 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.71-3.68 (m, 1H), 3.60-3.51 (m, 10H), 3.41-3.35 (m, 2H), 3.29-3.21 (m, 2H), 2.94-2.92 (m, 4H), 1.83-1.74 (m, 5H), 1.57-1.51 (m, 2H), 1.41-1.30 (m, 2H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -72.3, -121.1. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 171.8, 170.5, 170.2, 169.5, 156.2, 154.5, 153.8, 150.2, 149.3, 146.7, 146.5, 145.1, 136.1, 136.0, 133.9-133.8, 123.6, 119.7, 119.2, 118.8, 118.5, 118.3, 117.5, 116.2, 115.4, 114.6, 107.3, 107.0, 71.7, 70.5, 70.3, 69.8, 69.3, 66.6, 53.5, 51.2, 59.8, 47.8, 41.6, 39.2, 34.8, 31.8, 28.9, 23.6. HRMS (ESI) : $C_{45}H_{55}FN_{10}O_{13}$: calculée : 922.39341 trouvée : 922.39579.

BCVL6 113

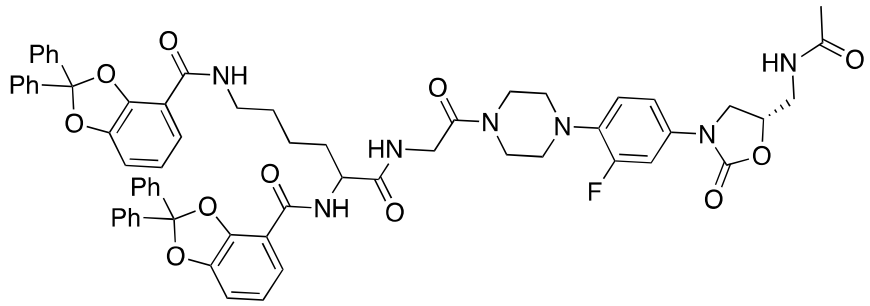
Le conjugué **113** est synthétisé suivant la Procédure générale 4 à partir du catéchol **75** (100 mg, 0,13 mmol) et de l'azoture **81** (67 mg, 0,15 mmol) pour conduire à un solide blanc (41 mg, 0,046 mmol, rendement : 36%)



Rf : 0.45 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.85 (sl, 1H), 12.07 (s, 1H), 9.25 (sl, 1H), 9.10 (sl, 1H), 8.76-8.73 (m, 3H), 8.61 (sl, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.57-7.40 (m, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.71-6.64 (m, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.78-4.72 (m, 1H), 4.51-4.44 (m, 1H), 4.34 (s, 2H), 4.09 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.74-3.68 (m, 5H), 3.52-3.48 (m, 2H), 3.29-3.22 (m, 2H), 2.97-2.95 (m, 4H), 1.82-1.74 (m, 2H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.39-1.30 (m, 2H). RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6): δ -71.6, -121.2. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 171.8, 170.2, 169.5, 166.7, 156.2, 154.4, 153.8, 150.2, 149.3, 146.6, 146.5, 136.1, 133.9, 124.9, 119.7, 119.2, 118.8, 118.4, 118.3, 117.5, 116.2, 115.4, 114.6, 107.3-107.0, 71.8, 66.6, 53.5, 51.9, 51.1, 47.7, 42.1, 39.3, 34.8, 31.9, 28.9, 23.6. HRMS (ESI) : $C_{41}H_{47}FN_{10}O_{12}$: calculée : 890.33590 trouvée : 890.33765.

Conjugué 116

L'azoture **79** (66 mg, 157 µmol) est solubilisé dans un mélange THF/eau (8/2, 10 mL), puis de la DIPEA (47 µL, 286 µmol) et de la triphénylphosphine (71 mg, 270 µmol) sont ajoutés. La solution est portée à 55 °C pendant 3 h. Le milieu est évaporé sous pression réduite puis, repris dans le dichlorométhane (8 mL). L'acide **70** (119 mg, 159 µmol) et le HATU (59 mg, 155 µmol) et la DIPEA (47 µL, 286 µmol) sont ajoutés successivement. La réaction est agitée 12 h à 26 °C. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution d'acide citrique (10%), puis par une solution de $NaHCO_3$ saturée, avant d'être séché sur Na_2SO_4, filtré puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 8/2) pour conduire au conjugué **116** isolé sous la forme d'un solide blanc. (112 mg, 100 µmol, rendement : 63%).

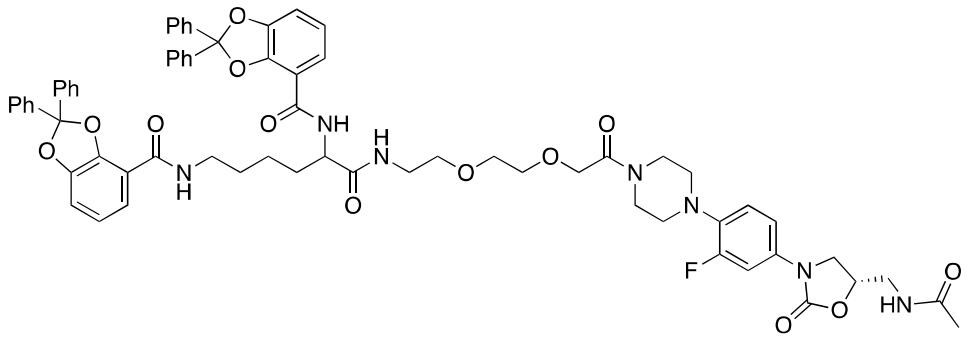


Rf : 0.79 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). HRMS (ESI) : $C_{64}H_{60}FN_7O_{11}$: calculée : 1121,43348 trouvée : 1121.43126.

Conjugué 117

L'azoture **80** (43 mg, 84,7 µmol) est solubilisé dans le MeOH (9 mL), une solution de chlorure de cobalt hexahydraté (33 mg, 138 µmol) dans l'eau (1 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est refroidi par un bain de glace et le $NaBH_4$ (16 mg, 423 µmol) est ajouté. La solution est agitée 5 minutes, puis filtrée sur célite. Le filtrat est évaporé sous pression réduite, puis repris dans le dichlorométhane (5 mL). L'acide **70** (58 mg, 77,6 µmol) et le HATU (35 mg, 92,0 µmol) et la DIPEA (28 µL, 170 µmol) sont ajoutés successivement. La réaction est ensuite agitée 12 h à 26 °C. Le milieu est lavé avec une solution d'acide citrique (10%), puis par une solution de $NaHCO_3$ saturée avant d'être séché sur Na_2SO_4, filtré puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 8/2) pour

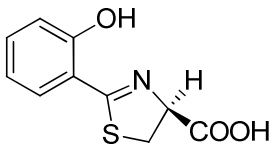
conduire au conjugué **117** sous la forme d'un solide blanc (42 mg, 34,7 µmol, rendement : 45%).



HRMS (ESI) : $C_{68}H_{68}FN_7O_{13}$: calculée : 1209.48591trouvée : 209.48241.

Acide 2-(2-Hydroxy-phényl)-4,5-dihydro-thiazole-4-carboxylique 127

A une solution de 2-hydroxybenzonitrile (995 mg, 8,36 mmol) dans le méthanol (20 mL) sont ajoutés le chlorhydrate de D-cystéine (1760 mg, 10,02 mmol) et la solution de tampon phosphate pH = 6,4 (20 mL). Le pH de la solution est ajusté à 6,4 par ajout de K_2CO_3, puis le milieu réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 18 h. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse résiduelle est acidifiée à pH = 2 à l'aide d'acide citrique avant d'être extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4, filtrées, et évaporées sous pression réduite, pour conduire à l'acide 2-(2-Hydroxy-phenyl)-4,5-dihydro-thiazole-4-carboxylique **127** sous la forme d'un solide jaune (1,82 g, 8,16 mmol, rendement : 98 %).

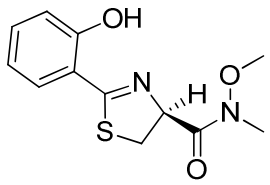


Rf : 0.15 (CH_2Cl_2/MeOH, 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39 (dd, 1H, J = 0.8, 7.9 Hz), 7.33 (dt, 1H, J = 1.0, 7.8 Hz), 7.67 (dl, 1H, J = 8.5 Hz), 6.85 (tl, 1H, J = 7.5 Hz), 5.31 (t, 1H, J = 8.7 Hz), 3.65 (dd, 1H, J = 8.0, 11.3 Hz), 3.59 (tl, 1H, J = 9.5 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz,

$CDCl_3$) δ 174.2, 172.3, 159.1, 133.7, 130.9, 119.2, 117.3, 116.2, 76.9, 33.9. MS (ESI) : *m/z* 223 $[M+H]^+$.

2-[(4*S*)-4-[méthoxy(méthyl)amino]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]phénol 128

La *N,O*-diméthylhydroxylamine hydrochloride (437 mg, 4,48 mmol) et la DIPEA (740 µL, 4,48 mmol) sont dissout dans 60 mL de CH_2Cl_2. En parallèle, l'acide carboxylique **127** (1 g, 4,48 mmol) est dissout dans le dichlorométhane (60 mL). Après dissolution complète de l'acide carboxylique **127**, l'EDCI (901 mg, 4,70 mmol) est ajouté, suivi de la solution de *N,O*-diméthylhydroxylamine. Le milieu réactionnel est agité 16 h à 20 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu huileux est repris dans le CH_2Cl_2 et lavé par une solution de HCl aqueux 1N puis par une solution de K_2CO_3 (1M). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur silice (CH_2Cl_2/EtOH 95/5) pour conduire à la thiazoline **128** isolée sous la forme d'un solide jaune pâle. (894 mg, 3,36 mmol, rendement : 75 %)

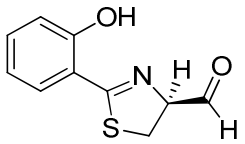


Rf : 0,76 (Et_2O) ; RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 12.2 (s, 1H), 7.4 (dd, *J* = 1.27, 7.97 Hz, 1H), 7.34 (dt, *J* = 7.80, 1.39 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.41 Hz, 1H), 6.86 (dt, *J* = 7.55, 1.03 Hz, 1H), 5.68 (t, *J* = 9.00 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.75 (t, *J* = 9.91 Hz, 1H), 3.46 (dt, *J* = 10.00, 1.2 Hz, 1H), 3.28 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 174.3, 159.2, 133.5, 130.6, 119.0, 117.2, 116.2, 74.7, 61.9, 32.9, 32.6. MS *m/z* 267.0 $[M+H]^+$.

(4*S*)-2-(2-hydroxyphényl)-4,5-dihydro-1,3-thiazole-4-carbaldéhyde 129

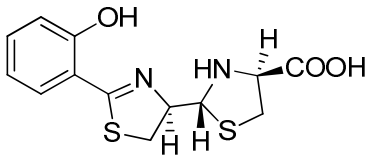
Le composé **128** (670 mg, 2,52 mmol) est dissout dans 45 mL de THF anhydre et est refroidi à -50 °C. Une solution de $LiAlH_4$ (2,7 mL, 1 M dans le THF) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est amenée à -20°C et agité pendant 30 min. La réaction est ensuite hydrolysée par une solution saturée en NH_4Cl (25 mL) puis par une solution de $KHSO_4$ 1 M

(10,1 mL). La solution est ramenée à 21 °C pour être extraite au CH_2Cl_2. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4, filtrées, et évaporées sous pression réduite. Le brut est utilisé sans purification, ni analyses dans l'étape suivante compte tenu de la faible stabilité de l'aldéhyde **129**.

