



HAL
open science

Détection de la résistance à la vancomycine par mise en évidence d'une activité D-Ala-D-Ala dipeptidase

Windbedema Prisca Ouedraogo

► To cite this version:

Windbedema Prisca Ouedraogo. Détection de la résistance à la vancomycine par mise en évidence d'une activité D-Ala-D-Ala dipeptidase. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC404 . tel-02881618

HAL Id: tel-02881618

<https://theses.hal.science/tel-02881618v1>

Submitted on 25 Jun 2020

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Détection de la résistance à la vancomycine par mise en évidence d'une activité D-Ala-D-Ala dipeptidase

**Présentée et soutenue par
Windbedema Prisca OUEDRAOGO**

**Thèse soutenue publiquement le 02/06/2020
devant le jury composé de**

M. VINCENT CATTOIR	Professeur des universités PraticienHosp, Université Rennes 1	Rapporteur du jury
M. PASCAL MARCHAND	Professeur des universités, Université de Nantes	Rapporteur du jury
M. JEAN CHRISTOPHE GIARD	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. MOUSSA OUEDRAOGO	Maître de conférences, Université de Ouagadougou	Membre du jury
M. FREDERIC FABIS	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. THOMAS CAILLY	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

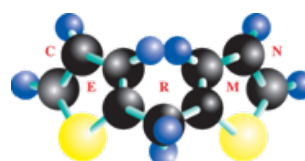
Thèse dirigée par FREDERIC FABIS et THOMAS CAILLY, Centre d'études et de recherches sur le médicament de normandie (Caen)



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Chimie



A Monsieur Vincent Cattoir,

Professeur des universités, Praticien-Hospitalier, Université Rennes 1

A Monsieur Pascal Marchand,

Professeur des universités, Université de Nantes

A Monsieur Jean-Christophe Giard,

Professeur des universités, Université Caen Normandie

A Monsieur Moussa Ouédraogo,

Maître de conférences, Université Joseph KI-ZERBO

A Monsieur Frédéric Fabis,

Professeur des universités, Université Caen Normandie

A Monsieur Thomas Cailly,

Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie

Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit,

Et de juger mon travail,

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

Remerciements

J'exprime ma profonde gratitude aux structures qui ont contribué à la réalisation de ce doctorat d'université, l'Agence Régionale de la Santé, le CHU de Caen Normandie, le Centre National de Référence des Entérocoques Résistants aux Glycopeptides et le Centre D'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie.

Je tiens vivement à exprimer ma profonde reconnaissance à mes deux directeurs de thèse M. Frédéric FABIS et M. Thomas CAILLY, pour l'encadrement et pour la confiance qu'ils m'ont manifestée. C'est avec vous que j'ai commencé mon premier stage dans un laboratoire de chimie en 2012. Vous avez su me transmettre à l'époque déjà votre passion pour la chimie. Ces années de thèse avec vos conseils m'ont permis d'acquérir et de murir mes connaissances en chimie.

Je remercie vivement M. Vincent Cattoir qui m'a permis de commencer avec lui mon stage de master 1 lors de mon externat de pharmacie, et qui m'a communiqué la passion de la microbiologie.

Je remercie M. Jean Christophe Giard d'avoir bien voulu m'encadrer pour les manipulations en microbiologie, dans le cadre des travaux de ce doctorat. Merci pour tes conseils tes suggestions et ta disponibilité. Je remercie également Julie, Anne, Sébastien, François, Michel dit Zouzou, Pépité, Doudou ainsi que toute l'équipe de Recherche du service de microbiologie pour l'accueil en microbiologie. Je me suis sentie très bien avec vous! Merci d'avoir partagé mes moments de joie. Maintenant que j'ai fini la thèse, j'attends vos invitations, et bien sûr vous être les bienvenus au Burkina Faso!

Je remercie Sangeetha, merci pour ta présence et ton amitié, pour le partage de phrases et pensées philosophiques pour prendre les choses du bon côté même quand la chimie nous était rebelle!

Je remercie du fond du cœur toute l'équipe du CM 038 Christine, Manue, Victor, Clément, Alexandra, vos rapports humains durant ces années de doctorat m'ont été inestimables.

Je remercie le directeur du CERMN, M. Patrick Dallemagne ainsi que l'ensemble du personnel, de m'avoir permis de passer ces années de doctorat dans de très bonnes conditions de travail et de recherche. La chimie était parfois (enfin souvent!) dure mais les conditions de travail

sont irréprochables. Je tiens plus particulièrement à dire merci à Rémi pour toutes les analyses RMN.

Outre ces personnes, j'ai également bénéficié de l'appui indispensable de plusieurs autres. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements. Ainsi, je remercie chaleureusement tous mes parrains et marraines de *La Tortue Voyageuse* ainsi que toutes les familles françaises amies (Mme Sylvie RUBE, Mme Claire JAMME, M. Patrick GRAVE, Mme et M. WARGNY, Marie-Hélène PHILIPPE, la famille DAVY, les familles MISPLON à Conches, LEROOY à Evreux, LAURENT à Barneville-Carteret, Mme Nawal JEWANI,- Mme Sarah HABTE GABRIEL, M. Jean ILLI, Mme et M. MANSE, Mme Sophie DE COUREGES et M. Jean-Louis LIBOIS, Mme Catherine REFLE, M. Olivier LEBOT, Mme Bernadette DESMOUSSEAUX, Mme et M. AHIPO,- Mme et M. JOEL ONYINYECHI, Mme et M. PERSON-NICOLAS) qui m'ont soutenue financièrement et émotionnellement pour que je ne manque de rien pendant mes études en France.

C'est aussi l'occasion de remercier mes parents, amis et connaissances pour leurs soutiens multiformes tout au long de mes études. Je remercie sincèrement mes parents biologiques, mon défunt père Yembi Justin OUEDRAOGO et ma mère Talato Rosalie KAFANDO aux qualités humaines exceptionnelles. Je remercie mon oncle Yemsé Roger OUEDRAOGO, qui a été un père pour moi, mon grand frère Patindyalogo Brice OUEDRAOGO de m'avoir toujours encouragée à aller de l'avant : « nous sommes des combattants qui gagnent » m'as-tu souvent répété.

Je remercie Zakaria, mon cher et tendre époux et Christ-Viim KIEBRE ma délicieuse fille, je vous aime d'un amour éternel et je sais que vous m'aimez bien plus que je vous aime ! Merci pour votre compréhension et votre aide incommensurable pendant ces longues années de doctorat.

A la Tortue Voyageuse et à tous mes parrains et marraines,

“Avec la Tortue Voyageuse, nous avons appris la sagesse et la patience, la connaissance mutuelle nous a fait grandir et avancer pas à pas. Connaître l'Autre, c'est s'enrichir, nous sommes devenus riches de cette connaissance mutuelle”

Sylvie Rubé

Table des matières

Liste des abréviations	4
Chapitre 1 : antibiotiques et antibiorésistance.....	8
1. Généralités sur les Antibiotiques.....	8
1.1. Origine des antibiotiques	8
1.2. Classification des antibiotiques.....	11
1.3. Domaines d'utilisation des antibiotiques par l'homme	17
2. Antibiorésistance	18
2.1. Historique.....	18
2.2. Différents mécanismes de résistances.....	23
2.3. Antibiorésistance : un problème de santé publique mondial	25
3. Alternatives à l'antibiorésistance	27
3.1. Utilisation adéquate des antibiotiques	27
3.2. Préservation de l'efficacité des antibiotiques existants.....	30
3.3. Recherche et développement de nouveaux antibiotiques et de nouveaux vaccins	30
4. Les glycopeptides	34
4.1. La famille des glycopeptides.....	34
4.2. Résistances aux glycopeptides	38
4.3. Méthodes de détection des résistances aux glycopeptides.....	44
5. Problématique des entérocoques résistants aux glycopeptides et projet de thèse	47
5.1. Problématique des entérocoques résistants aux glycopeptides	47
5.2. Projet de thèse	50

Chapitre 2 : Systèmes chimiques auto-immolables, principe et domaines d'application	53
1. Introduction sur les systèmes auto-immolables	53
2. Systèmes auto-immolables : généralités	53
2.1. Agencement des systèmes auto-immolables.....	54
2.2. Mécanismes de Libération des SAI	55
2.3. Aspect cinétique des SAI.....	59
3. Domaines d'application des SAI.....	60
3.1. De la détection au diagnostic clinique	60
3.2. Systèmes d'administration et de distribution des médicaments	73
3.3. Théranostic : agents thérapeutiques et diagnostics	88
3.4. Matériaux d'amplification et de libération contrôlée.....	90
4. Conclusion sur les SAI.....	114
Chapitre 3 : Synthèse de dérivés nicotines auto-immolables en vue de la détection de l'activité D-Ala-D-Ala dipeptidase de vanX	116
1. Objectifs de la thèse	117
2. Clonage, surexpression et évaluation enzymatique de la protéine recombinante d'intérêt 118	
2.1. Clonage, expression, évaluation enzymatique de 6His-VanX.....	118
2.2. Clonage, surexpression protéine et évaluation enzymatique de VanX native	131
3. Synthèse d'un dérivé nicotinate auto-immolable	138
3.1. Ortho-méallation du 2-chloronicotinate d'éthyle 2	142
3.2. Ortho-lithiation du 2-chloronicotinate de <i>t</i> -butyle 21	153

Nous avons évalué dans cette section la synthèse du dérivé 19 [Figure 120].....	153
4. Preuve de concept de l'auto-immolation et substitution nucléophile sur le dérivé lactonique 22	156
4.1. Preuve de concept de l'auto-immolation du système lactonique obtenu	156
4.2. Substitutions nucléophiles sur le dérivé lactonique 22	160
5. Synthèse d'un dérivé nicotinate auto-immobile avec la séquence D-Ala-D-Ala	163
Conclusion et perspectives	166
Experimental section, Materials and equipment	169
1. Microbiology	170
Appendix 1: Bacterial strains and growth conditions	170
Appendix 2: Different bacterial culture mediums were used:.....	170
Appendix 3: Solutions prepared and buffers	171
Annexe 4: Used oligonucleotides.....	171
Appendix 5 : PCR programs and sequencing.....	171
Appendix 6: Used plasmid vectors.....	173
Appendix 7: SDS-PAGE analysis	175
Appendix 8 : Cloning, over-expression and purification of VanX-6His-tag from pQE30 over-expression system	175
Appendix 9: Cloning, over-expression and purification from pET SUMO Protein Expression System	176
2. Chemistry	178
Bibliographie.....	203

Liste des abréviations

AcOH : Acide acétique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BHI : *Brain Heart Infusion*

BMR : bactéries multirésistantes

Boc : *tert*-butoxycarbonyle

BODIPY : Bore-dipyrométhane

Cellules HeLa : Cellules Henrietta Lacks

CMI : concentration minimale inhibitrice

D-Ala-D-Ala : D-Alanine-D-Alanine

DAVLBH : désacétylvinblastine d'hydrazine

DCR : *dendrimer chain reaction*

DLS : Dynamic light scattering

DMF : Diméthylformamide

DMSO-d₆ : Diméthylsulfoxyde deutéré

DRO : Dérivés Réactifs de l'Oxygène

EARS-net : *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

ECDC : Centre européen de prévention et de contrôle des maladies

EET : acide époxyeicosatriénoïque

Equiv. : équivalent

ERG : Entérocoques résistants aux glycopeptides

ERV : Entérocoques résistants à la vancomycine

ESIPT : *Excited State Intramolecular Proton Transfer*

Et₃N : Triéthylamine

EtOAc : *Ethyl acetate*

EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAO : *Food and agriculture Organisation* = Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