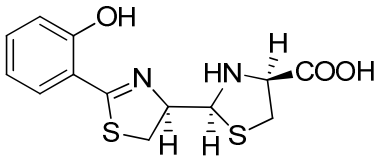


***Nor*-Pyochéline 125**

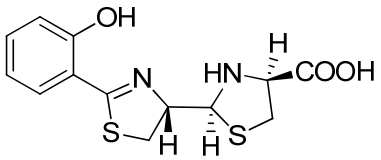
L'aldéhyde **129** est dissout dans l'éthanol (96 mL), puis la L-cystéine (678 mg, 5,6 mmol) et l'acétate de potassium (1747 mg, 17,8 mmol) sont ajoutés suivi par de l'eau (32 mL). Le milieu est agité à 21 °C pendant 12 h. L'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu aqueux est dilué dans de l'eau MilliQ, puis acidifié jusqu'à pH 3 à l'aide d'acide citrique. La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 75 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées sous pression réduite pour conduire à la *nor*-pyochéline **125** isolée sous la forme d'un solide jaune (495 mg, 1,59 mmol, rendement : 64 %). Le composé **125** est obtenu sous la forme de trois stéréoisomères.



Rf: 0.33 (*n*-BuOH/H_2O/MeOH/cyclohexane 2/2/1/1). RMN ^{1}H (400 MHz, (Acétone-d_6): 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 ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6) : δ 174.2, 172.4, 159.9, 134.3, 131.4, 119.9, 117.8, 117.1, 82.8, 72.4, 68.0, 38.0, 35.1. MS (ESI) *m/z* 311[M+H]$^+$.



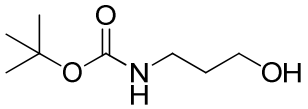
Rf: 0.31 (*n*-BuOH/H_2O/MeOH/cyclohexane 2/2/1/1). RMN ^{1}H (400 MHz, Acétone-d_6): δ 7.46-7.38 (m, 2H), 6.99-6.91 (m, 2H), 4.86 (q, J = 4.0 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.73 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.67-3.55 (m, 2H), 3.06-2.97 (m, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6) : δ 174.2, 172.7, 159.9, 134.3, 131.4, 119.9, 117.8, 117.1, 83.1, 72.7, 64.9, 38.1, 34.2. MS (ESI) *m/z* 311[M+H]$^+$.



Rf : 0.28 (*n*-BuOH/H_2O/MeOH/cyclohexane 2/2/1/1). RMN ^{1}H (400 MHz, Acétone-$d_{6:}$): δ 7.46-7.38 (m, 2H), 6.99-6.91 (m, 2H), 5.08 (dt, 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 ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6): δ 174.2, 173.4, 159.9, 134.3, 131.4, 119.9, 117.8, 117.1, 78.0, 73.3, 66.0, 38.5, 35.6. MS (ESI) *m/z* 311[M+H]$^+$.

***tert*-butyl (3-hydroxypropyl)carbamate 134**

A une solution de 3-aminopropan-1-ol (1,5 g ; 20 mmol) dans le dichlorométhane (10 mL) et ajouté le Boc_2O (4,36 g, 20 mmol) dans du dichlorométhane (10 mL) goutte à goutte à 0 °C. Après retour à température ambiante, la solution est agitée une nuit. La solution est lavée à l'eau puis avec une solution aqueuse de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient cyclohexane/Et_2O 8/2 à 0/10). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (2,25 g, 12,85 mmol, rendement : 64 %)

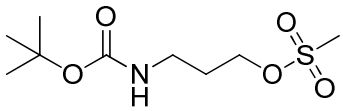


Rf : 0.39 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 4.72 (s, 1H), 3.64 (q, J = 5.9 Hz, 2H), 3.27 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 1.67-1.61 (m, 2H), 1.42 (s, 9H)

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.3, 79.7, 59.4, 37.1, 33.0, 28.5. MS (ESI) *m/z* 175,1 $[M+H]^+$, 198 $[M+Na]^+$.

3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl méthanesulfonate 131

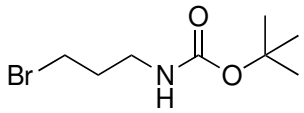
A une solution de l'alcool **134** (2,22 g, 12,76 mmol) dans le dichlorométhane (20 mL) est ajouté le chlorure de mésyle (1,1 mL, 14,06 mmol) goutte à goutte. La solution est refroidie à 0 °C, puis la triéthylamine (2,0 mL, 14,39 mmol) est ajoutée. Le milieu réactionnel est amené à 28 °C et est agité pendant 2 h. Le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle. Cette phase organique est lavée avec une solution aqueuse de $KHSO_4$ 1 M puis à l'eau. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **131** sous la forme d'une huile qui cristallise à froid. (2,60 g, 10,27 mmol, rendement : 81%)



Rf : 0.69 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ4.77 (s, 1H), 4.23 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.20 (s, 1H), 2.97 (s, 3H), 1.88 (p, J = 6.3 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ156.0, 79.4, 67.4, 37.4, 36.7, 29.7, 28.4. MS (ESI) *m/z* 254.0 $[M+H]^+$.

***tert*-butyl (3-bromopropyl)carbamate 130**

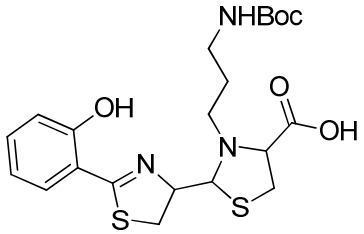
A une solution d'hydrobromure de bromopropylamine (235 mg, 1,07 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (8 mL) est ajouté la triéthylamine (510 µL, 3,67 mmol). La solution est agitée 30 minutes à température ambiante. Le Boc_2O (290 mg, 1,33 mmol) est ensuite ajouté et la solution est agitée à 20 °C pendant 12 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et est lavé avec de l'eau, puis avec une solution de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **130** sous la forme d'une huile incolore (232 mg, 0,97 mmol, rendement : 91%)



RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ4.63 (s, 1H), 3.42 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.20 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.02 (p, J = 7.0 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ156.1, 79.5, 39.1, 32.2, 30.9, 28.5. MS (ESI) *m/*z 260.0 $[M+Na]^+$, 182.0 $[M-tBu]^+$.

Pyochéline fonctionnalisée 119

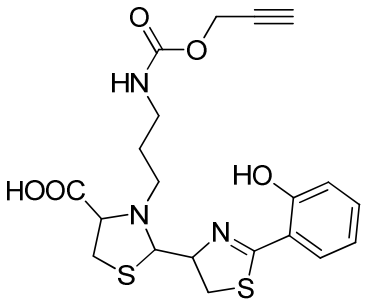
A une solution de *nor*-pyochéline **125** (150 mg, 0,48 mmol) dans l'acétonitrile (9 mL) est ajouté le dérivé mésylé **131** (245 mg, 0,96 mmol), K_2CO_3 (267 mg, 1,93 mmol) et l'éther couronne 18-6 (30 mg, 0,11 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 75 °C pendant 3 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans le CH_2Cl_2. La phase organique est lavée à l'eau, par une solution aqueuse d'HCl (0.5 N), puis par une solution de NaCl saturé. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut orange est purifié sur colonne de silice démétallée (gradient CH_2Cl_2/Acétone: 100:0 à 95:5 puis CH_2Cl_2/EtOH 95:5) pour conduire à la pyochéline **119** isolée sous la forme d'un solide jaune (0,30 mmol, 139 mg, rendement : 62%).



Rf : 0.40 (CH_2Cl_2/acétone 95/5). RMN ^{1}H (Acétone-d_6): δ 12.5 (s, 1H), 7.45-7.38 (m, 2H), 6.98-6.90 (m, 2H), 6.03 (sl, 1H, NH), 5.21-4.95 (m, 1H), 4.90-4.87 (m, 1H), 4.25-4.16 (m, 3H), 3.67-3.42 (m, 2H), 3.37-3.33 (m, 1H), 3.24-3.15 (m, 2H), 3.01-2.96 (m, 1H), 1.87-1.81 (m, 2H), 1.26 (s, 9H). RMN ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6): δ 173.5,171.9, 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. MS (ESI) *m/z* 468.1 $[M+H]^+$.

Pyochéline fonctionnalisée 122

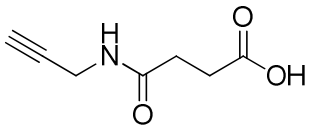
La pyochéline fonctionnalisée **119** (32 mg, 68 µmol) est solubilisée dans un mélange dichlorométhane/TFA (8/2, 1 mL). Après 3 h à 25 °C, le milieu est évaporé sous pression réduite et est repris dans le CH_2Cl_2 anhydre (4 mL). La DIPEA (45,4 µL, 274,7 µmol) et le propargyl chloroformate (7,4 µL, 75 µmol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à 25 °C. Le milieu réactionnel est adsorbé sur silice démétallée et est purifié par chromatographie sur colonne de silice démétallée (Et_2O/cyclohexane 8/2 puis Et_2O/EtOH 95/5) pour conduire à la pyochéline **122** isolée sous la forme d'un solide jaune (17,6 mg, 39 µmol, rendement : 57%).



Rf : 0.66 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, Acétone-d_6) : δ 7.46-7.39 (m, 2H), 6.97-6.90 (m, 2H), 6.51 (sl, 1H), 5.20-4.96 (m, 1H), 4.90-4.87 (m, 1H), 4.65 (sl, 2H), 4.33-4.16 (m, 3H), 3.67-3.21 (m, 6H), 3.01-2.96 (m, 1H), 1.90-1.83 (m, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6) : δ 171.8, 160.2, 156.3, 134.1, 131.3, 119.7, 117.8, 117.0, 82.9, 79.8, 75.7, 72.6, 68.5, 66.3, 35.4, 63.5, 53.3, 38.4, 38.0, 35.4, 34.1 ; MS (ESI) *m/z* 450.0 $[M+H]^+$ HRMS $C_{20}H_{23}N_3O_5S_2$: calculée: 449,10791; trouvée: 449,10781.

Acide 4-oxo-4-(prop-2-yn-1-ylamino)butanoïque 136

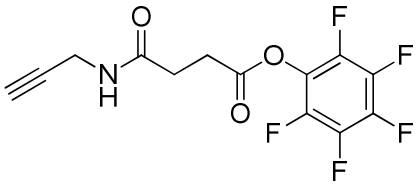
A une solution de propargylamine (0,960 mL, 15 mmol) dans la DMF (3 mL) et la pyridine (3 mL) est ajouté l'anhydride succinique **135**(1 g, 10 mmol). La solution est agitée pendant 12 h à 21 °C sous argon. Le milieu réactionnel devenu rouge est évaporé sous pression réduite et est repris dans 50 mL d'eau milliQ puis acidifié avec une solution aqueuse d'HCl 1 N pour atteindre pH = 1. Le milieu est extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 100 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4, filtrées, puis évaporées sous pression réduite. Le produit **128** est isolé sous la forme d'un solide blanc (616 mg, 3,97 mmol, rendement : 40%).



Rf : 0.19 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) : δ 3.96 (d, 2H, *J* = 2.6 Hz), 3.33 (p, 1H, *J* = 1.8 Hz), 2.62-2.57 (m, 3H), 2.5 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz). RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) : δ 176.2, 174.2, 80.6, 72.2, 31.3, 30.1, 29.5. MS (ESI) *m/z* 156.0 $[M+H]^+$.

3-[(prop-2-yn-1-yl)carbamoyl]propanoate de pentafluorophényl 137

Le pentafluorophénol (500 mg, 2,72 mmol) et l'acide carboxylique **136** (506 mg, 3,26 mmol) et l'EDCI (506 mg, 3,26 mmol) sont dissouts dans 50 mL de CH_2Cl_2. La solution est agitée 12 h à 21 °C. Le brut est adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient cyclohexane/ Et_2O 8/2 à 1/3). Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (677 mg, 2,11 mmol, rendement : 78%).

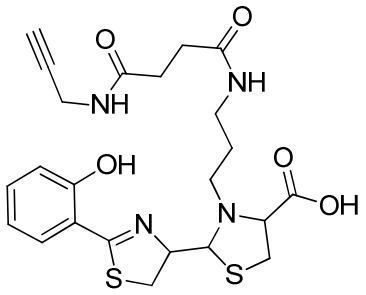


Rf : 0.53 (cyclohexane/AcOEt 1/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 5.77 (s, 1H), 4.10 (dd, *J* = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 3.08 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 2.6 Hz, 2H). RMN ^{19}F ($CDCl_3$, 376 MHz) : δ -152.3 – -152.4, -157,8, -162.2 – -162.3. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 170.2, 169.0, 142.4, 140.9, 140.0, 138.3, 125.0, 79.3, 71.7, 30.3, 29.4, 28.6. MS (ESI) *m/z* 322.0 $[M+H]^+$. HRMS $C_{13}H_8F_5NO_3$: calculée : 321,04243 ; trouvée : 321.04282.

Pyochéline fonctionnalisée 123

La pyochéline fonctionnalisée **119** (45 mg, 0,12 mmol) est solubilisée dans un mélange CH_2Cl_2/TFA (8/2, 1 mL). Après 3 h, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est repris dans le CH_2Cl_2 (3 mL) puis l'ester de pentafluorophénol **137** (55 mg, 0,17

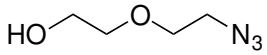
mmol) et la DIPEA (61 µL, 0,36 mmol) sont ajoutés. Le milieu est agité 12 h à 21 °C sous argon. Le brut réactionnel est adsorbé sur silice démétallée puis purifié sur colonne de silice démétallée (gradient Et_2O/EtOH 100:0 à 90:10), pour conduire à la pyochéline fonctionnalisée **123** sous la forme d'un un solide jaune. (42 mg, 83 µmol, rendement : 68%)



Rf : 0.74 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, Acétone-d_6) : δ7.49 (sl,, 1H), 7.46-7.39 (m, 2H), 7.20 (sl, 1H), 6.97-6.90 (m, 2H), 5.22-4.87 (m, 1H) 5.02-4.70 (m, 1H), 4.22-4.05 (m, 3H), 3.97-3.95 (m, 2H), 3.68-3.39 (m, 2H), 3.34-3.26 (m, 3H), 3.00-2.95 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 2.49-2.39 (m, 4H), 1.88-1.80 (m, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6) : δ171.7, 171.4, 171.1, 170.7, 159.1, 133.0, 130.3, 124.9, 119.0, 116.7, 80.5, 78.9, 72.4, 71.6, 70.8, 64.2, 62.2, 37.0, 35.0, 32.7, 30.8, 28.4 28.0. MS (ESI) *m/z* 505.2 $[M+H]^+$. HRMS (ESI) $C_{23}H_{28}N_4O_5S_2$: calculée : 504.15011 trouvée : 504.14886.

2-(2-azidoethoxy)éthan-1-ol 140

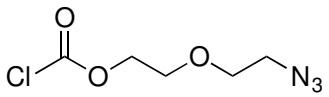
Une solution d'azoture de sodium (1,25 g, 19,23 mmol) dans l'eau (5 mL) est ajouté le de 2-(2-chloroethoxy)ethanol (1 mL, 9,38 mmol). La solution est chauffée 12 h à 90 °C. Le milieu réactionnel est extrait avec 5 x 20 mL de CH_2Cl_2. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4, filtrées, et évaporées sous pression réduite pour conduire à un liquide jaune (1,15 g, 8,77 mmol, rendement : 94%)



Rf : 0.57 (EtO_2). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ3.73 (q, J = 4.5 Hz, 2H), 3.68 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.58 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 3.38 (t, J = 5.0 Hz, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ72.4, 70.1, 61.8, 50.8.

2-(2-azidoéthoxy)éthyl chloroformate 138

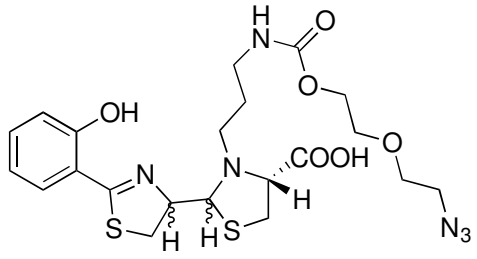
Le triphosgène (3,35 g, 11,28 mmol) est solubilisé dans le THF anhydre (20 mL). La solution est refroidie à 5 °C par un bain de glace. La pyridine (858 µL, 10,61 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Une solution de l'alcool **140** (1,15 g, 8,77 mmol) dans le THF anhydre (20 mL) est ajoutée goutte à goutte. La suspension est mélangée à 5 °C pendant 2h30. Le milieu réactionnel est dilué dans 40 mL de CH_2Cl_2 puis est lavé avec 30 mL d'une solution aqueuse d'HCl 1N, puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner le chloroformate **138** sous forme d'un liquide jaune (1,65 g, 8,52 mmol, rendement : 97%)



Rf : 0.85 (EtO_2). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$: δ 4.53-4.43 (m, 2H), 3.76-3.74 (m, 2H), 3.66 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.38 (t, J = 4.9 Hz, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ150.9, 70.5, 70.3, 68.3, 50.6.

Pyochéline fonctionnalisée 124

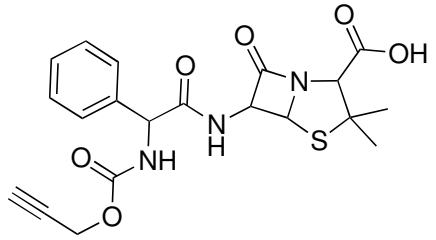
La pyochéline fonctionnalisée **119** (35 mg, 74,8 µmol) est solubilisée dans un mélange CH_2Cl_2/TFA (8/2, 3 mL). Après 4 h d'agitation à 21 °C, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est repris dans le THF (2 mL), la DIPEA (125 µL, 748 µmol) puis une solution du chloroformate **138** (13 mg, 67,4 µmol) dans le THF (0,2 mL) sont ajoutées successivement. La solution est agitée sous atmosphère inerte pendant 1 h à 21°C. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. L'huile jaune résiduelle est adsorbée sur silice et est purifiée par chromatographie sur colonne de silice démétalée (gradient Cyclohexane/AcOEt 50/50 à 0/100) pour conduire à la pyochéline **124** isolée sous la forme d'un solide jaune (25 mg, 47,6 µmol, rendement : 71%).



Rf : 0.38 (AcOEt/Cyclohexane 2/1). RMN ^{1}H (400 MHz, Acétone-d_6) : δ7.46-7.39□□m, 2H), 6.97-6.90 (m, 2H), 5.22-4.96 (m, 1H), 4.88-4.84 (m, 1H), 4.23-4.18 (m, 3H), 4.15-4.12 (m, 2H), 4.07-3.95 (m, 1H), 3.67-3.66 (m, 4H), 3.63-3.42 (m, 2H), 3.40-3.36 (m, 2H), 3.35-3.32 (m, 1H), 3.27-3.21 (m, 2H), 3.01-2.95 (m, 1H), 1.90-1.85 (m, 2H). HRMS (ESI) : $C_{21}H_{28}N_6O_6S_2$ calculé: 524.15117 trouvé: 524.15086.

Ampicilline 142

Le trihydrate d'ampicilline est mis en suspension dans un mélange THF/H_2O (10.5 mL/4.5 mL), puis la triméthylamine (379 µL, 2,73 mmol) est ajoutée pour atteindre pH 8. Le propargylchloroformate (278 µL, 2,73 mmol) est ajouté goutte à goutte à 0 °C. De la triéthylamine (500 µL, 3,60 mmol) est ajouté pour ramener la solution à pH 8. La solution est revient à 21 °C puis est agitée 30 min sous atmosphère inerte. Le THF est évaporé sous pression réduite. Le résidu aqueux est détendu avec de l'eau milliQ et est lavé à l'acétate d'éthyle (3 x 40 mL). La phase aqueuse est ensuite acidifiée à pH 2 par une solution aqueuse d'HCl 0.5 M. Le précipité résultant est récupéré par filtration sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'une poudre blanche (853 mg, 1,98 mmol, rendement : 80%)

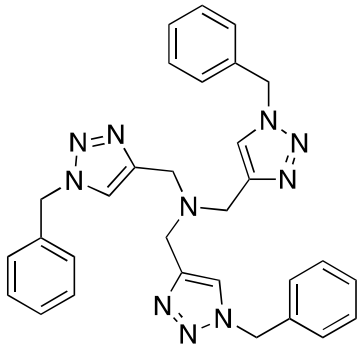


Rf : 0.18 (CH_2Cl_2/ EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, THF-d_8) : δ 8.27 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.41-7.20 (m, 6H), 5.55 (dd, J = 7.6 Hz, 4.1 Hz), 5.41-5.39 (m, 2H), 4.61 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.24 (s, 1H), 2.85 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.55 (s, 3H), 1.46 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, THF-

d_8): δ 173.0, 169.6, 168.4, 154.7, 138.6, 128.1, 127.5, 127.2, 78.5, 74.6, 70.5, 68.0, 63.7, 58.6, 58.0, 51.8, 30.0, 26.5. HRMS (ESI) $C_{20}H_{21}N_3O_6S$: calculée : 431.11511, trouvée : 431.11499.