GISA : *Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides

GLASS : *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*

GlcNAc : N-acétylglucosamine

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'oxygène

H₂S : Sulfure d'hydrogène

HBT : Benzothiazole

HPLC : *High-Performance Liquid Chromatography*

HRMS : *High Resolution Mass Spectrometry*

*i*PrMgCl : Chlorure d'isopropylmagnésium

IR : InfraRouge

LB : Lysogeny broth, Luria broth, Lennox broth or Luria-Bertani

LPS : lipopolysaccharides

MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*

MLS : macrolides-lincosamides-streptogramine

mp : *Melting point*

MurNAc : acide N-acétylmuramique

NaBH₄ : Borohydrure de sodium

NaHS : Sulfure d'hydrogène sodique

n-BuLi : *n*-Butyllithium

Ni-NTA : nickel-nitroloacétique

NMM : N-méthylmorpholine

OIE : Office internationale des épizooties = Organisation mondiale de la santé animale

OMS : Organisation mondiale de la santé

*p*ABA : acide para-amino-benzoïque

PAL : Phosphatase Alcaline

PBP : *penicillin binding protein*

PCR : *polymerase chain reaction*

Pd(PPh₃)₄ : Tetrakis(triphenylphosphine)palladium

Pd⁰ : Palladium (0)

PEG ou PEO : Polyéthylène glycol

PEtG : Polyéthylglyoxylate

PG : peptidoglycane

PGA : Penicilline G-Amidase

PL : phospholipides

PLP : protéine de liaison à la pénicilline

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAI : Systèmes auto-immolables

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine

SA-βgal : activité β-galactosidase associée à la sénescence

SFM : Société Française de Microbiologie

SIDA : Syndrome d'Immuno Déficience Acquise

SMDC : Small molecule drug conjugate

spp. : *species plurimae*

STxB : Sous-unité B de la Shiga toxine

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

THG : transfert horizontal de gènes

TMPH: 2,2,6,6-Tétraméthylpipéridine

TROD : tests rapides d'orientation diagnostique

UDP : Uridine diphosphate

vanX (en minuscule): gène

VanX (en majuscule): protéine codée par le gène *vanx*

VISA : *Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire à la vancomycine

WSG : *Whole genome sequencing*

Chapitre 1 : antibiotiques et antibiorésistance

Chapitre 1 : antibiotiques et antibiorésistance

1. Généralités sur les Antibiotiques

1.1. Origine des antibiotiques

Le mot antibiotique (*antibiotic*) a été utilisé pour la première fois par le microbiologiste américain Selman Walsman, pour définir l'action inhibitrice de certaines substances issues de microbes du sol, en particulier des champignons microscopiques (Actinomycètes), contre des bactéries pathogènes.¹ Le premier antibiotique naturel, la pénicilline, a été découvert en 1928 par sérendipité par Alexander Fleming. Cependant, des quantités suffisantes n'ont pu être isolées et testées in vitro sur des souris qu'en 1940 par Florey et Chain. Ces tests ont donné des résultats intéressants quant au pouvoir curatif de la pénicilline sur des infections bactériennes des souris. Un an plus tard, c'est-à-dire en 1941, les premiers tests cliniques sur l'Homme ont été effectués avec des résultats exaltants.

En Grèce et en Egypte antiques, des moisissures étaient déjà utilisées pour le traitement des infections. Avant Alexander Fleming, plusieurs chercheurs dont William Roberts (Angleterre, 1874), Tyndall Huxley (Angleterre, 1875), Joaquim Monteiro Caminhoa (Brésil, 1877), Vincenzo Tiberio (Naples, 1895), Ernest Duchesne (France, 1897) ont successivement travaillé mettant en évidence le potentiel d'inhibition microbienne du genre *Penicillium*. Les travaux de ces chercheurs avaient abouti à des conclusions selon lesquelles les moisissures du genre *Penicillium* avaient une action antagoniste sur certains microbes.² Le français Ernest Duchesne avait même réalisé une pénicillothérapie sur des animaux dans le cadre de ses travaux de thèse. Mais ses résultats n'ayant pas été valorisés à l'époque, le monde n'a redécouvert la pénicilline que 30 ans plus tard avec Alexander Fleming.³ Bien que la pénicilline, isolée à partir de champignons microscopiques, soit le premier antibiotique naturel découvert, la première molécule antibiotique commercialisée est la sulfamidochrysoïdine (Prontosil), un colorant industriel dont la métabolisation in vivo libère un sulfamide, molécule active sur les bactéries.⁴

¹Ginbsberg, J. *Am. Chem. Soc. Natl. Hist. Chem. Landmarks* **2005**.

² Arseculeratne, S. N.; Arseculeratne, G. *Mycoses* **2017**, *60* (5), 343–347.

³ Julien, P. *Rev. Hist. Pharm. (Paris)*. **1992**, *80* (293), 234–234.

⁴ Rossignol, P. *Rev. Hist. Pharm. (Paris)*. **1990**, No. 285, 227–228.

A l'état naturel, les antibiotiques sont des molécules bioactives dites métabolites secondaires provenant de microorganismes comme les moisissures et sont capables d'inhiber la croissance d'autres microorganismes. Ils font partie de ce que Julian Davies appelle le parvome (ensemble de petites molécules bioactives produites par les organismes vivants).^{5,5} Plusieurs travaux ont montré que les antibiotiques possèdent diverses autres fonctions lorsqu'ils sont synthétisés par les organismes producteurs. Ces fonctions se réalisent à concentration sub-inhibitrice dans le milieu naturel. Ce phénomène de fonctions diverses pour une même molécule de façon concentration-dépendante est nommé hormesis.⁶ En effet il est même fort probable qu'une molécule antibiotique possède des myriades de fonctions naturelles mais qu'elle ne soit qu'antibiotique dans des conditions spécifiques sur une bactérie donnée. Ainsi les antibiotiques peuvent être des modulateurs allostériques, des catalyseurs, des co-facteurs de catalyseurs et des protéines, des modulateurs de la transcription, des agonistes ou des antagonistes de récepteurs, des molécules de signalisation cellulaire, des antiviraux, des antitumoraux, des antifongiques, des immunomodulateurs, des phéromones, etc. Ce sont des molécules qui permettent ainsi aux organismes producteurs de communiquer, de coexister, de se défendre des autres organismes de leur environnement.^{5,7}

Pour obtenir des effets inhibiteurs sur les bactéries dans les maladies infectieuses, il faudra atteindre des concentrations supérieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI), spécifique de chaque antibiotique et de chaque espèce bactérienne. Des études diverses ont montré qu'à concentration sub-inhibitrice, les antibiotiques sont capables d'induire divers effets sur la communication inter et intra-espèces et la transcription des gènes. Par exemple, les antibiotiques jouent un rôle dans la compétition inter-espèces. Il existe au niveau de la rhizosphère des plantes, des interactions avec les microorganismes du sol. Le résultat de ces interactions peut être positif, négatif ou neutre pour les espèces en présence. L'un de ces types d'interaction est justement la production d'antibiotiques par certains microorganismes dans le but d'éliminer d'autres microorganismes en compétition à proximité. C'est le cas par exemple de *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132) qui colonise la rhizosphère du blé, puis sécrète un antibiotique, la phénazine, pour inhiber la croissance de *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, supprimant ainsi les maladies racinaires du blé qu'aurait induit ce

⁵ Davies, J. *Am. Chem. Soc.* **2011**, 7, 252–259.

⁶ Calabrese, E. J.; Blain, R.. *Toxicology and Applied Pharmacology*. February 1, **2005**, pp 289–301.

⁷ Sengupta, S.; Chattopadhyay, M. K.; Grossart, H. **2013**, 4 (March), 1–13.

dernier.^{8,9} Un rôle similaire des antibiotiques existe entre le champignon *Streptomyces diastatochromogenes* PonSSII, producteur d'antibiotique, et la pomme de terre.¹⁰

Les antibiotiques peuvent jouer également le rôle de molécules de signalisation. Pour exister, les bactéries d'une population doivent, non-seulement, communiquer efficacement entre elles au sein de la population, mais aussi avec les autres groupes de populations d'organismes vivants qui partagent leur environnement. Ainsi, plusieurs études montrent que les antibiotiques sont utilisés comme molécules de communication inter et intra-espèces.^{11,12}

Les antibiotiques jouent également le rôle d'agent de virulence. A concentration sub-inhibitrice, certains antibiotiques comme la rifampicine, la vancomycine, les imipénèmes sont capables de moduler les gènes associés à la virulence de certaines bactéries.¹³⁻¹⁵ Chez *Clostridium difficile*, Gerber et al. ont montré par des expériences *in vitro* que la production de toxines A et B peut être induite par des antibiotiques comme la vancomycine à des concentrations sub-inhibitrices.¹⁴

En plus des antibiotiques naturels, donc issus du « parvome » suggéré par Julian Davies, il y a des antibiotiques semi-synthétiques et synthétiques. La plupart des antibiotiques utilisés en clinique sont d'origine naturelle, soit directement, soit par semi-synthèse. Les sulfamides, les quinolones et les oxazolidinones sont exclusivement synthétiques.^{16,17}

Les antibiotiques peuvent être classés en cinq groupes principaux en fonction de leurs sites d'action. Ainsi il y a des antibiotiques qui agissent par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, par altération de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, par inhibition de la

⁸ Thomashow, L. S.; Weller, D. M. **1988**; Vol. 170.

⁹ Thomashow, L. S.; Weller, D. M.; Bonsall, R. F.; Iii, L. S. P. **1990**; Vol. 56.

¹⁰ Neeno-Eckwall, E. C.; Kinkel, L. L.; Schottel, J. L. *J. Microbiol.* **2001**, 47 (4), 332–340.

¹¹ Davies, J. *Soc. Ind. Microbiol.* **2006**.

¹² McPhee, J. B.; Hancock, R. E. W. *J. Pept. Sci.* **2005**, 11 (11), 677–687.

¹³ Yim, G.; De La Cruz, F.; Spiegelman, G. B.; Davies, J. *J. Bacteriol.* **2006**, 188 (22), 7988–7991.

¹⁴ Gerber, M.; Walch, C.; Lö, B.; Tischendorf, K.; Reischl, U.; Ackermann, G. *Journal Med. Microbiol.* **2008**, 776–783.

¹⁵ Hoffman, L. R.; D'argenio, D. A.; Maccoss, M. J.; Zhang, Z.; Jones, R. A.; Miller, S. I. *Nature* **2005**, 436, 1171–1175.

¹⁶ Rajeev, L. *Mater. Methods* **2018**, 8.

¹⁷ Bérdy, J. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2012**, 65, 385–395.

synthèse protéique, par inhibition des voies métaboliques, par inhibition de la synthèse des acides nucléiques.¹⁸

1.2. Classification des antibiotiques

- Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne :

La paroi bactérienne est une structure rigide qui confère à la bactérie sa forme sphérique et sa résistance à la lyse osmotique. En effet, la pression osmotique interne peut varier de 5 à 50 Atm.¹⁹ La paroi bactérienne est constituée principalement de peptidoglycane. Le peptidoglycane est un polymère complexe constitué de deux parties, à savoir une partie glucidique et une partie peptidique. La partie glucidique est formée d'une alternance de molécules de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc). La partie peptidique est constituée de chaînes peptidiques, comportant chacune quatre acides-aminés, et attachées à l'acide N-acétylmuramique. Les deux parties (glucidique et peptidique) sont liées l'une à l'autre par des ponts.²⁰ Une trentaine d'enzymes coopèrent pour la biosynthèse complète de la paroi bactérienne [Figure 1]; ce qui en fait une excellente cible des antibiotiques puisque l'inhibition d'une seule enzyme suffit à bloquer la synthèse.