TBTA 147

La trispropargylamine (70 µL, 0,49 mmol) et le benzylazide (2 mL, 0,5 mol/L dans le CH_2Cl_2, 1,0 mmol) sont solubilisés dans le CH_2Cl_2 (2 mL). Une solution de sulfate de cuivre (II) (0,4 mol/L, 124 µL, 0,049 mmol) puis l'ascorbate de sodium (30 mg, 0,148 mmol) sont ajoutés successivement. La solution est agitée à 21 °C pendant 12 h. La solution est détendue avec de l'eau. La solution est extraite au CH_2Cl_2. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et adsorbée sur silice. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (CH_2Cl_2 puis CH_2Cl_2/MeOH 95/5) pour obtenir le TBTA **147** sous la forme d'une huile incolore (175 mg, 0,32 mmol rendement : 100%)

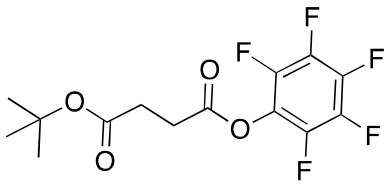


Rf : 0.43 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ7.57 (s, 3H), 7.28-7.16 (m, 15H), 5.42 (s, 6H), 3.62 (s, 6H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ □44.3, 134.8□ 129.3, 128.8, 128.0, 123.7, 54.1, 47.1. MS (ESI) *m/z* : 531.27208 $[M+H]^+$

***tert*-butyl-(pentafluorofluorophényl) succinate155**

Le pentafluorophénol (480 mg, 2,61 mmol) et l'acide **157** (500 mg, 2,87 mmol) sont solubilisés dans le CH_2Cl_2 (10 mL). Le DCC (540 mg, 2,62 mmol) est ajouté. La solution est agitée 12 h à 21 °C. Le milieu réactionnnel est évaporé sous pression réduite puis le DCU est précipité dans un mélange Et_2O/cyclohexane (1/2), puis éliminé par filtration. Le filtrat est

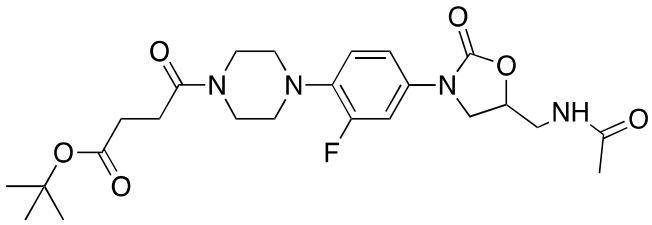
isolé et les solvants sont évaporés sous pression réduite pour conduire à l'ester activé **155** isolé sous la forme d'un solide blanc. (440 mg, 1,29 mmol, rendement : 50%)



Rf : 0.52 (AcOEt/Cyclohexane 2/8). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ2.94 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.68 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ -152.5 - -152.6, -158.1, -162.4- -162.5. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : 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. MS (ESI) *m/z* 340.1 $[M+H]^+$.

tert-butyl 4-(4-{4-[5-(acétamidométhyl)-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-2-fluorophényl}pipérazin-1-yl)-4-oxobutanoate 156

L'amine protégée **94** (106 mg, 0,24 mmol) est solubilisée dans un mélange TFA/CH_2Cl_2 (2/8, 4 mL). Le milieu réactionnel est agité 12 h à 21 °C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. L'amine **95** est reprise dans le dichlorométhane (5 mL). La DIPEA (0,53 mL, 3,21 mmol) puis l'ester activé **155** (75 mg, 0,22 mmol) sont ajoutés. La réaction est agitée 4 h à 21 °C. Le milieu réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 9/1). L'oxazolidinone **156** est isolé sous forme d'un solide blanc. (71 mg, 0,14 mmol, rendement : 65%).

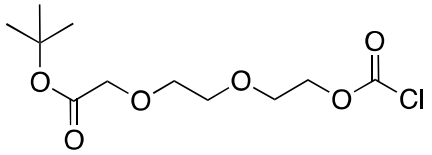


Rf : 0.75 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ7.46 (dd, J = 2.5, 14.1 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 2.3, 8.9 Hz, 1H), 6.90 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 6.07 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.80-4.72 (m, 1H), 4.02 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.79-3.57 (m, 7H), 3.06-3.00 (m, 4H), 2.64-2.57 (m, 4H), 2.02 (s, 3H), 1.45 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ-120.0. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) :

δ172.4, 171.0, 170.0, 154.2, 136.1, 133.4, 119.4, 113.9, 107.7, 107.4, 80.6, 71.8, 50.9, 50.5, 47.7, 45.5, 42.1, 41.8, 30.5, 29.7, 28.1, 23.1. HRMS (ESI) $C_{24}H_{33}FN_4O_6$: calculée : 492.23841, trouvée : 492.23805.

tert-butyl 2-(2-(2-((chlorocarbonyl)oxy)éthoxy)éthoxy)acétate 158

Le triphosgène (867 mg, 2,92 mmol) est dissout dans le THF anhydre (5 mL). La solution est refroidie à 5 °C. La pyridine (0,22 mL, 2,72 mmol) est ajoutée goutte à goutte. La solution de l'alcool **157** (443 mg, 2,01 mmol) dans le THF anhydre (5 mL) est ajoutée goutte à goutte. La solution est mélangée à 5 °C pendant 2 h 30. Le milieu réactionnel est dilué par du CH_2Cl_2, lavé avec une solution aqueuse de HCl 0.25 N puis par une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au chloroformate **158** sous la forme d'une huile jaune (533 mg, 1,89 mmol rendement 94%).

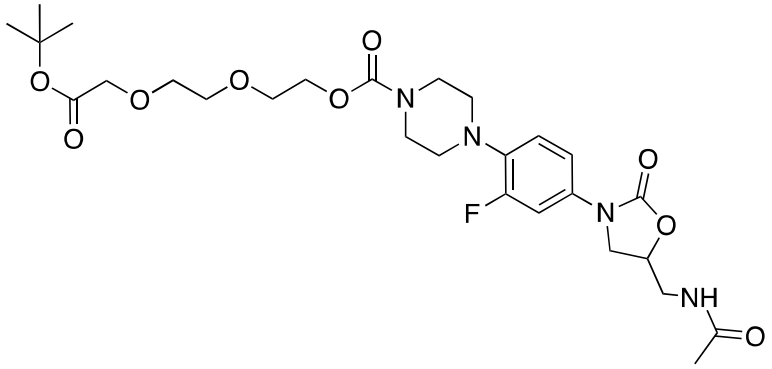


Rf : 0.32 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ4.37-4.34 (m, 2H), 3.91 (s, 2H), 3.69-3.67 (m, 2H), 3.60 (s, 4H), 1.37 (s, 9H). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ169.4, 150.5, 81.4, 70.7, 70.6, 68.9, 68.2, 28.0.

2-(2-(2-(_tert_-butoxy)-2-oxoéthoxy)éthoxy)éthyl 4-(4-(5-(acétamidométhyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-fluorophényl)pipérazine-1-carboxylate 159

L'amine protégée **94** (100 mg, 0,229 mmol) est solubilisé dans un mélange TFA/CH_2Cl_2 (2/8, 5 mL). Le milieu réactionnel est agité 12 h à 21 °C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. L'amine **95** est reprise dans le dichlorométhane (10 mL). La DIPEA (0,33 mL, 2,02 mmol) puis le chloroformate **158** (54 mg, 0,19 mmol) sont ajoutés successivement. La réaction est agitée 1 h à 21 °C. Le milieu réactionnel est purifié par chromatographie sur

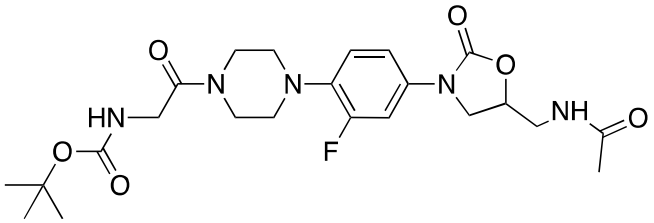
colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 9/1). L'oxazolidinone **159** est isolé sous forme d'un solide blanc. (83 mg, 0,14 mmol, rendement : 75%).



Rf : 0.35 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.45 (dd, J = 2.6, 14.1 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 2.7, 8.8 Hz, 1H), 6.92 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 6.1 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.80-4.73 (m, 1H), 4.28-4.26 (m, 2H), 4.04-3.99 (m, 3H), 3.76-3.56 (m, 13H), 3.02-2.99 (m, 4H), 2.02 (s, 3H), 1.47 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ -119.99. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ171.0, 169.6, 156.8, 155.2, 154.4, 154.2, 136.5, 133.3, 119.5, 113.9, 107.6, 107.4, 81.6, 71.9, 70.7, 70.6, 69.6, 69.1, 64.7, 50.6, 47.7, 44.3, 42.0, 28.1, 23.1. HRMS (ESI) : $C_{27}H_{39}FN_4O_9$: calculée : 582.27011, trouvée : 582.26985.

tert-butyl (2-(4-(4-(5-(acétamidométhyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-fluorophényl)pipérazin-1-yl)-2-oxoéthyl)carbamate 162

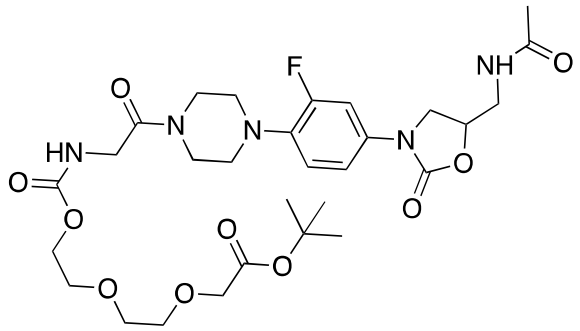
L'amine protégée **94** (130 mg, 0,30 mmol) est solubilisé dans un mélange TFA/CH_2Cl_2 (2/8, 5 mL). Le milieu réactionnel est agité 12 h à 21 °C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. L'amine **95** est reprise dans le dichlorométhane (5 mL). La DIPEA (0,52 mL, 3,15 mmol) puis l'ester activé **161** (122 mg, 0,36 mmol) sont ajoutés successivement. La réaction est agitée 4 h à 22 °C. Le milieu réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 9/1). L'oxazolidinone **162** est isolé sous forme d'un solide blanc. (130 mg, 0,26 mmol, rendement : 88%).



RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.37 (dd, *J* = 2.6, 14.1 Hz, 1H), 7.02-7.00 (m, 1H), 6.92 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 6.83 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.51 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.76-4.70 (m, 1H), 3.99-3.94 (m, 3H), 3.73-3.69 (m, 3H), 3.6 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.51-3.49 (m, 2H), 2.99-2.93 (m, 4H), 1.97 (s, 3H), 1.39 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ -120.1. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 171.7, 167.1, 156.8, 155.9, 154.5, 154.3, 135.9, 135.8, 133.6, 133.5, 119.5, 113.9, 107.6, 107.3, 79.8, 72.1, 50.7, 50.3, 47.6, 44.5, 42.2, 42.1, 28.3, 22.9.

tert-butyl 1-(4-(4-(5-(acétamidométhyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-fluorophényl)pipérazin-1-yl)-1,4-dioxo-5,8,11-trioxa-3-azatridécan-13-oate 160

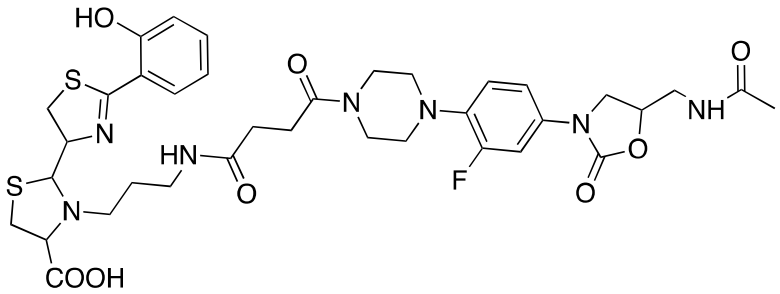
Le dérivé **162** (124 mg, 0,25 mmol) est solubilisé dans un mélange TFA/CH_2Cl_2 (1/9, 5 mL). Le milieu réactionnel est agité 12 h à 21 °C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est repris dans le dichlorométhane (5 mL). La DIPEA (0,35 mL, 2,14 mmol) puis le chloroformate **158** (55 mg, 0,19 mmol) sont ajoutés successivement. La réaction est agitée 2 h à 22 °C. Le milieu réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 9/1). L'oxazolidinone **160** est isolé sous forme d'un solide blanc. (81 mg, 0,13 mmol, rendement : 65%).



Rf : 0.25 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ7.47 (dd, *J* = 2.4, 14.0Hz, 1H), 7.09-7.01 (m, 1H), 6.92 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 5.80 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H), 4.79-4.73 (m, 1H), 4.26 (dt, *J* = 1.7, 4.7 Hz, 2H), 4.12-3.99 (m, 5H), 3.81-3.79 (m, 2H), 3.77-3.67 (m, 8H), 3.63-3.60 (m, 1H), 3.58-3.55 (m, 2H), 3.06-3.01 (m, 4H), 2.01 (s, 3H), 1.47 (s, 9H). RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ -120.01. RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) : δ 169.6, 166.5, 164.0, 162.5, 156.9, 154.2, 135.7, 133.6, 119.6, 113.9, 107.6, 107.4, 81.6, 71.8, 70.7, 70.6, 69.6, 69.1, 64.4, 50.8, 50.4, 47.7, 44.5, 42.6, 42.1, 42.0, 28.1, 23.1. HRMS (ESI) : $C_{29}H_{42}FN_5O_{10}$: calculée : 639.28908 trouvée : 639.28947.

PCH-L7 163

La pyochéline **119** (50 mg, 0,107 mmol) est solubilisée dans le CH_2Cl_2 (2 mL) puis HCl est ajouté (2 mL d'une solution 2N dans l'éther). La solution est agitée 2 h à 25 °C. En parallèle, l'oxazolidinone **156** (60 mg, 0,122 mmol) est solubilisée dans le CH_2Cl_2 anhydre (1 mL) et HCl dans l'éther est ajouté (4 mL d'une solution 2N dans l'éther) et la solution est agitée pendant 30 minutes à 25 °C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Les milieux réactionnels sont repris dans du CH_2Cl_2 (4 mL) et sont réunis. La DIPEA (0,2 mL, 1,21 mmol) et le HATU (49 mg, 0,129 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée 12 h à 25 °C. Le milieu réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice démétallée (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 8/2). Le produit est repris dans un minimum d'éther et est précipité puis isolé par filtration (25 mg, 0,032 mmol, rendement : 30%).

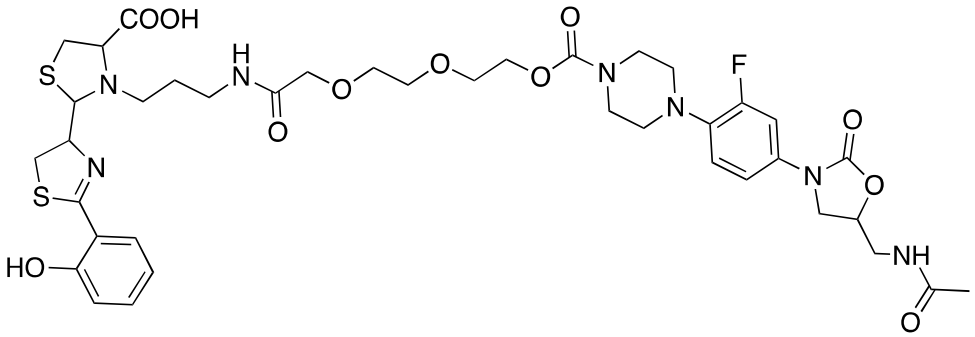


Rf : 0.42 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) : δ7.53-7.40 (m, 3H), 7.17 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 9.5 Hz, 1 H), 6.98-6.92 (m, 2H), 5.14-4.69 (m, 3H), 4.21-3.93 (m, 7H), 3.75 -3.71 (m, 1H), 3.63-3.56 (m, 4H), 3.46-3.40 (m, 2H), 3.26-3.21 (m, 1H), 3.14-3.08

(m, 12H), 2.98-2.88 (m, 4H), 2.75 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.82 (s, 3H), 1.77-1.69 (m, 2H). HRMS (ESI) : $C_{36}H_{44}FN_7O_8S_2$: calculée : 785.26768 trouvée : 785.2675.

PCH-L8 165

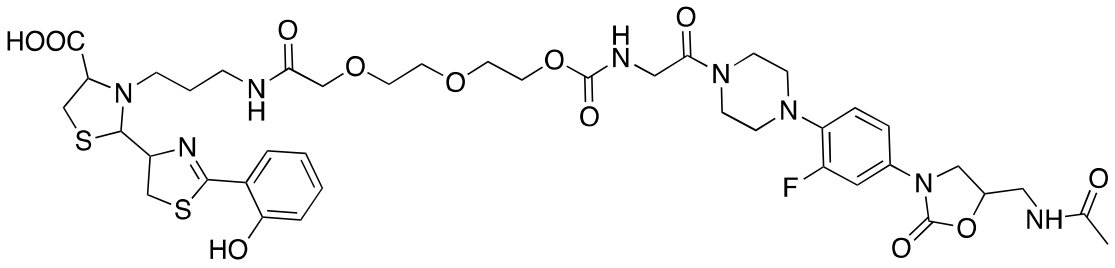
La pyochéline **119** (43 mg, 0,092 mmol) est solubilisée dans du CH_2Cl_2 (2 mL) puis HCl est ajouté (2 mL d'une solution 2N dans l'éther). La solution est agitée 3 h à 25 °C. En parallèle, l'oxazolidinone **165** (49 mg, 0,084 mmol) est solubilisée dans du CH_2Cl_2 (1 mL) puis l'HCl dans l'éther est ajouté (4 mL d'une solution 2N dans l'éther). Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Les milieux réactionnels sont repris dans du CH_2Cl_2 (4 mL) et sont réunis. La DIPEA (0,125 mL, 0,757 mmol) et le HATU (35 mg, 0,092 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée 12 h à 25 °C. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau, puis avec une solution aqueuse d'acide citrique (10%), puis une solution aqueuse de $NaHCO_3$ (10%) et enfin avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis adsorbée sur silice démétallée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice démétallée (gradient CH_2Cl_2/EtOH de 100/0 à 90/10) pour conduire au conjugué **165** sous la forme d'un solide jaune (25 mg, 0,028 mmol, rendement : 34%).



Rf : 0.56 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ7.47-7,33 (m, 3H), 7.13-6.85 (m, 5H), 6.02 (t, *J* = 5.8 Hz, 1 H), 5.09-4.92 (m, 1 H), 4.81-4.73 (m, 2 H), 4.29-4.71 (m, 4H), 4.11 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.03-3.90 (m, 3H), 3.75-3.57 (m, 12H), 3.51-3.30 (m, 5H), 3.00-2.94 (m, 5H), 2.01 (s, 3H), 1.94-1.88 (m, 2H). HRMS (ESI) : $C_{39}H_{50}FN_7O_{11}S_2$: calculée : 875.29938, trouvée : 875.29539

PCH-L9 166

La pyochéline **119** (47 mg, 0,100 mmol) est solubilisée dans du CH_2Cl_2 (2 mL) puis l'HCl dans l'éther est ajouté (2 mL d'une solution 2N dans l'éther). La solution est agitée 2 h à 25 °C. En parallèle, l'oxazolidinone **166** (52 mg, 0,081 mmol) est solubilisée dans le CH_2Cl_2 (1 mL) et HCl dans l'éther est ajouté (4 mL d'une solution 2N dans l'éther). Les milieux réactionnels sont repris dans le CH_2Cl_2 (4 mL) et sont réunis. La DIPEA (0,13 mL, 0,787 mmol) et le HATU (38 mg, 0,100 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée 12 h à 25 °C. La solution est lavée à l'eau, avec une solution aqueuse d'acide citrique (10%), puis avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis adsorbée sur silice démétallée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice démétallée (gradient CH_2Cl_2/EtOH 10/0 à 8/2). Le conjugué **166** est isolé sous forme d'un solide jaune pâle. (47 mg, 0,050 mmol, rendement : 62%)



Rf : 0.40 (CH_2Cl_2/EtOH 9/1). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ7.48-7,32 (m, 3H), 7.07-6.67 (m, 5H), 5.97-5.90 (m, 2H), 5.05-4.93 (m, 1 H), 4.81-4.73 (m, 2H), 4.27-4.23 (m, 4H), 4.13 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.04-3.99 (m, 5H), 3.80-3.31 (m, 20H), 3.05-2.92 (m, 5H), 2.01 (s, 3H), 1.95-1.91 (m, 2H). HRMS (ESI) : $C_{41}H_{53}FN_8O_{12}S_2$: calculée : 932.32084, trouvée : 932.32344

BIBLIOGRAPHIE

(1) Porter, J. R. Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of His Discovery of Bacteria. *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40* (2), 260–269.

(2) Vollmer, W.; Blanot, D.; Pedro, D.; A, M. Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 149–167.

(3) Zaffiri, L.; Gardner, J.; Toledo-Pereyra, L. H. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *J. Invest. Surg.* **2012**, *25* (2), 67–77.

(4) Brown, E. D.; Wright, G. D. Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature* **2016**, *529* (7586), 336–343.

(5) Walsh, C. Where Will New Antibiotics Come From? *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1* (1), 65–70.

(6) Bassetti, M.; Merelli, M.; Temperoni, C.; Astilean, A. New Antibiotics for Bad Bugs: Where Are We? *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2013**, *12* (1), 22.

(7) Clatworthy, A. E.; Pierson, E.; Hung, D. T. Targeting Virulence: A New Paradigm for Antimicrobial Therapy. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (9), 541–548.

(8) Bugg, T. D. H.; Braddick, D.; Dowson, C. G.; Roper, D. I. Bacterial Cell Wall Assembly: Still an Attractive Antibacterial Target. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (4), 167–173.

(9) Bern, M.; Beniston, R.; Mesnage, S. Towards an Automated Analysis of Bacterial Peptidoglycan Structure. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (2), 551–560.

(10) Wright, A. J. The Penicillins. *Mayo Clin. Proc.* **1999**, *74* (3), 290–307.

(11) Walsh, C. Molecular Mechanisms That Confer Antibacterial Drug Resistance. *Nature* **2000**, *406* (6797), 775–781.

(12) Reynolds, P. E. Structure, Biochemistry and Mechanism of Action of Glycopeptide Antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1989**, *8* (11), 943–950.

(13) Franceschi, F.; Duffy, E. M. Structure-Based Drug Design Meets the Ribosome. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71* (7), 1016–1025.

(14) Wilson, D. N. On the Specificity of Antibiotics Targeting the Large Ribosomal Subunit. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1241* (1), 1–16.

(15) Wilson, D. N. Ribosome-Targeting Antibiotics and Mechanisms of Bacterial Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12* (1), 35–48.

(16) Jorgensen, J. H.; McElmeel, M. L.; Trippy, C. W. In Vitro Activities of the Oxazolidinone Antibiotics U-100592 and U-100766 against *Staphylococcus Aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41* (2),

465–467.