¹⁸ Reygaert, W. C. *AIMS Microbiol.* **2018**, 4 (3), 482–501.

¹⁹ Mayer, C.; Kluj, R. M.; Mühleck, M.; Walter, A.; Unsleber, S.; Hottmann, I.; Borisova, M. *Int. J. Med. Microbiol.* **2019**, No. April, 151326.

²⁰ Patrick, G. L.; Spencer, J. *An Introduction to Medicinal Chemistry*; Oxford University Press, 2009.

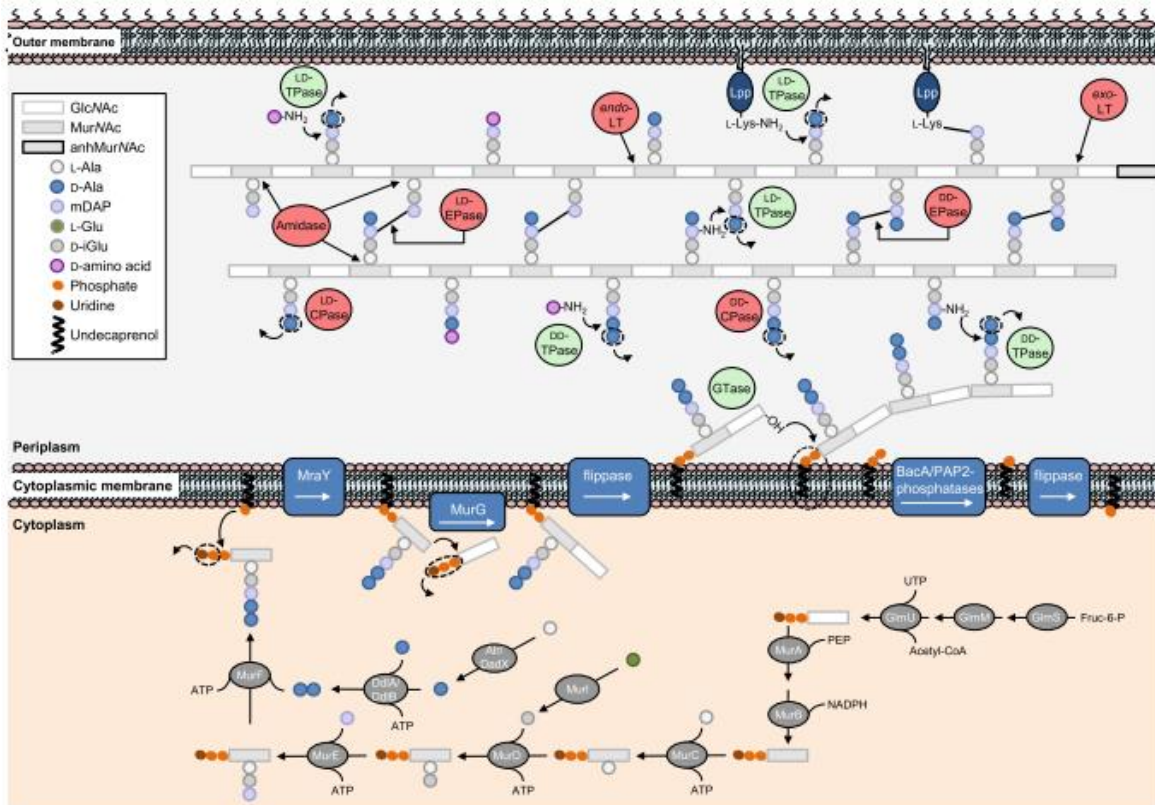


Figure 1 : Etapes cytoplasmiques et extracytoplasmiques de la synthèse du peptidoglycane chez *E. coli*

La synthèse du précurseur de PG commence par la formation des deux précurseurs, UDP-GlcNAc et UDP-MurNAc, dans le cytoplasme. L'UDP-GlcNAc est synthétisé à partir du fructose 6-phosphate par les enzymes GlmS, GlmM et GlmU (la dernière étape nécessite de l'acétyl-coenzyme A et de l'uridine triphosphate). UDP-MurNAc est synthétisé par addition d'énolpyruvate à UDP-GlcNAc (par MurA) et suivie d'une réduction (par MurB). Le fragment pentapeptidique est ajouté à l'UDP-MurNAc par les enzymes MurC, MurD, MurE et MurF dans une séquence de réactions dépendantes de l'ATP qui ajoutent respectivement L-Ala, D-iGlu, mDAP et D-Ala-D-Ala. Les racémases génèrent les énantiomères D-Ala (Alr ou DadX) et D-iGlu (MurI), et les ligases (DdIA et DdIB) synthétisent le dipeptide D-Ala-D-Ala requis. Le phospho-MurNAc-pentapeptide est ensuite transféré sur le transporteur lipidique undécaprénylphosphate par MraY, ce qui entraîne la formation du lipide I et la libération de l'uridine monophosphate (UMP). Le transfert de GlcNAc sur le lipide I par MurG entraîne la formation du lipide II et la libération d'uridine diphosphate (UDP). Dans une étape finale, le lipide II est transloqué vers l'extérieur de la membrane cytoplasmique où il est utilisé comme substrat pour la synthèse PG naissant. Les DD-transpeptidases, DL-transpeptidases, DD-endopeptidases, DL-endopeptidases, les amidases, etc. poursuivent les étapes extracytoplasmiques avec polymérisation et maturation du peptidoglycane (d'après [21])

Parmi les antibiotiques inhibiteurs (ou perturbateurs) de la paroi bactérienne, il y a essentiellement trois groupes chimiques à savoir les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine.

Les β -lactamines, dont la pénicilline est la première molécule découverte, ont en commun le noyau β -lactame [Figure 2], qui présente une analogie structurale avec le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du précurseur du peptidoglycane. Elles se lient de manière covalente à des enzymes

²¹ Lukaszczuk, M.; Pradhan, B.; Remaut, H. 2019; Vol. 92, pp 369–413.

intervenant dans la synthèse du peptidoglycane pariétal, appelés *penicillin binding protein* (PBP) ou protéine de liaison à la pénicilline (PLP).

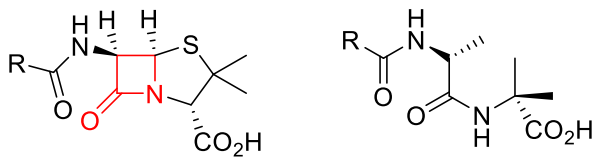


Figure 2 : Comparaison Pénicilline vs acyl-D-Ala-D-Ala terminal du peptidoglycane, noyau β -lactame en rouge

Les glycopeptides, dont la vancomycine est le chef de file, comportent une chaîne heptapeptidique linéaire avec une ou plusieurs molécules osidiques. Ils se lient avec une haute affinité à la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane sur le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala, par des liaisons non-covalentes, masquant ainsi l'accès au site d'action des transpeptidases chargées de former les ponts peptidiques du peptidoglycane.

La fosfomycine, quant à elle, se fixe de manière covalente à une enzyme impliquée dans la formation de l'acide *N*-acétyl-muramique, l'un des constituants essentiels du peptidoglycane.

- Antibiotiques altérant l'intégrité de la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique bactérienne contrôle les échanges avec l'extérieur. Elle contient également les transporteurs responsables de la respiration et de la production d'énergie.²²

Les antibiotiques de la classe des polymixines (la polymixine B) et des lipopeptides (la daptomycine) se fixent sur la membrane bactérienne et la désorganisent, entraînant ainsi une perméabilité anormalement élevée. Cette perméabilité anormalement élevée induit la mort bactérienne. Les antibiotiques peptidiques (la valinomycine et la gramicidine A) altèrent également l'intégrité membranaire de la bactérie en se comportant comme des canaux ionopores au sein de la membrane bactérienne, provoquant un mouvement incontrôlé d'ions à travers la membrane.²⁰ Toutes ces molécules qui altèrent l'intégrité de la membrane cytoplasmique sont majoritairement constituées d'acides aminés.

- Antibiotiques inhibant la synthèse protéique

En considérant la machinerie de synthèse protéique des bactéries (procaryotes) et des cellules eucaryotes, une différence fondamentale assure la sélectivité des antibiotiques. En effet le

²² Nauciel, C.; Vildé, J.-L. Bactériologie Médicale; Masson, 2005.

ribosome bactérien est une particule de 70S (S : Unité Svedberg, unité de mesure du taux de centrifugation) constituée d'une petite sous-unité de 30S et d'une grande sous-unité de 50S tandis que le ribosome de la cellule eucaryote est une particule de 80S constituée d'une petite sous-unité de 40S et d'une grande sous-unité de 60S.

Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique sont essentiellement les aminosides, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides, les streptogramines, les phénicolés, l'acide fusidique et les oxazolidinones qui inhibent, à différentes étapes, la synthèse protéique chez les bactéries.

Les aminosides, qui sont des sucres aminés, se fixent sur la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries, empêchant ainsi la progression de l'ARN messager à travers le ribosome pendant la traduction. Ils sont d'origine naturelle ou semi-synthétique.^{20,23} La première molécule de la famille, la streptomycine [Figure 3] a été isolée de *Streptomyces griseus* en 1944 par Selman Walsman.²³

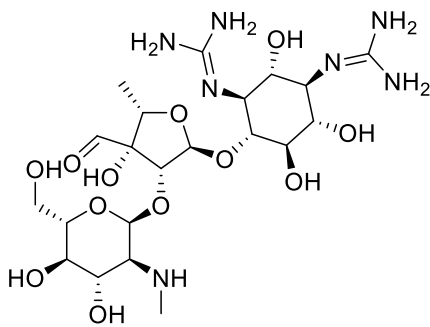


Figure 3: Streptomycine

Les tétracyclines [Figure 4] ont en commun un tétracycle, la naphtacène carboxamide. Ils sont bactériostatiques. Ils se fixent sur la sous-unité 30S des ribosomes et empêchent la fixation du complexe acide-aminé-ARN_t au complexe ARN messager-ribosome.²³

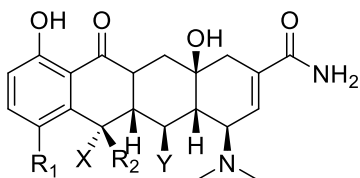


Figure 4 : Noyau de base des tétracyclines

²³ Vaubourdolle, M.; Porquet, D. Infectiologie / collection dirigée par Michel Vaubourdolle. Internat Pharmacie, 2013; Vol. tome 33.

Les macrolides, contrairement aux deux précédents groupes, se fixent sur la sous-unité 50S des ribosomes et inhibent ainsi le peptidyl-transférase. Ils sont bactériostatiques mais peuvent être bactéricides en fonction de leur concentration dans la bactérie.²³

Les oxazolidinones constituent une classe récente d'antibiotiques, dont la première molécule, le linézolide, a été commercialisée en 2000 aux Etats-Unis [Figure 5]. Le linézolide se fixe également sur la sous-unité 50S du ribosome et empêche la formation du complexe 70S de la traduction.²⁴

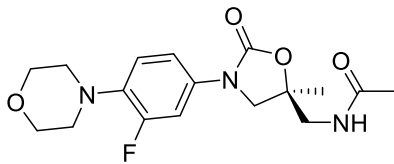


Figure 5 : Linézolide

- Antibiotiques inhibant le métabolisme des folates

L'acide folique ou vitamine B9 est nécessaire à la synthèse des bases nucléiques utilisées pour la synthèse ou la réparation de l'ADN. Incapables d'absorber l'acide folique, les bactéries la synthétisent [Figure 6]. Les enzymes impliquées dans la synthèse de cet acide folique constituent des cibles d'antibiotiques, notamment les sulfamides et la trimétoprime, les inhibent ; entraînant ainsi la stase bactérienne.