(17) Brickner, S. J.; Hutchinson, D. K.; Barbachyn, M. R.; Manninen, P. R.; Ulanowicz, D. A.; Garmon, S. A.; Grega, K. C.; Hendges, S. K.; Toops, D. S.; Ford, C. W.; Zurenko, G. E. Synthesis and Antibacterial Activity of U-100592 and U-100766, Two Oxazolidinone Antibacterial Agents for the Potential Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Positive Bacterial Infections. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (3), 673–679.

(18) Leach, K. L.; Brickner, S. J.; Noe, M. C.; Miller, P. F. Linezolid, the First Oxazolidinone Antibacterial Agent. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1222* (1), 49–54.

(19) Vinh, D. C.; Rubinstein, E. Linezolid: A Review of Safety and Tolerability. *J. Infect.* **2009**, *59*, S59–S74.

(20) Renslo, A. R. Antibacterial Oxazolidinones: Emerging Structure–toxicity Relationships. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2010**, *8* (5), 565–574.

(21) Ippolito, J. A.; Kanyo, Z. F.; Wang, D.; Franceschi, F. J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A.; Duffy, E. M. Crystal Structure of the Oxazolidinone Antibiotic Linezolid Bound to the 50S Ribosomal Subunit. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (12), 3353–3356.

(22) Wilson, D. N.; Schluenzen, F.; Harms, J. M.; Starosta, A. L.; Connell, S. R.; Fucini, P. The Oxazolidinone Antibiotics Perturb the Ribosomal Peptidyl-Transferase Center and Effect tRNA Positioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (36), 13339–13344.

(23) Butler, M. S.; Blaskovich, M. A.; Cooper, M. A. Antibiotics in the Clinical Pipeline in 2013. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2013**, *66* (10), 571–591.

(24) Bush, K. Improving Known Classes of Antibiotics: An Optimistic Approach for the Future. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12* (5), 527–534.

(25) Domagala, J. M. Structure-Activity and Structure-Side-Effect Relationships for the Quinolone Antibacterials. *J. Antimicrob. Chemother.* **1994**, *33* (4), 685–706.

(26) 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. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16* (6), 667–669.

(27) Wohlkonig, A.; Chan, P. F.; Fosberry, A. P.; Homes, P.; Huang, J.; Kranz, M.; Leydon, V. R.; Miles, T. J.; Pearson, N. D.; Perera, R. L.; Shillings, A. J.; Gwynn, M. N.; Bax, B. D. Structural Basis of Quinolone Inhibition of Type IIA Topoisomerases and Target-Mediated Resistance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17* (99), 1152–1153.

(28) Champoux, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism.

Annu. Rev. Biochem. **2001**, *70* (1), 369–413.

(29) Levine, C.; Hiasa, H.; Marians, K. J. DNA Gyrase and Topoisomerase IV: Biochemical Activities, Physiological Roles during Chromosome Replication, and Drug Sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1998**, *1400* (1–3), 29–43.

(30) Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (5), 421–433.

(31) Drlica, K.; Zhao, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61* (3), 377–392.

(32) Aldred, K. J.; Kerns, R. J.; Osheroff, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry (Mosc.)* **2014**, *53* (10), 1565–1574.

(33) Zaffiri, L.; Gardner, J.; Toledo-Pereyra, L. H. History of Antibiotics: From Fluoroquinolones to Daptomycin (Part 2). *J. Invest. Surg.* **2013**, *26* (4), 167–179.

(34) Vilhena, C.; Bettencourt, A. Daptomycin: A Review of Properties, Clinical Use, Drug Delivery and Resistance. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12* (3), 202–209.

(35) Baltz, R. H.; Miao, V.; Wrigley, S. K. Natural Products to Drugs: Daptomycin and Related Lipopeptide Antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22* (6), 717–741.

(36) Pogliano, J.; Pogliano, N.; Silverman, J. A. Daptomycin-Mediated Reorganization of Membrane Architecture Causes Mislocalization of Essential Cell Division Proteins. *J. Bacteriol.* **2012**, *194* (17), 4494–4504.

(37) Green, J. M.; Matthews, R. G. Folate Biosynthesis, Reduction, and Polyglutamylation and the Interconversion of Folate Derivatives. *EcoSal Plus* **2007**, *2* (2).

(38) Yoneyama, H.; Katsumata, R. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70* (5), 1060–1075.

(39) Tenover, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am. J. Med.* **2006**, *119* (6), S3–S10.

(40) Ruppé, É.; Woerther, P.-L.; Barbier, F. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacilli. *Ann. Intensive Care* **2015**, *5*.

(41) 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. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53* (2), 208–216.

(42) Bugg, T. D. H.; Wright, G. D.; Dutka-Malen, S.; Arthur, M.; Courvalin, P.;

Walsh, C. T. Molecular Basis for Vancomycin Resistance in *Enterococcus Faecium* BM4147: Biosynthesis of a Depsipeptide Peptidoglycan Precursor by Vancomycin Resistance Proteins VanH and VanA. *Biochemistry (Mosc.)* **1991**, *30* (43), 10408–10415.

(43) Hooper, D. C.; Jacoby, G. A. Mechanisms of Drug Resistance: Quinolone Resistance: Mechanisms of Quinolone Resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1354* (1), 12–31.

(44) Beauclerk, A. A. D.; Cundliffe, E. Sites of Action of Two Ribosomal RNA Methylases Responsible for Resistance to Aminoglycosides. *J. Mol. Biol.* **1987**, *193* (4), 661–671.

(45) Cundliffe, E. How Antibiotic-Producing Organisms Avoid Suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* **1989**, *43* (1), 207–233.

(46) Babic, M.; Hujer, A. M.; Bonomo, R. A. What's New in Antibiotic Resistance? Focus on Beta-Lactamases. *Drug Resist. Updat.* **2006**, *9* (3), 142–156.

(47) Mingeot-Leclercq, M.-P.; Glupczynski, Y.; Tulkens, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (4), 727–737.

(48) Quinn, J. P.; Dudek, E. J.; DiVincenzo, C. A.; Lucks, D. A.; Lerner, S. A. Emergence of Resistance to Imipenem During Therapy for *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *J. Infect. Dis.* **1986**, *154* (2), 289–294.

(49) Nikaido, H. Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *Science* **1994**, *264* (5157), 382–388.

(50) Lister, P. D.; Wolter, D. J.; Hanson, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (4), 582–610.

(51) Livermore, D. M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas Aeruginosa: Our Worst Nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34* (5), 634–640.

(52) Kretchmar, S. A.; Reyes, Z. E.; Raymond, K. N. The Spectroelectrochemical Determination of the Reduction Potential of Differic Serum Transferrin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1988**, *956* (1), 85–94.

(53) Braun, V.; Killmann, H. Bacterial Solutions to the Iron-Supply Problem. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24* (3), 104–109.

(54) Drakesmith, H.; Prentice, A. Viral Infection and Iron Metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6* (7), 541–552.

(55) Harrison, F. Microbial Ecology of the Cystic Fibrosis Lung. *Microbiology*

2007, *153* (4), 917–923.

(56) Fajardo, A.; Martínez-Martín, N.; Mercadillo, M.; Galán, J. C.; Ghysels, B.; Matthijs, S.; Cornelis, P.; Wiehlmann, L.; Tümmler, B.; Baquero, F.; Martínez, J. L. The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *PLOS ONE* **2008**, *3* (2), e1619.

(57) Ciofu, O.; Tolker-Nielsen, T.; Jensen, P. Ø.; Wang, H.; Høiby, N. Antimicrobial Resistance, Respiratory Tract Infections and Role of Biofilms in Lung Infections in Cystic Fibrosis Patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *85*, 7–23.

(58) Leid, J. G.; Willson, C. J.; Shirtliff, M. E.; Hassett, D. J.; Parsek, M. R.; Jeffers, A. K. The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN-γ-Mediated Macrophage Killing. *J. Immunol.* **2005**, *175* (11), 7512–7518.

(59) Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35* (4), 322–332.

(60) Rada, B.; Leto, T. L. Pyocyanin Effects on Respiratory Epithelium: Relevance in Pseudomonas Aeruginosa Airway Infections. *Trends Microbiol.* **2013**, *21* (2), 73–81.

(61) Rada, B.; Leto, T. L. Redox Warfare between Airway Epithelial Cells and Pseudomonas: Dual Oxidase versus Pyocyanin. *Immunol. Res.* **2009**, *43* (1–3), 198–209.

(62) Wolz, C.; Hohloch, K.; Ocaktan, A.; Poole, K.; Evans, R. W.; Rochel, N.; Albrecht-Gary, A. M.; Abdallah, M. A.; Döring, G. Iron Release from Transferrin by Pyoverdin and Elastase from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Infect. Immun.* **1994**, *62* (9), 4021–4027.

(63) Tommasi, R.; Brown, D. G.; Walkup, G. K.; Manchester, J. I.; Miller, A. A. ESKAPEing the Labyrinth of Antibacterial Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (8), 529–542.

(64) Schauer, K.; Rodionov, D. A.; de Reuse, H. New Substrates for TonB-Dependent Transport: Do We Only See the "tip of the Iceberg"? *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33* (7), 330–338.

(65) Chu, B. C.; Garcia-Herrero, A.; Johanson, T. H.; Krewulak, K. D.; Lau, C. K.; Peacock, R. S.; Slavinskaya, Z.; Vogel, H. J. Siderophore Uptake in Bacteria and the Battle for Iron with the Host; a Bird's Eye View. *BioMetals* **2010**, *23* (4), 601–611.

(66) Dumas, Z.; Ross-Gillespie, A.; Kümmerli, R. Switching between Apparently Redundant Iron-Uptake Mechanisms Benefits Bacteria in Changeable Environments. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, *280* (1764), 20131055.

(67) Andrews, S. C.; Robinson, A. K.; Rodríguez-Quiñones, F. Bacterial Iron Homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27* (2–3), 215–237.

(68) Wang, Y.; Wilks, J. C.; Danhorn, T.; Ramos, I.; Croal, L.; Newman, D. K. Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (14), 3606–3617.

(69) 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.

(70) Ochsner, U. A.; Johnson, Z.; Vasil, M. L. Genetics and Regulation of Two Distinct Haem-Uptake Systems, Phu and Has, in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiology* **2000**, *146* (1), 185–198.

(71) Bhakta, M. N.; Wilks, A. The Mechanism of Heme Transfer from the Cytoplasmic Heme Binding Protein PhuS to the δ-Regioselective Heme Oxygenase of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45* (38), 11642–11649.

(72) O'Neill, M. J.; Bhakta, M. N.; Fleming, K. G.; Wilks, A. Induced Fit on Heme Binding to the *Pseudomonas Aeruginosa* Cytoplasmic Protein (PhuS) Drives Interaction with Heme Oxygenase (HemO). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (15), 5639.

(73) de Amorim, G. C.; Prochnicka-Chalufour, A.; Delepelaire, P.; Lefèvre, J.; Simenel, C.; Wandersman, C.; Delepierre, M.; Izadi-Pruneyre, N. The Structure of HasB Reveals a New Class of TonB Protein Fold. *PLoS ONE* **2013**, *8* (3).

(74) Ozenberger, B. A.; Nahlik, M. S.; McIntosh, M. A. Genetic Organization of Multiple Fep Genes Encoding Ferric Enterobactin Transport Functions in *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* **1987**, *169* (8), 3638–3646.