²⁴ Bourgeois-Nicolaos, N.; Doucet-Populaire, F. Oxazolidinones. Elsevier Masson **2010**, 13, 1–13.

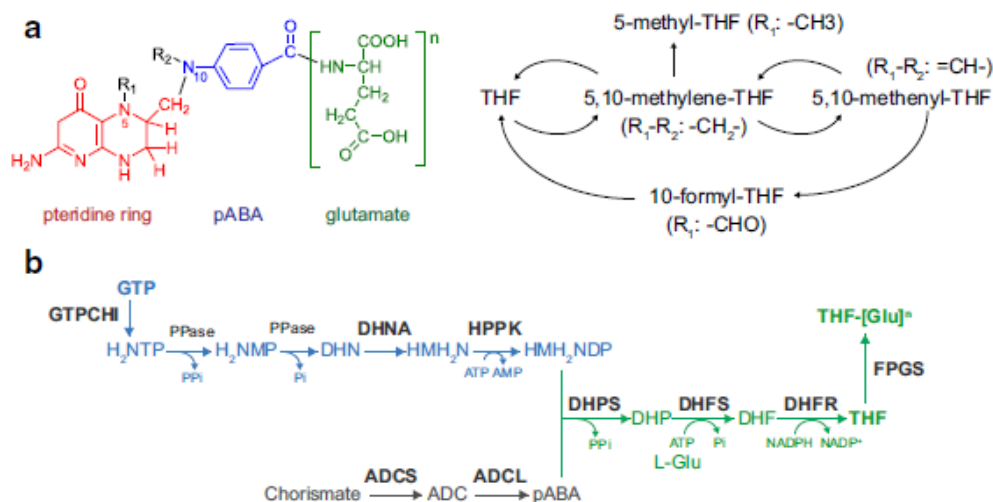


Figure 6 : Structure et Voie de biosynthèse des folates. a. Structure d'une molécule de folate : un noyau ptéridine (rouge) lié à un acide para-aminobenzoïque (pABA en bleue) sur lequel s'articule une chaîne de glutamate dont le nombre de résidus est variable (vert). Les groupes R_1 et R_2 caractérisent les différents vitamères pouvant être interconvertis b. Voies de biosynthèse des folates Métabolites : H_2NTP , 7,8-dihydronéoptérine triphosphate ; H_2NMP , 7,8-dihydronéoptérine monophosphate ; DHN , 7,8-dihydronéoptérine ; HMH_2N , 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine ; HMH_2NDP , 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydronéoptérine diphosphate ; ADC , 4-amino-4-déoxychorismate ; DHP , 7,8-dihydroptéroate ; DHF , 7,8-dihydrofolate ; THF , tétrahydrofolate. Enzymes : $GTPCHI$, GTP cyclohydrolase I ; $PPase$, phosphatase ; $DHNA$, dihydronéoptérine aldolase ; $HPPK$, 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxyméthyl-dihydroptérine pirophosphokinase ; $ADCS$, aminodéoxychorismate synthase ; $ADCL$, 4-amino-4-déoxychorismate lyase ; $DHPS$, dihydroptéroate synthase ; $DHFS$, dihydrofolate synthase ; $DHFR$, dihydrofolate réductase ; $FPGS$, folylpolyglutamate synthase (d'après [25])

Les sulfamides ont en commun le para-amino-benzène-sulfamide, analogue structural de l'acide para-amino-benzoïque (pABA) qui est le substrat naturel de la dihydroptéroate synthétase ou synthase [Figure 7].^{20,23} Les sulfamides inhibent l'enzyme dihydroptéroate synthétase et bloquent ainsi la synthèse du tétrahydrofolate qui est un cofacteur d'enzyme impliqué dans la synthèse de l'ADN.²⁰ Le tétrahydrofolate est également très important pour le métabolisme des cellules eucaryotes ; ce qui explique les nombreux effets secondaires dont sont responsables les sulfamides.

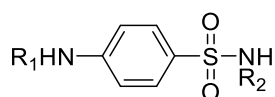


Figure 7 : structure de base des sulfamides

²⁵ Revuelta, J. L.; Serrano-Amatriain, C.; Ledesma-Amaro, R.; Jiménez, A. Springer Verlag October 1, 2018, pp 8613–8620.

La triméthoprime [Figure 8], quant à elle, inhibe la dihydrofolate réductase, l'enzyme responsable de la conversion du dihydrofolate en tétrahydrofolate. Elle est, le plus souvent, utilisée en association avec un sulfamide pour un effet synergique.^{20,22}

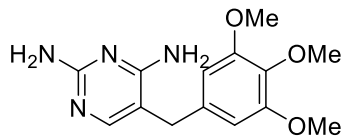


Figure 8 : Trimethoprim

- Antibiotiques inhibant les acides nucléiques

Les quinolones sont actuellement considérées comme la seule classe d'antibiotiques agissant directement sur la synthèse de l'ADN bactérien. Du point de vue structural, le squelette commun aux quinolones est l'acide quinoline-3-carboxylique [Figure 9]. La première molécule de cette classe est un intermédiaire de synthèse de la chloroquine, l'acide nalidixique [Figure 10], qui possède des propriétés antibactériennes. Les quinolones se fixent sur des domaines spécifiques de la topoisomérase II (ADN gyrase) et de la topoisomérase IV, stabilisent le complexe ADN-Topoisomérases et bloquent ainsi la réplication et la transcription de l'ADN.²⁶

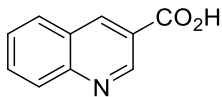


Figure 9 : acide quinoline-3-carboxylique

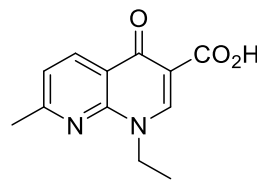


Figure 10 acide nalidixique

1.3. Domaines d'utilisation des antibiotiques par l'homme

L'observation des premières bactéries par Leeuwenhoek (1632-1723) au microscope, les techniques de cultures, d'identification de microorganismes pathogènes de Robert Koch (1843-1910) et plus particulièrement la théorie des germes de Louis Pasteur (1822-1895), ont permis de mettre le doigt sur l'origine véritable des maladies infectieuses.²⁷⁻²⁹

²⁶ Hooper, D. C.; Jacoby, G. A. Cold Spring Harb. Lab. Press **2016**.

²⁷ Bardell, D. **1982**; Vol. 47.

²⁸ Berche, P. Clinical Microbiology and Infection. Blackwell Publishing Ltd 2012, pp 1–6.

²⁹ Schwartz, M.; Perrot, A. **2015**.

L'une des conséquences directes de la théorie des germes a été l'identification des bactéries responsables de plusieurs maladies infectieuses. Pour guérir ces maladies, les scientifiques ont commencé à chercher des molécules douées de pouvoirs thérapeutiques. Ainsi la découverte des sulfanilamides antibiotiques et de la pénicilline et leur utilisation chez l'Homme au cours de la première moitié du 20ème siècle ont fourni les preuves de l'efficacité des antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses. Les antibiotiques constituent dans la médecine moderne une classe médicamenteuse incontournable.

L'utilisation en clinique humaine n'est pas la seule utilisation des antibiotiques. En effet, aux Etats Unis par exemple, en 2013, plus de 70% des antibiotiques sont utilisés dans l'agriculture et l'élevage intensive comme facteurs de croissance et comme traitement prophylactique. Ils sont aussi utilisés comme pesticides sur certains arbres fruitiers.³⁰ Lorsque les antibiotiques sont utilisés comme agents prophylactiques, c'est surtout pour prévenir les infections liées aux mauvaises pratiques de l'élevage industriel.^{31,32}

L'utilisation massive et inadaptée des antibiotiques par l'Homme constitue un véritable problème de santé publique et écologique qui se traduit par la permanence d'une pression de sélection avec l'émergence des résistances et leur dissémination au-delà de toute frontière géographique.³³

2. Antibiorésistance

2.1. Historique

Les microbes sont apparus sur terre il y a environ 3,8 milliards d'années et l'Homme il y a quelques millions d'années. La vitesse de formation d'une nouvelle génération de bactéries est de 30 minutes en moyenne en conditions optimales tandis que chez l'homme, elle est de 30 ans en moyenne. L'Homme est, par ailleurs constitué d'autant de cellules

³⁰ Lee Ventola, C. **2015**; Vol. 40.

³¹ O'NEILL, J. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE CHAIRED BY JIM O'NEILL; **2016**.

³² Caniça, M.; Manageiro, V.; Abriouel, H.; Moran-Gilad, J.; Franz, C. M. A. P. Trends Food Sci. Technol. **2019**, 84, 41–44.

³³ Roger, F.; Ducrot, C. perspective **2017**, 4, 1–4.

humaines que de bactéries.³⁴ Il est évident que les bactéries s'adapteront toujours à leur environnement et coexisteront avec l'homme.³⁵

Avec la découverte des antibiotiques, de nombreux succès ont été engrangés dans la lutte contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Dès lors, la survie des bactéries dépendait alors de leur capacité à résister aux traitements antibiotiques utilisés. Ainsi, depuis l'introduction des antibiotiques en clinique, les scientifiques ont constaté la capacité qu'ont certaines bactéries à résister à certains antibiotiques; il s'agit de l'antibiorésistance [Figure 11].¹⁸

³⁴ Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. PLoS Biol. **2016**, 14 (8), e1002533.

³⁵ Spellberg, B.; Gilbert, D. N. The Future of Antibiotics and Resistance: A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett. **2014**.