(75) Cornelis, P.; Dingemans, J. *Pseudomonas Aeruginosa* Adapts Its Iron Uptake Strategies in Function of the Type of Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3*.

(76) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (5), 637.

(77) Budzikiewicz, H. Siderophores of the Human Pathogenic Fluorescent Pseudomonads. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1* (1), 1–6.

(78) de Chial, M.; Ghysels, B.; Beatson, S. A.; Geoffroy, V.; Meyer, J. M.; Pattery, T.; Baysse, C.; Chablain, P.; Parsons, Y. N.; Winstanley, C.; Cordwell, S. J.; Cornelis, P. Identification of Type II and Type III Pyoverdine Receptors from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiology* **2003**, *149* (4), 821–831.

(79) Schalk, I. J.; Guillon, L. Pyoverdine Biosynthesis and Secretion in

Pseudomonas Aeruginosa: Implications for Metal Homeostasis. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15* (6), 1661–1673.

(80) Albrecht-Gary, A.-M.; Blanc, S.; Rochel, N.; Ocaktan, A. Z.; Abdallah, M. A. Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Pyoverdin PaA, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Inorg. Chem.* **1994**, *33* (26), 6391–6402.

(81) Greenwald, J.; Hoegy, F.; Nader, M.; Journet, L.; Mislin, G. L. A.; 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), 2987–2995.

(82) Yeterian, E.; Martin, L. W.; Lamont, I. L.; Schalk, I. J. An Efflux Pump Is Required for Siderophore Recycling by *Pseudomonas Aeruginosa*: Siderophore Recycling by an Efflux Pump. *Environ. Microbiol. Rep.* **2009**, *2* (3), 412–418.

(83) A. Mislin, G. L.; J. Schalk, I. Siderophore-Dependent Iron Uptake Systems as Gates for Antibiotic Trojan Horse Strategies against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Metallomics* **2014**, *6* (3), 408–420.

(84) 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 Trans.* **2012**, *41* (9), 2820.

(85) Konings, A. F.; Martin, L. W.; Sharples, K. J.; Roddam, L. F.; Latham, R.; Reid, D. W.; Lamont, I. L. *Pseudomonas Aeruginosa* Uses Multiple Pathways To Acquire Iron during Chronic Infection in Cystic Fibrosis Lungs. *Infect. Immun.* **2013**, *81* (8), 2697–2704.

(86) Cox, C. D.; Rinehart, K. L.; Moore, M. L.; Cook, J. C. Pyochelin: Novel Structure of an Iron-Chelating Growth Promoter for *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78* (7), 4256–4260.

(87) Youard, Z. A.; Mislin, G. L. A.; Majcherczyk, P. A.; Schalk, I. J.; Reimmann, C. *Pseudomonas Fluorescens* CHA0 Produces Enantio-Pyochelin, the Optical Antipode of the *Pseudomonas Aeruginosa* Siderophore Pyochelin. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (49), 35546–35553.

(88) 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.

(89) Tseng, C.-F.; Burger, A.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J.; Yu, S. S.-F.; Chan, S. I.; Abdallah, M. A. Bacterial Siderophores: The Solution Stoichiometry and Coordination of the Fe(III) Complexes of Pyochelin and Related Compounds. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11* (4), 419–432.

(90) 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.

(91) Mislin, G. L. A.; Hoegy, F.; Cobessi, D.; Poole, K.; Rognan, D.; Schalk, I. J. Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357* (5), 1437–1448.

(92) Traxler, M. F.; Seyedsayamdost, M. R.; Clardy, J.; Kolter, R. Interspecies Modulation of Bacterial Development through Iron Competition and Siderophore Piracy: Xenosiderophores Alter Development in Actinomycetes. *Mol. Microbiol.* **2012**, *86* (3), 628–644.

(93) Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. Enterobactin: An Archetype for Microbial Iron Transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (7), 3584–3588.

(94) Dean, C. R.; Poole, K. Expression of the Ferric Enterobactin Receptor (PfeA) of *Pseudomonas Aeruginosa*: Involvement of a Two-Component Regulatory System. *Mol. Microbiol.* **1993**, *8* (6), 1095–1103.

(95) Ghysels, B.; Ochsner, U.; Möllman, U.; Heinisch, L.; Vasil, M.; Cornelis, P.; Matthijs, S. The *Pseudomonas Aeruginosa* pirA Gene Encodes a Second Receptor for Ferrienterobactin and Synthetic Catecholate Analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *246* (2), 167–174.

(96) Lewenza, S.; Gardy, J. L.; Brinkman, F. S. L.; Hancock, R. E. W. Genome-Wide Identification of *Pseudomonas Aeruginosa* Exported Proteins Using a Consensus Computational Strategy Combined with a Laboratory-Based PhoA Fusion Screen. *Genome Res.* **2005**, *15* (2), 321–329.

(97) Raymond, K. N.; Carrano, C. J. Coordination Chemistry and Microbial Iron Transport. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12* (5), 183–190.

(98) 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. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (5), 1212–1220.

(99) 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.

(100) Braun, V.; Pramanik, A.; Gwinner, T.; Köberle, M.; Bohn, E. Sideromycins: Tools and Antibiotics. *BioMetals* **2009**, *22* (1), 3–13.

(101) Benz, G.; Schröder, T.; Kurz, J.; Wünsche, C.; Karl, W.; Steffens, G.; Pfitzner, J.; Schmidt, D. Konstitution Der Desferriform Der Albomycine δ1, δ2 Und ε. *Angew. Chem.* **1982**, *94* (7), 552–553.

(102) Bickel, H.; Gäumann, E.; Nussberger, G.; Reusser, P.; Vischer, E.; Voser, W.; Wettstein, A.; Zähner, H. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 25. Mitteilung. Über Die Isolierung Und Charakterisierung Der Ferrimycine A1 Und A2, Neuer Antibiotika Der Sideromycin-Gruppe. *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43* (7), 2105–2118.

(103) Huber, P.; Leuenberger, H.; Keller-Schierlein, W. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 233. Mitteilung. Danoxamin, Der Eisenbindende Teil Des Sideromycin-Antibioticums Danomycin. *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69* (1), 236–245.

(104) Vértesy, L.; Aretz, W.; Fehlhaber, H.-W.; Kogler, H. Salmycin A–D, Antibiotika Aus Streptomyces Violaceus, DSM 8286, Mit Siderophor-Aminoglycosid-Struktur. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78* (1), 46–60.

(105) Lorenzo, V. de. Isolation and Characterization of Microcin E492 from *Klebsiella Pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **1984**, *139* (1), 72–75.

(106) Reynolds, D. M.; Schatz, A.; Waksman, S. A. Grisein, a New Antibiotic Produced by a Strain of *Streptomyces Griseus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1947**, *64*, 50–54.

(107) Pramanik, A.; Braun, V. Albomycin Uptake via a Ferric Hydroxamate Transport System of Streptococcus Pneumoniae R6. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (11), 3878–3886.

(108) Clarke, T. E. 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), 13966–13972.

(109) Braun, V.; Günthner, K.; Hantke, K.; Zimmermann, L. Intracellular Activation of Albomycin in *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1983**, *156* (1), 308–315.

(110) Hartmann, A.; Fiedler, H.-P.; Braun, V. Uptake and Conversion of the

Antibiotic Albomycin by *Escherichia Coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *99* (3), 517–524.

(111) Pramanik, A.; Stroeher, 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), 459–469.

(112) Pons, A.-M.; Zorn, N.; Vignon, D.; Delalande, F.; Dorsselaer, A. V.; Cottenceau, G. Microcin E492 Is an Unmodified Peptide Related in Structure to Colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (1), 229–230.

(113) Thomas, X. Siderophore Peptide, a New Type of Post-Translationally Modified Antibacterial Peptide with Potent Activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (27), 28233–28242.

(114) Patzer, S. I.; Baquero, M. R.; Bravo, D.; Moreno, F.; Hantke, K. The Colicin G, H and X Determinants Encode Microcins M and H47, Which Might Utilize the Catecholate Siderophore Receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology* **2003**, *149* (9), 2557–2570.

(115) Destoumieux-Garzón, D.; Peduzzi, J.; Thomas, X.; Djediat, C.; Rebuffat, S. Parasitism of Iron-Siderophore Receptors of *Escherichia Coli* by the Siderophore-Peptide Microcin E492m and Its Unmodified Counterpart. *Biometals* **2006**, *19* (2), 181–191.

(116) Mashiach, R.; Meijler, M. M. Total Synthesis of Pyoverdin D. *Org. Lett.* **2013**, *15* (7), 1702–1705.

(117) Kinzel, O.; Tappe, R.; Gerus, I.; Budzikiewicz, H. The Synthesis and Antibacterial Activity of Two Pyoverdin-Ampicillin Conjugates, Entering *Pseudomonas Aeruginosa* via the Pyoverdin-Mediated Iron Uptake Pathway. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1998**, *51* (5), 499–507.

(118) Kinzel, O.; Budzikiewicz, H. Synthesis and Biological Evaluation of a Pyoverdin-Beta-Lactam Conjugate: A New Type of Arginine-Specific Cross-Linking in Aqueous Solution. *J. Pept. Res.* **1999**, *53* (6), 618–625.

(119) Hennard, C.; Truong, Q. C.; Desnottes, J.-F.; Paris, J.-M.; Moreau, N. J.; Abdallah, M. A. Synthesis and Activities of Pyoverdin−Quinolone Adducts: A Prospective Approach to a Specific Therapy Against *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (13), 2139–2151.

(120) Yoganathan, S.; Sit, C. S.; Vederas, J. C. Chemical Synthesis and Biological Evaluation of Gallidermin-Siderophore Conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (7), 2133.

(121) Noël, 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 N3″-Functionalized Pyochelin. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (24), 8288.

(122) 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.

(123) Zähner, H.; Diddens, H.; Keller-Schierlein, W.; Nägeli, H. U. Some Experiments with Semisynthetic Sideromycins. *Jpn. J. Antibiot.* **1977**, *30*, 201–206.

(124) Brochu, A.; Brochu, N.; Nicas, T. I.; Parr, T. R.; Minnick, A. A.; Dolence, E. K.; McKee, J. A.; Miller, M. J.; Lavoie, M. C.; Malouin, F. Modes of Action and Inhibitory Activities of New Siderophore-Beta-Lactam Conjugates That Use Specific Iron Uptake Pathways for Entry into Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36* (10), 2166–2175.

(125) Wencewicz, T. A.; Möllmann, U.; Long, T. E.; Miller, M. J. 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.

(126) Juárez-Hernández, R. E.; Miller, P. A.; Miller, M. J. Syntheses of Siderophore–Drug Conjugates Using a Convergent Thiol–Maleimide System. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (10), 799–803.

(127) 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. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (12), 3828–3836.

(128) Wencewicz, T. A.; Long, T. E.; Möllmann, U.; Miller, M. J. Trihydroxamate Siderophore–Fluoroquinolone Conjugates Are Selective Sideromycin Antibiotics That Target *Staphylococcus Aureus*. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (3), 473–486.