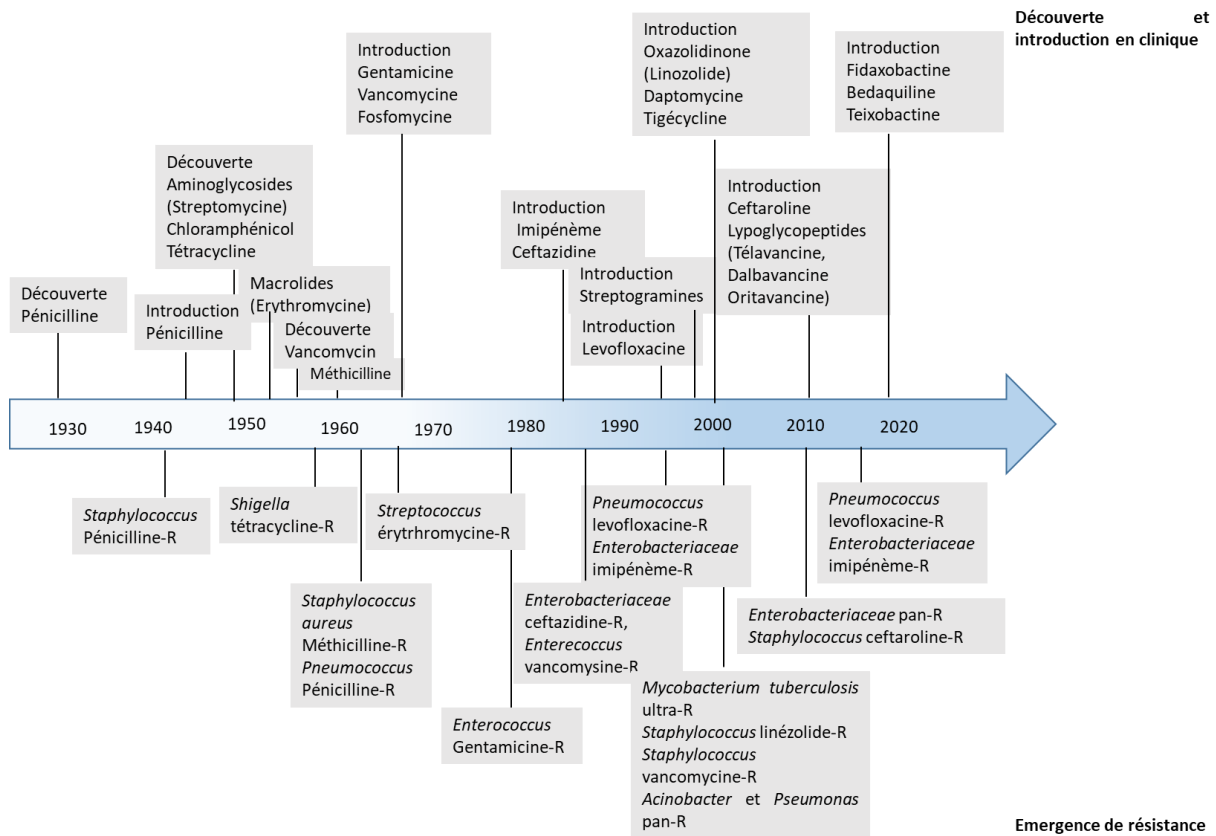


Figure 11 : Antibiotiques et chronologie des résistances (d'après [36-39])

Le problème de l'antibiorésistance est un phénomène complexe. En cas d'infection par une bactérie multirésistante, les options thérapeutiques sont souvent restreintes, voire inexistantes dans certains cas. De plus, tout acte chirurgical ou toute chimiothérapie expose la vie du patient. Aussi, la mortalité des patients les plus fragiles, comme les immunodéprimés augmente-t-elle.³¹ Ainsi, la médecine moderne est fortement dépendante des antibiotiques. L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques constitue donc un danger d'autant plus inquiétant que ces résistances concernent toutes les classes d'antibiotiques.

³⁶ Centers for Disease Control and Prevention, O. of I. D. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States; **2013**.

³⁷ Das, B.; Chaudhuri, S.; Srivastava, R.; Nair, G. B. *BMJ* **2017**.

³⁸ Mercurio, N. J.; Davis, S. L.; Zervos, M. J.; Herc, E. S. *Expert Opin. Pharmacother.* 2018, 19 (9), 979-992.

³⁹ Hutchings, M.; Truman, A.; Wilkinson, B. **2019**

Quelle pourrait donc être l'origine des résistances ? Sont-elles seulement la conséquence d'une pression de sélection liée à l'utilisation massive des antibiotiques ou sont-elles codifiées dans l'ADN d'organismes existant dans la nature ?

Le concept de résistome a été introduit par J.A Perry et *al.* en 2014. Il correspond à l'ensemble des gènes de résistances connues ou non, existant sur terre. En se référant à ce concept, il existe deux phénotypes, à savoir le phénotype résistant et le phénotype sensible [Figure 12]. Les organismes à phénotype résistant possèdent des gènes de résistances intrinsèques et/ou acquis, alors que ceux à phénotype sensible possèdent des gènes de proto-résistance et/ou des gènes de résistance silencieuse.⁴⁰ Les microorganismes producteurs d'antibiotiques, pour être viables, doivent posséder des mécanismes d'auto-protection. Ainsi, la production d'antibiotiques par ces derniers doit-elle évoluer parallèlement à leur résistance en vue d'une auto-protection.

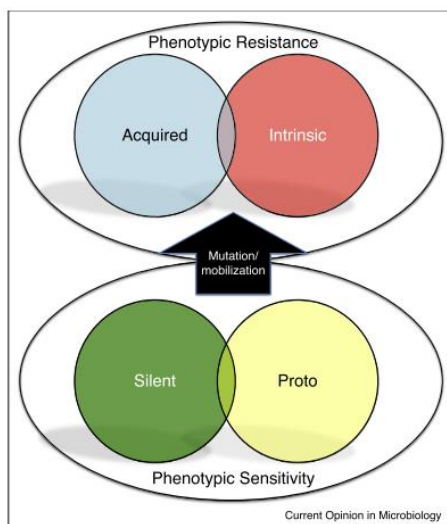


Figure 12 : Phénotypes des résistances (d'après [40])

Des analyses d'ADN anciens, provenant du pergélisol de la Béringie et datant de 30 mille ans, révèlent la présence de gènes de résistance aux β -lactamines, aux tétracyclines et aux glycopeptides (exemple *vanHAX*). Par exemple, pour l'opéron *vanHAX* identifié de cet ADN ancien, il y a non seulement regroupement phylogénétique avec l'équivalent moderne

⁴⁰ Perry, J. A.; Westman, E. L.; Wright, G. D. Elsevier Ltd October 1, 2014, pp 45–50.

retrouvé en clinique, mais également la protéine D-ala-ligase (VanA) ressemble à ses homologues modernes même jusqu'à la structure tridimensionnelle.⁴¹

Cette dernière découverte consolide le concept du « résistome » qui sous-tend l'existence de gènes de résistance à l'état naturel au sein des organismes vivants. Toutefois la majorité du monde scientifique retient que l'émergence des résistances est le résultat d'une pression de sélection induite par l'utilisation abusive des antibiotiques par l'Homme, que ce soit en clinique humaine, dans l'agriculture ou dans l'élevage intensif des animaux.^{16,41}

- Phénotype résistant

La résistance est dite naturelle, lorsque le gène de résistance fait partie du patrimoine génétique de l'espèce, présent donc sur le chromosome de cette dernière. La transmission d'un tel gène est verticale.^{18,40}

La résistance est dite acquise lorsque le gène de résistance ne fait pas partie du patrimoine génétique initial de l'espèce. Il a donc été acquis par toutes les voies d'un transfert horizontal de gènes (THG): transformation, transposition ou conjugaison. Les plasmides et les transposons sont des éléments génétiques mobiles impliqués dans les transferts de gènes. La résistance acquise peut également intervenir suite à une mutation apparue dans le chromosome propre de la bactérie.^{18,40}

- Phénotype sensible :

Dans la « proto-résistance », l'expression du gène de la résistance est peu ou non existante. Le gène proto-résistant a le potentiel de devenir résistant suite à une mutation. Le résultat moléculaire de la mutation peut être par exemple l'élargissement des substrats d'une enzyme déjà existante dans la bactérie tout en gardant sa spécificité de fonction.⁴⁰

Dans la « résistance silencieuse », le gène de résistance existe sur le chromosome mais ne s'exprime que suite à une mutation dans un autre gène qui entraîne l'expression ou la surexpression du gène de résistance silencieuse. La résistance peut être activée par un stress environnemental.⁴⁰ Par exemple, la *Salmonella enterica* sauvage est sensible à la streptomycine et à la spectinomycine lorsqu'elle est cultivée dans un bouillon enrichi, tandis qu'elle devient résistante aux mêmes antibiotiques lorsqu'elle est cultivée dans un milieu de

⁴¹ D'costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; et al. Nature **2011**, 477.

culture minimal. Cela s'explique par l'activation du gène de résistance *aadA* par un régulateur guanosine penta/tétraphosphate.⁴²

2.2. Différents mécanismes de résistances

Du point de vue moléculaire, la résistance se manifeste principalement par quatre mécanismes, à savoir l'imperméabilité des structures externes de la bactérie, la modification de la cible des antibiotiques, l'inactivation enzymatique des antibiotiques, l'expulsion des antibiotiques par des pompes d'efflux actif.¹⁸

- Imperméabilité des structures externes de la bactérie

Les bactéries peuvent être caractérisées par la coloration de Gram, qui consiste en une coloration au violet de gentiane, suivie d'une décoloration à l'alcool, puis une recoloration à la fuchsine. Cette coloration de Gram permet de distinguer deux types de bactéries, les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif [Figure 13]. Les bactéries dites à Gram positif restent violettes ; cette coloration s'expliquant par une paroi bactérienne épaisse qui ne se décolore pas à l'alcool. Les bactéries à gram négatif se décolorent, puis se recolorent en rose car leur paroi est mince. Ces bactéries à Gram négatif comportent en outre une membrane externe composée de lipopolysaccharides (LPS), de phospholipides (PL) et de protéines.^{22,23} En fonction des proportions de ces différents constituants, en particulier le LPS de la membrane externe, les bactéries peuvent être résistantes à certains antibiotiques.⁴³ Certains antibiotiques empruntent des porines pour atteindre leurs cibles. Ainsi la disparition ou la modification de ces porines entraîne l'imperméabilité aux antibiotiques. C'est le cas par exemple de *Serratia marcescens* qui présente une résistance aux β -lactamines et aux aminosides par disparition de porines.⁴⁴

⁴² Koskiniemi, S.; Pr anting, M.; Gullberg, E.; N asvall, J.; Andersson, D. I. Mol. Microbiol. **2011**, 80 (6), 1464–1478.

⁴³ Kumar, A.; Schweizer, H. P. Advanced Drug Delivery Reviews. July 29, **2005**, pp 1486–1513.

⁴⁴ Goldstein, F. W.; Gutmann, L.; Williamson, R.; Collatz, E.; Acar, J. F. Ann. Microbiol. (Paris). **1983**. 134A (3), 329–337.

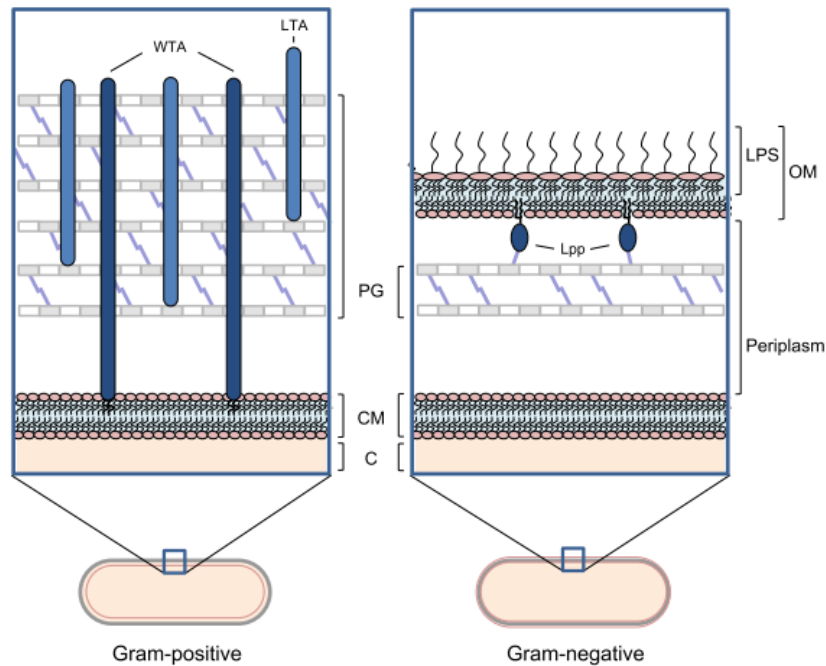


Figure 13 : Comparaison bactéries à Gram+ / bactéries à Gram-. C, cytoplasm; CM, cytoplasmic membrane; PG, peptidoglycan; OM, outer membrane; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; WTA, wall teichoic acid; Lpp, Braun's lipoprotein (d'après [21])

- Modification de la cible des antibiotiques

C'est la fixation de la molécule d'antibiotique sur sa cible qui induit l'effet thérapeutique recherché. Une modification de la cible entraîne une perte d'affinité de cette molécule, donc une résistance de la bactérie vis-à-vis de celle-ci. Plusieurs classes médicamenteuses d'antibiotiques sont concernées par ce mécanisme. Il s'agit essentiellement des β -lactamines, des glycopeptides, des aminosides, des sulfamides, etc.¹⁸ *Staphylococcus aureus* est capable d'acquérir le gène *mecA*, qui code pour une PLB modifiée dite PLB2a sans affinité pour les β -lactamines, ce qui entraîne une résistance aux β -lactamines.⁴⁵

La résistance aux sulfamides se manifeste par une modification de la dihydroptéroate synthétase. Cette enzyme conserve son affinité pour son substrat naturel mais perd son affinité pour les sulfamides suite à une modification de quelques acides aminés du site actif.⁴⁶

⁴⁵ Beceiro, A.; Tomás, M.; Bou, G. **2013**.

⁴⁶ Huovinen, P.; Sundström, L.; Sundström, S.; Gö, G.; Swedberg. **1995**; Vol. 39.

- Inactivation enzymatique des antibiotiques

Des enzymes bactériennes sont capables d'inactiver des antibiotiques soit en les dégradant soit en leur transférant un groupement spécifique. Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent le cycle β -lactam des β -lactamines. Il en résulte des molécules hydrolysées, incapables d'inhiber les PLBs. C'est la principale cause de résistances aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatifs.⁴⁷ Les tétracyclines constituent une autre classe d'antibiotiques qui peuvent être désactivés par dégradation due à une enzyme codée par le gène *tetX*.⁴⁸ Les aminosides peuvent être inactivés par des acétyltransférases, des phosphotransférases et des nucléotidyltransférases.⁴⁸

- Expulsion des antibiotiques par pompes efflux actif

Les pompes d'efflux actif sont des pompes qui transportent les antibiotiques pour les expulser du cytoplasme de la bactérie. Elles sont en grande partie impliquées dans la résistance intrinsèque des bactéries à Gram négatif. La plupart des pompes d'efflux, lorsqu'elles sont surexprimées sont capables de transporter plusieurs familles de molécules, et sont ainsi responsables de multi-résistances.⁴⁸

La résistance est une notion à ne pas confondre avec la persistance qui indique le fait que des bactéries soient résistantes aux antibiotiques parce qu'elles sont en dormance. Une fois la dormance levée, les bactéries restent sensibles aux antibiotiques.

2.3. Antibiorésistance : un problème de santé publique mondial

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel. Cependant, l'utilisation abusive et inappropriée des antibiotiques par l'homme au cours des 80 dernières années a été à l'origine d'une pression de sélection qui favorise l'émergence accélérée de résistances.

Les résistances aux antibiotiques constituent, de nos jours, un sérieux problème de santé publique mondial. Ce problème ne peut être résolu totalement ni individuellement ni par de simples méthodes locales. Les méthodes utilisées doivent impliquer les gouvernements et les

⁴⁷ Bush, K.; Jacoby, G. A. **2010**, 54 (3), 969–976.

⁴⁸ Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015, 13 (1), 42–51.

organismes internationaux. L'impact de l'antibiorésistance sur l'homme et son environnement est complexe avec des répercussions sur la santé, l'économie et l'écologie.

Depuis plusieurs années, l'OMS a donc adopté plusieurs mesures dans le but de contrôler l'expansion des résistances. En 2001, elle a publié sa stratégie globale pour combattre la résistance aux antibiotiques,⁴⁹ puis en 2015, son Plan d'action mondial a été adopté. Dans le cadre de sa politique « un monde, une santé » l'OMS demande à chaque Etat membre d'établir un plan national qui s'aligne sur le plan global.⁵⁰ En outre, l'OMS et d'autres organismes internationaux comme l'OIE et la FAO ont décidé depuis plusieurs années de conjuguer leurs efforts pour la lutte contre l'antibiorésistance.³¹

L'antibiorésistance est responsable de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité des patients atteints d'infections à bactéries résistantes.^{36,51} En effet, le patient atteint d'infections à bactéries résistantes voit son séjour d'hospitalisation s'allonger; ce qui augmente le risque de contracter d'autres infections liées aux soins. Dans un tel contexte, les options thérapeutiques se restreignent et le risque d'une issue fatale de l'hospitalisation augmente.

En 2014, environ 700 mille décès ont été enregistrés dans le monde à cause de l'antibiorésistance. Ce chiffre passera à 10 millions en 2050 si des actions concrètes mondiales ne sont pas menées [Figure 14].³¹ L'augmentation de la morbidité et de la mortalité liées à l'antibiorésistance engendre d'énormes coûts pour les patients et leur famille ainsi que pour les autorités sanitaires. Par exemple, la prise en charge de l'antibiorésistance coûte environ 1,5 million d'euro par an à l'Union Européenne.⁵² Aux USA, le traitement des infections à bactéries résistantes coûte 6 mille à 30 mille dollars de plus que le traitement des infections à bactéries sensibles.⁵³

L'antibiorésistance constitue une menace pour la diversité microbienne. Les bactéries résistantes partagent la planète avec l'homme et les animaux et se retrouvent dans la chaîne alimentaire, dans les sols, dans les eaux, etc. L'un des dangers probables est l'appauvrissement

⁴⁹ WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance; **2001**.

⁵⁰ OMS. PLAN D' ACTION MONDIAL POUR COMBATTRE LA RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS; **2016**.

⁵¹ WHO. ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance; **2014**.

⁵² Anderson, M.; Clift, C.; Schulze, K.; Sagan, A. **2019**.

⁵³ Maragakis, L. L.; Perencevich, E. N.; Cosgrove, S. E. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2008, 6 (5), 751–763.

de la flore bactérienne de l'homme et des réserves de micro-organismes sur terre au profit des bactéries résistantes. En proposant la diminution de l'utilisation des antibiotiques dans l'agriculture et l'élevage dans sa vision « un monde, une santé », l'OMS prend bien en compte ce problème écologique.

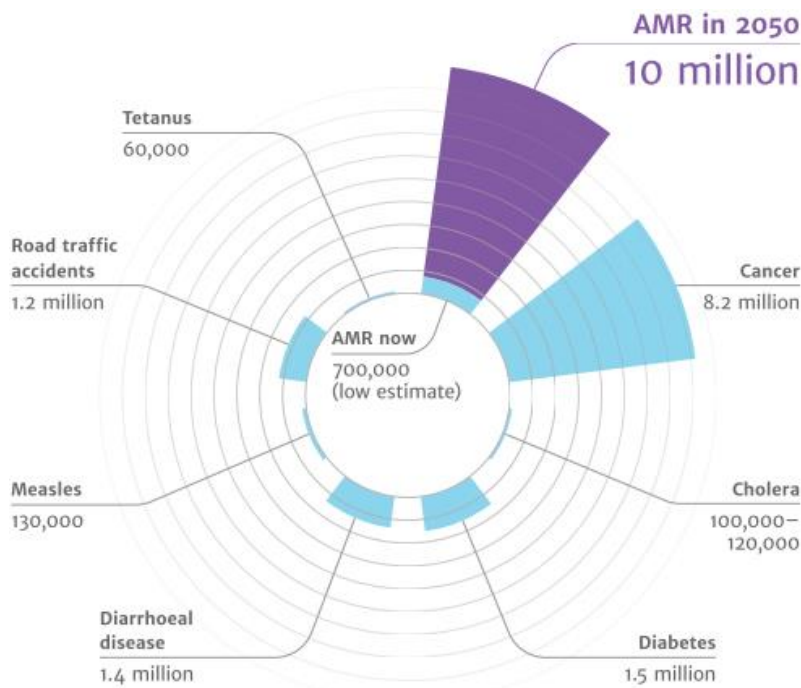


Figure 14 : Mortalité induite par l'antibiorésistance [d'après ³¹]

3. Alternatives à l'antibiorésistance

Au regard de la rapidité de l'émergence de l'antibiorésistance après seulement 80 années d'utilisation des antibiotiques, il est urgent de trouver des alternatives. Cela doit passer par une utilisation adéquate des antibiotiques afin de réduire la pression de sélection de souches résistantes. La préservation des antibiotiques existants, le développement de nouveaux antibiotiques et de nouveaux vaccins contre les bactéries multirésistantes et hautement résistantes constituent également d'autres voies pour limiter l'antibiorésistance.

3.1. Utilisation adéquate des antibiotiques

Les antibiotiques ont été massivement utilisés comme facteurs de croissance ou agents prophylactiques sur des animaux sains destinés à la consommation humaine. Plusieurs études ont montré que l'utilisation abusive des antibiotiques dans l'agriculture est directement responsable de l'émergence de bactéries résistantes, dangereuses pour l'homme, par le biais

de la chaîne alimentaire. L'OMS a donc mis en place, à travers son plan d'action global de lutte contre l'antibiorésistance, des directives pour réduire l'utilisation abusive des antibiotiques dans l'élevage.⁵⁴ Ainsi, en Europe par exemple, l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance est interdite dans tous les pays de l'UE depuis 2006. Les actions globales des institutions internationales et nationales ont produit des effets quantifiables dans certains pays. En France par exemple, entre 2007 et 2017, l'exposition globale des animaux aux antibiotiques a diminué de 48 %.⁵⁵

Les structures nationales en charge de la santé humaine, animale et de l'environnement devraient, à l'image de l'OMS, la FAO et l'OIE coordonner leurs efforts pour une utilisation adéquate des antibiotiques afin de limiter l'émergence des résistances. Il est aussi indispensable de sensibiliser les vétérinaires, les agriculteurs afin de changer les comportements. En effet, il existe de meilleures pratiques d'élevage permettant d'augmenter la productivité sans l'utilisation abusive d'antibiotiques comme traitement prophylactique systématique. Par exemple, au Danemark, la suppression des antibiotiques utilisés comme agents de croissance dans l'élevage porcine, n'a pas entraîné de baisse de rendement mais au contraire une augmentation d'environ 15 fois a été observée entre 1998 et 2008.⁵⁶ Cela suggère que la suppression des antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance dans l'élevage n'influe pas négativement le rendement de production à long terme.

Une centralisation des données sur l'utilisation des antibiotiques chez l'homme et chez les animaux ainsi que sur les cas de résistances pourrait constituer un outil efficace d'identification des souches résistantes dangereuses et de développement de solutions à long terme. Le Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (*Global Antimicrobial Resistance Surveillance System GLASS*) fait partie des objectifs du plan global de l'OMS pour combattre la résistance aux antibiotiques. Ce plan a été lancé pour harmoniser la façon de collecter, d'analyser et de communiquer les données sur la résistance aux antibiotiques. En Europe, la France, à travers Santé Publique France, contribue à la surveillance de la résistance aux antibiotiques en santé humaine au niveau européen et

⁵⁴ WHO GUIDELINES ON USE OF MEDICALLY IMPORTANT ANTIMICROBIALS IN FOOD-PRODUCING ANIMALS; **2017**.