(129) Zheng, T.; Bullock, J. L.; Nolan, E. M. Siderophore-Mediated Cargo Delivery to the Cytoplasm of *Escherichia Coli* and *Pseudomonas Aeruginosa*: Syntheses of Monofunctionalized Enterobactin Scaffolds and Evaluation of Enterobactin–Cargo Conjugate Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (44), 18388–18400.

(130) Zheng, T.; Nolan, E. M. Enterobactin-Mediated Delivery of β-Lactam Antibiotics Enhances Antibacterial Activity against Pathogenic *Escherichia Coli*. *J. Am.*

Chem. Soc. **2014**, *136* (27), 9677–9691.

(131) 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. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (24), 9898–9901.

(132) Fardeau, S.; Dassonville-Klimpt, A.; Audic, N.; Sasaki, A.; Pillon, M.; Baudrin, E.; Mullié, C.; Sonnet, P. Synthesis and Antibacterial Activity of Catecholate–ciprofloxacin Conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (15), 4049–4060.

(133) Page, M. G. P.; Dantier, C.; Desarbre, E. In Vitro Properties of BAL30072, a Novel Siderophore Sulfactam with Activity against Multiresistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (6), 2291–2302.

(134) Han, S.; Zaniewski, R. P.; Marr, E. S.; Lacey, B. M.; Tomaras, A. P.; Evdokimov, A.; Miller, J. R.; Shanmugasundaram, V. Structural Basis for Effectiveness of Siderophore-Conjugated Monocarbams against Clinically Relevant Strains of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (51), 22002–22007.

(135) Ito, A.; Kohira, N.; Bouchillon, S. K.; West, J.; Rittenhouse, S.; Sader, H. S.; Rhomberg, P. R.; Jones, R. N.; Yoshizawa, H.; Nakamura, R.; Tsuji, M.; Yamano, Y. In Vitro Antimicrobial Activity of S-649266, a Catechol-Substituted Siderophore Cephalosporin, When Tested against Non-Fermenting Gram-Negative Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71* (3), 670–677.

(136) Kohira, N.; West, J.; Ito, A.; Ito-Horiyama, T.; Nakamura, R.; Sato, T.; Rittenhouse, S.; Tsuji, M.; Yamano, Y. In Vitro Antimicrobial Activity of a Siderophore Cephalosporin, S-649266, against *Enterobacteriaceae* Clinical Isolates, Including Carbapenem-Resistant Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (2), 729–734.

(137) Ito, A.; Nishikawa, T.; Matsumoto, S.; Yoshizawa, H.; Sato, T.; Nakamura, R.; Tsuji, M.; Yamano, Y. Siderophore Cephalosporin Cefiderocol Utilizes Ferric Iron Transporter Systems for Antibacterial Activity against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (12), 7396–7401.

(138) Wyckoff, E. E.; Allred, B. E.; Raymond, K. N.; Payne, S. M. Catechol Siderophore Transport by *Vibrio Cholerae*. *J. Bacteriol.* **2015**, *197* (17), 2840–2849.

(139) Poole, K.; Young, L.; Neshat, S. Enterobactin-Mediated Iron Transport in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1990**, *172* (12), 6991–6996.

(140) Schalk, I. J.; Guillon, L. Fate of Ferrisiderophores after Import across Bacterial

Outer Membranes: Different Iron Release Strategies Are Observed in the Cytoplasm or Periplasm Depending on the Siderophore Pathways. *Amino Acids* **2013**, *44* (5), 1267–1277.

(141) Demange, P.; Bateman, A.; Dell, A.; Abdallah, M. A. Structure of Azotobactin D, a Siderophore of *Azotobacter Vinelandii* Strain D (CCM 289). *Biochemistry (Mosc.)* **1988**, *27* (8), 2745–2752.

(142) Cornish, A. S.; Page, W. J. The Catecholate Siderophores of *Azotobacter Vinelandii*: Their Affinity for Iron and Role in Oxygen Stress Management. *Microbiology* **1998**, *144* (7), 1747–1754.

(143) Baco, E.; Hoegy, F.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Diphenyl-benzo[1,3]dioxole-4-Carboxylic Acid Pentafluorophenyl Ester: A Convenient Catechol Precursor in the Synthesis of Siderophore Vectors Suitable for Antibiotic Trojan Horse Strategies. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (5), 749.

(144) Duhme, A.-K.; Hider, R. C.; Khodr, H. H. Synthesis and Iron-Binding Properties of Protochelin, the Tris (Catecholamide) Siderophore of *Azotobacter Vinelandii*. *Chem. Ber.* **1997**, *130* (7), 969–973.

(145) Souto, A.; Montaos, M. A.; Balado, M.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. Synthesis and Antibacterial Activity of Conjugates between Norfloxacin and Analogues of the Siderophore Vanchrobactin. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (1), 295–302.

(146) Nikaido, H. Outer Membrane Barrier as a Mechanism of Antimicrobial Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33* (11), 1831–1836.

(147) 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*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1999**, *6* (1), 56–63.

(148) Schumacher, A.; Trittler, R.; Bohnert, J. A.; Kummerer, K.; Pages, J.-M.; Kern, W. V. Intracellular Accumulation of Linezolid in Escherichia Coli, Citrobacter Freundii and Enterobacter Aerogenes: Role of Enhanced Efflux Pump Activity and Inactivation. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59* (6), 1261–1264.

(149) Yan, S.; Miller, M. J.; Wencewicz, T. A.; Möllmann, U. Syntheses and Antibacterial Activity Studies of New Oxazolidinones from Nitroso Diels–Alder Chemistry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (3), 1302–1305.

(150) Paulen, A.; Gasser, V.; Hoegy, F.; Perraud, Q.; Pesset, B.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Synthesis and Antibiotic Activity of Oxazolidinone–catechol Conjugates against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Org Biomol Chem* **2015**, *13*, 11567–11579.

(151) Fringuelli, F.; Pizzo, F.; Vaccaro, L. Cobalt (II) Chloride-Catalyzed Chemoselective Sodium Borohydride Reduction of Azides in Water. *Synthesis* **2000**, *2000* (5), 646–650.

(152) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.

(153) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.

(154) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide−Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015.

(155) Gordon, C. G.; Mackey, J. L.; Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Houk, K. N.; Bertozzi, C. R. Reactivity of Biarylazacyclooctynones in Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (22), 9199–9208.

(156) Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry. In *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*; Lahann, J., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 2009; pp 29–51.

(157) Pothukanuri, S.; Winssinger, N. A Highly Efficient Azide-Based Protecting Group for Amines and Alcohols. *Org. Lett.* **2007**, *9* (11), 2223–2225.

(158) Reid, D. W.; O'May, C.; Kirov, S. M.; Roddam, L.; Lamont, I. L.; Sanderson, K. Iron Chelation Directed against Biofilms as an Adjunct to Conventional Antibiotics. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **2009**, *296* (5), L857–L858.

(159) Luo, G.; Spellberg, B.; Gebremariam, T.; Lee, H.; Xiong, Y. Q.; French, S. W.; Bayer, A.; Ibrahim, A. S. Combination Therapy with Iron Chelation and Vancomycin in Treating Murine Staphylococcemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33* (5), 845–851.

(160) Vergne, A. F.; Walz, A. J.; Miller, M. J. Iron Chelators from *Mycobacteria* (1954–1999) and Potential Therapeutic Applications. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17* (1), 99–116.

(161) Loren, J. C.; Krasiński, A.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *N*H-1,2,3-Triazoles from Azidomethyl Pivalate and Carbamates: Base-Labile N-Protecting Groups. *Synlett* **2005**, No. 18, 2847–2850.

(162) Zhu, M.; Valdebenito, M.; Winkelmann, G.; Hantke, K. Functions of the Siderophore Esterases IroD and IroE in Iron-Salmochelin Utilization. *Microbiology* **2005**, *151* (7), 2363–2372.

(163) Noël, S.; Guillon, L.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Synthesis of Fluorescent Probes Based on the Pyochelin Siderophore Scaffold. *Org. Lett.* **2011**, *13* (5), 844–847.

(164) Finkelstein, H. Darstellung Organischer Jodide Aus Den Entsprechenden Bromiden Und Chloriden. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43* (2), 1528–1532.

(165) Marriott, K.-S. C.; Morrison, A. Z.; Moore, M.; Olubajo, O.; Stewart, L. E. Synthesis of *N*-Phenyl-*N*-(3-(Piperidin-1-Yl)propyl)benzofuran-2-Carboxamides as New Selective Ligands for Sigma Receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (23), 6856–6861.

(166) Robinson-Fuentes, V.; Jefferies, T. M.; Branch, S. K. Degradation Pathways of Ampicillin in Alkaline Solutions. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49* (9), 843–851.

(167) Woitun, E.; Wetzel, B.; Maier, R.; Dersch, W. Eine Einfache Synthese von 6-α-Methoxy-Amoxycillin. *Synthesis* **1986**, *1986* (9), 782–784.

(168) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853–2855.

(169) Kuang, G.-C.; Michaels, H. A.; Simmons, J. T.; Clark, R. J.; Zhu, L. Chelation-Assisted, Copper(II)-Acetate-Accelerated Azide−Alkyne Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (19), 6540–6548.

(170) von Delius, M.; Geertsema, E. M.; Leigh, D. A. A Synthetic Small Molecule That Can Walk down a Track. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (2), 96–101.

Aurélie PAULEN

Utilisation de la stratégie du cheval de Troie pour lutter contre *Pseudomonas aeruginosa* : Synthèses et propriétés biologiques de conjugués sidérophores-antibiotiques

Résumé

La découverte de stratégies thérapeutiques innovantes contre les bactéries pathogènes est cruciale. Le fer est essentiel pour la prolifération bactérienne et les bactéries pathogènes excrètent des molécules organiques de faible poids moléculaire, appelées sidérophores, pour acquérir le fer(III). Les systèmes d'acquisition de fer sidérophores-dépendants sont transmembranaires et peuvent être utilisés comme des portes d'entrée pour faire pénétrer des conjugués sidérophores-antibiotiques dans la bactérie dans le cadre d'une stratégie dite du cheval de Troie. Nous avons synthétisé des conjugués constitués d'analogues des sidérophores pyochéline, aminochéline ou azotochéline couplés à des oxazolidinones antibiotiques. Dans la majorité de nos approches la liaison entre le sidérophore et l'antibiotique est le résultat d'une réaction de chimie click. La synthèse et les propriétés biologiques des vecteurs et des conjugués synthétisés sont présentées dans ce manuscrit.

Mots-clefs : Pyochéline, Catéchol, Oxazolidinone, Stratégie du cheval de Troie, Sidérophore.

Abstract

Constant discovery of innovative therapeutic strategies against pathogenic bacteria is crucial. Iron is essential for bacterial proliferation since it is integrated in the active site of essential enzymes. Many pathogenic bacteria excrete low molecular weight secondary metabolites called siderophores in order to promote iron (III) acquisition. Tansmembrane siderophore-dependent iron uptake systems can be used as gates by siderophore-antibiotic conjugates. In this context, we synthesized conjugates between analogs of pyochelin, aminochelin or azotochelin with oxazolidinones antibiotics. In this project many of the conjugation between vectors and antibiotics were the result of click chemistry reactions even the use of peptidic bonds was also explored. Synthesis and biological properties of conjugates and vectors are presented in this manuscript.

Key words: Pyochelin, Catechol, Oxazolidinone, Trojan horse strategy, Siderophore.