⁵⁵ Monnoyer-smith, P. L. **2018**.

⁵⁶ Aarestrup, F. M.; Vibeke, F.; Jacobsen, E.; Wegener, H. C. *Am. J. Vet. Res.* **2010**, 71 (7), 726–733.

participe à l'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network ([EARS-net](#)) coordonné par le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies ([ECDC](#)).

Outre l'utilisation abusive des antibiotiques dans l'élevage et l'agriculture, il a été montré que plus de 60% des prescriptions d'antibiotiques en médecine moderne aux USA sont inadaptées, donc inutiles.³¹ Le problème des prescriptions inadaptées d'antibiotiques concerne malheureusement tous les professionnels de santé prescripteurs. En effet à l'heure actuelle, à l'exception du test de détection rapide qui permet de discriminer les infections virales des infections bactériennes, la prescription d'antibiotiques est faite selon la volonté du prescripteur qui dispose d'une liste d'antibiotiques de première intention (dite antibiothérapie probabiliste), de seconde intention (ou antibiothérapie adaptée au germe) puis de dernier recours.

Une antibiothérapie probabiliste peut donc déboucher sur une non-guérison du patient si la bactérie est résistante à l'antibiotique prescrit. Une telle situation augmente le coût de traitement, retarde le traitement du patient, fragilise sa santé et l'expose à une issue fatale.

Dans le cas de l'antibiothérapie adaptée, les examens diagnostiques ne sont pas rapides et, le plus souvent, ne sont pas réalisés par le prescripteur mais par un laboratoire d'analyses biologiques. Des méthodes de diagnostics rapides et simples d'utilisation et directement utilisables par le prescripteur permettraient de s'affranchir des prescriptions inadaptées, et de réduire les délais d'administration des traitements. Cela permettrait également de réduire considérablement le risque d'émergence de bactéries résistantes.⁵² A ce sujet, Dr Margaret Chan, directrice générale de l'OMS (2007 à 2017) disait « ... les antibiotiques sont rarement prescrits sur la base d'un diagnostic définitif. Les tests de diagnostic peuvent indiquer si un antibiotique est réellement nécessaire ou non. Disposer de diagnostics rapides, peu coûteux et facilement disponibles est un élément essentiel de la solution à ce problème urgent. ». L'urgence ici, étant bien-évidemment l'antibiorésistance.

Le prescripteur fait appel à l'antibiothérapie de dernier recours si le patient n'a été guéri ni avec l'antibiothérapie probabiliste, ni avec l'antibiothérapie de second recours. Cette pratique hospitalière potentialise la pression de sélection.

L'utilisation adéquate des antibiotiques passe aussi par une sensibilisation des patients qui devront respecter scrupuleusement les dosages et la durée des traitements et éviter

l'automédication et la prise systématique d'antibiotiques en cas d'infections. En effet, en 2018, environ 57 % des Européens ignoraient que les antibiotiques ne sont pas efficaces contre les virus.⁵² Les praticiens et les patients doivent être informés sur le fait que, plus le traitement sera court, mieux ce sera du point de vue sanitaire et écologique.³⁵

3.2. Préservation de l'efficacité des antibiotiques existants

La médecine a fait des progrès spectaculaires (greffes d'organes, chimiothérapie, etc.) grâce aux antibioprophyllactiques. Cependant, l'utilisation systématique et abusive des antibiotiques peut augmenter la pression de sélection des souches résistantes et éroder leur efficacité. Ainsi, une sensibilisation des populations sur la vaccination pourrait contribuer à prévenir d'éventuelles infections et ainsi diminuer l'utilisation des antibiotiques. Une vaccination est 10 fois moins coûteuse que le traitement d'une infection.⁵⁷ Elle pourrait concerner également les animaux, évitant ainsi l'utilisation inutile d'antibioprophyllacties sur des animaux sains.

Aussi, le renforcement de l'hygiène dans les hôpitaux, particulièrement une bonne hygiène des mains, évite-t-il le manuportage de souches résistantes par le personnel médical. Les solutions hydroalcooliques ont montré leur efficacité dans ce sens dans plusieurs pays, par une diminution remarquable des infections liées aux soins. Le personnel hospitalier doit donc être régulièrement formé sur l'hygiène des mains.

Dans les pays en développement, la préservation des antibiotiques passe non seulement par la vaccination et l'hygiène des mains dans les hôpitaux, mais aussi et surtout par l'accessibilité à l'eau potable et à des infrastructures d'assainissement.

3.3. Recherche et développement de nouveaux antibiotiques et de nouveaux vaccins

Depuis les années 1980, le nombre de nouveaux antibiotiques mis sur le marché a progressivement diminué, et est même devenu nul de nos jours. Les options thérapeutiques deviennent alors de plus en plus étroites lors d'une infection à bactérie multirésistante.^{30,31,58} La recherche et le développement de nouveaux antibiotiques viendraient soulager les

⁵⁷ Zhou, F.; Shefer, A.; Wenger, J.; Messonnier, M.; Yan Wang, L.; Lopez, A.; Moore, M.; Murphy, T. V.; Cortese, M.; Rodewald, L. **2014**; Vol. 133.

praticiens hospitaliers. Ainsi, dans la perspective de développement de nouveaux molécules, l'OMS a par exemple publié en février 2017 sa première liste d'agents pathogènes prioritaires résistants aux antibiotiques [Tableau 1]. Malheureusement, cette publication n'a pas suscité un grand intérêt des firmes pharmaceutiques puisqu'en 2014, seulement 4 firmes pharmaceutiques avaient des programmes de recherche et de développement de nouveaux antibiotiques contre 18 en 1990.

Tableau 1: Agents pathogènes prioritaires résistants aux antibiotiques de l'OMS

N°	BACTERIES	PRIORITE
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> , résistance aux carbapénèmes	critique
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , résistance aux carbapénèmes	
3	<i>Enterobacteriaceae</i> , résistance aux carbapénèmes, production de BLSE	
4	<i>Enterococcus faecium</i> , résistance à la vancomycine	élevée
5	<i>Staphylococcus aureus</i> , résistance à la méthicilline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine	
6	<i>Helicobacter pylori</i> , résistance à la clarithromycine	
7	<i>Campylobacter</i> spp., résistance aux fluoroquinolones	
8	<i>Salmonellae</i> , résistance aux fluoroquinolones	
9	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , résistance aux céphalosporines, résistance aux fluoroquinolones	moyenne
10	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , insensible à la pénicilline	
11	<i>Haemophilus influenzae</i> , résistance à l'ampicilline	
12	<i>Shigella</i> spp., résistance aux fluoroquinolones	

Dans la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques, outre l'approche conventionnelle qui consiste à rechercher et développer des molécules bactériostatiques ou bactéricides, il existe des approches nouvelles qui ne cherchent pas forcément à tuer les bactéries ou à ralentir leur croissance. Ces nouvelles approches visent entre autres à inhiber la virulence des bactéries, empêcher l'adhésion des bactéries sur les cellules hôtes, empêcher la formation de biofilm, interrompre la communication bactérienne, modifier le microbiome

de l'hôte. Il existe également l'utilisation des phages (phagothérapie) ou des nanoparticules comme véhicules d'agents antibactériens.^{58,59}

En ce qui concerne l'inhibition des facteurs de virulence, il existe par exemple la Suvratoxumab, un anticorps monoclonal qui se fixe sur l' α -toxine de *Staphylococcus aureus* pour l'inhiber.⁶⁰ Le régulateur PqsR (*MvFR*) est impliqué dans la transcription de plusieurs facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi des travaux de recherche ont permis de mettre au point des inhibiteurs de ce régulateur multiple.⁶¹

De nombreuses études ont montré le rôle crucial que joue le microbiome humain dans la santé. Il est donc nécessaire de trouver des thérapies qui assurent la cohabitation de l'Homme avec les bactéries.³⁵ Toute atteinte à l'abondance et à la diversité du microbiome humain entraîne diverses maladies dont les infections récurrentes à *Clostridium difficile*.^{62,63} La transplantation de microbiome fécal provenant de donneurs sains pour restaurer le microbiome d'individus ayant connu une infection récurrente à *Clostridium difficile* a montré largement son efficacité.⁶⁴

D'autres auteurs proposent l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer pour traiter certaines infections bactériennes.⁶⁵ En effet, ces nanoparticules, autorisées par l'OMS pour une utilisation en santé humaine, possèdent une activité antimicrobienne.

Dans la phagothérapie, les phages (qui sont des virus de bactéries exclusivement) sont utilisés, soit pour éliminer les agents microbiens, soit comme des transporteurs de fragments d'ADN ou d'ARN qui sont capables de moduler l'expression des gènes de la bactérie infectée.^{59,66}

⁵⁸ Monserrat-Martinez, A.; Gambin, Y.; Siernecki, E. **2019**.

⁵⁹ Theuretzbacher, U.; Piddock, L. J. V. *Cell Host Microbe* **2019**, 26 (1), 61–72.

⁶⁰ Yu, X.-Q.; Robbie, G. J.; Wu, Y.; Esser, M. T.; Jensen, K.; Schwartz, H. I.; Bellamy, T.; Hernandez-Illas, M.; Jafri MedImmune LLC, H. S. **2016**.

⁶¹ Maura, D.; Drees, S. L.; Bandyopadhyaya, A.; Kitao, T.; Negri, M.; Starkey, M.; Lesic, B.; Milot, S.; Déziel, E. D.; Zahler, R.; et al. **2017**.

⁶² Keith, J. W.; Pamer, E. G. J. *Exp. Med* **2018**, 216 (1).

⁶³ Darkoh, C.; Plants-Paris, K.; Bishoff, D.; DuPont, H. L. **2019**, 4 (2).

⁶⁴ Cammarota, G.; Ianiro, G.; Tilg, H.; Rajilić-Stojanović, M.; Kump, P.; Satokari, R.; Sokol, H.; Arkkila, P.; Pintus, C.; Hart, A.; et al. *BMJ Publishing Group*, **2017**; Vol. 66, pp 569–580.

⁶⁵ Rodrigues, G. R.; López-Abarrategui, C.; de la Serna Gómez, I.; Dias, S. C.; Otero-González, A. J.; Franco, O. L. *Int. J. Pharm.* **2019**, 555, 356–367.

⁶⁶ Dufour, N.; Debarbieux, L. *Medecine/Sciences. Editions EDK April 1*, **2017**, pp 410–416.

L'avantage de la phagothérapie réside dans le fait que les phages sont des virus spécifiques de bactéries.

Les avancées technologiques, notamment les nouvelles techniques de culture et d'isolement de souches bactériennes, les approches de génomique, de métabolomique, de bioinformatique et de criblage à haut débit, ont permis aux scientifiques d'avoir accès à des réservoirs de microorganismes et à leur potentiel chimique jusque-là inaccessibles.⁶⁷ Ainsi, c'est grâce à un milieu de culture inhabituel proche des sécrétions nasales humaines, que la lugdunine a été identifiée dans des cultures de *Staphylococcus lugdunensis*. Cette molécule a montré des propriétés antibactériennes contre un large éventail de bactéries à Gram positif dont le SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline), le GISA (*Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides) et les ERV (entérocoques résistants à la vancomycine).^{68,69} D'autres molécules telle que la lassomycine, active contre certaines souches résistantes de *Mycobacterium tuberculosis*,⁷⁰ et la teixobactine, active contre des bactéries à Gram positif dont le SARM et les ERV ont été isolées grâce à des techniques de cultures nouvelles⁷¹.

En outre Martin S. et al. ont identifié de petites molécules capables de potentialiser l'action d'antibiotiques, initialement inefficaces contre certaines souches bactériennes.⁷² Cette étude donne l'espoir d'un élargissement du spectre d'antibiotiques initialement actifs uniquement sur les bactéries à Gram positif aux bactéries à Gram négatif, voire à des bactéries à Gram négatif multirésistantes.

La recherche et le développement de nouveaux vaccins contre les bactéries multirésistantes permettraient de s'affranchir de l'utilisation systématique d'antibiotiques, ce qui permet d'en

⁶⁷ Niu, G.; Li, W. Trends Biochem. Sci. **2019**.

⁶⁸ Krismer, B.; Liebeke, M.; Janek, D.; Nega, M.; Rautenberg, M.; Hornig, G.; Unger, C.; Weidenmaier, C.; Lalk, M.; Peschel, A. PLoS Pathog. **2014**, *10* (1).

⁶⁹ Zipperer, A.; Konnerth, M. C.; Laux, C.; Berscheid, A.; Janek, D.; Weidenmaier, C.; Burian, M.; Schilling, N. A.; Slavetinsky, C.; Marschal, M.; et al. Nature **2016**, *535* (7613), 511–516.

⁷⁰ Gavriš, E.; Sit, C. S.; Cao, S.; Kandrór, O.; Spoering, A.; Peoples, A.; Ling, L.; Fetterman, A.; Hughes, D.; Bissell, A.; et al. Chem. Biol. **2014**, *21* (4), 509–518.

⁷¹ Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Schäberle, T. F.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; et al. Nature **2015**, *517* (7535), 455–459.

⁷² Martin, S. E.; Melander, R. J.; Brackett, C. M.; Scott, A. J.; Chandler, C. E.; Nguyen, C. M.; Minrovic, B. M.; Harrill, S. E.; Ernst, R. K.; Manoíl, C.; et al. **2019**.

préservé l'efficacité.³¹ Il pourrait s'agir de vacciner des personnes à risque : malades chroniques, immunodéprimés, personnes âgées de plus de 65 ans.

4. Les glycopeptides

4.1. La famille des glycopeptides

Les glycopeptides sont des antibiotiques de dernier recours en milieu hospitalier, utilisés dans le traitement des infections causées par les bactéries à Gram positif multi-résistantes, notamment les infections au genre *enterococcus*, au SARM, ainsi que la colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile*.⁷³ Cette famille comprend des antibiotiques d'origine naturelle, dont la vancomycine et la teicoplanine et des antibiotiques semi-synthétiques à savoir la télavancine, l'oritavancine et la dalbavancine.

Les glycopeptides sont des molécules de masse moléculaire élevée, variant entre 1400 et 1900 Dalton. Ils agissent par une inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram positif, entraînant ainsi la lyse bactérienne. Ils se lient avec une haute affinité sur le dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane naissant, forment une poche rigide et masquent le site d'action des transpeptidases chargées de former les ponts peptidiques du peptidoglycane.²³ Leur mécanisme d'action s'explique entre autres par cette masse moléculaire élevée, avec leur capacité à former des dimères, ils empêchent par encombrement stérique, la transglycosylation nécessaire à la finition du peptidoglycane naissant. Du blocage de la transpeptidation et de la transglycosylation du peptidoglycane [Figure 15], il en résulte l'inhibition de la croissance puis la mort bactérienne.^{23,74,75}

⁷³ Binda, E.; Marinelli, F.; Marcone, G. L. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **2014**, 3 (4), 572–594.

⁷⁴ Cattoir, V.; Leclercq, R. *MEDECINE/SCIENCES* **2010**, 11 (26), 936–942.

⁷⁵ Pootoolal, J.; Neu, J.; Wright, G. D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, 42, 381–408.

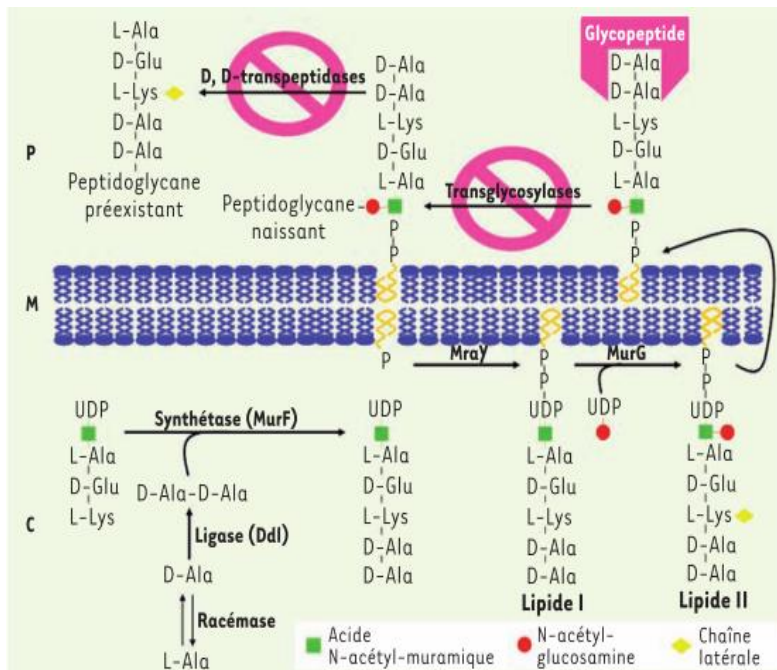


Figure 15 : Différentes étapes intracytoplasmiques de la synthèse des précurseurs du peptidoglycane, mécanisme d'action des glycopeptides avec le dipeptide D-Ala-D-Ala terminal, blocage des transpeptidases et des transglycosylases (d'après [74])

Les glycopeptides naturels

La vancomycine et la teicoplanine sont les deux glycopeptides naturels. La vancomycine de l'anglais «*to vanquish*» a été isolée du champignon microscopique *Amiclotopsis orientalis* en 1952 et introduite en clinique en 1956 pour le traitement des infections à bactéries Gram positif résistantes à la pénicilline.^{73,76} C'est un heptapeptide cyclique composé de deux tyrosines chlorées, de trois systèmes phénylglycine, d'acide aspartique et de N-méthylleucine, avec un disaccharide exo-cyclique formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de vancosamine [Figure 16].⁷⁷ Elle est peu absorbée dans le tractus digestif, ce qui en fait un bon traitement de la colite pseudomembraneuse à *C. difficile*. C'est un antibiotique bactéricide concentration-dépendant, avec un effet post-antibiotique. La teicoplanine [Figure 16] a été isolée du champignon microscopique *Actinoplanes teichomyceticus* en 1978 et introduite en clinique en 1988. Elle a une structure proche de celle de la vancomycine avec un heptapeptide cyclique et trois molécules osidiques extra-cycliques fixées aux résidus 4, 6 et 7 du cycle heptapeptidique. La glucosamine fixée au résidu 4 est acylée par une chaîne latérale d'acide gras de longueur variable. La présence de cette chaîne

⁷⁶ Henson, K. E. R.; Levine, M. T.; Wong, E. A. H.; Levine, D. P. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, 13 (10), 1265–1278.

⁷⁷ Pfeiffer, R. R. *Structural Features of Vancomycin*; **1981**; Vol. 3.

latérale confère à la teicoplanine une liposolubilité, donc une meilleure pénétration tissulaire d'où une activité antibactérienne supérieure par rapport à celle de la vancomycine. La forme utilisée en thérapeutique est un mélange de 5 composés glycopeptidiques qui diffèrent entre eux par la longueur de la chaîne latérale.⁷³

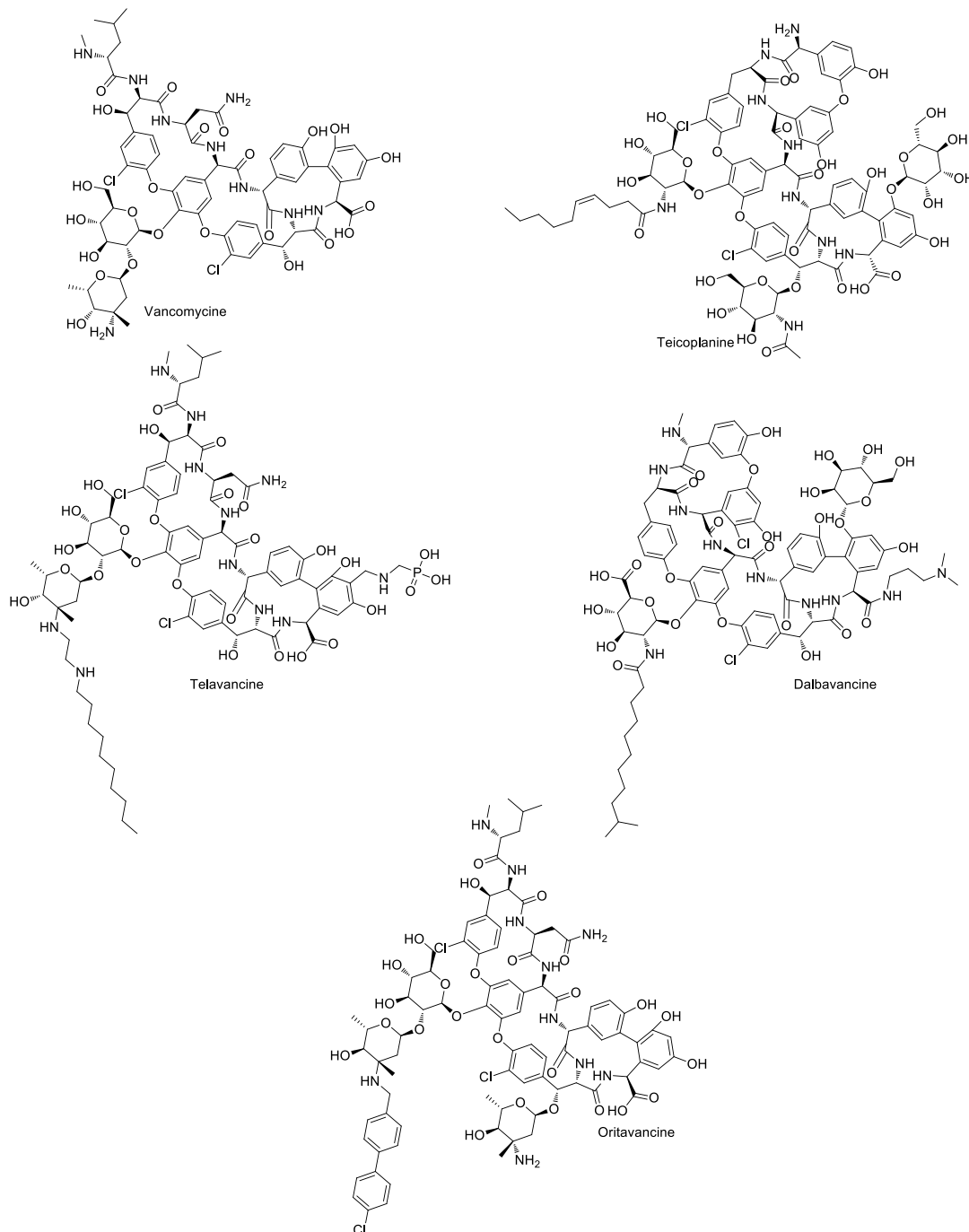


Figure 16 : Structures chimiques des glycopeptides d'après les codes SMILES PUBCHEM

Les glycopeptides semi-synthétiques

L'augmentation de l'activité antibactérienne de la teicoplanine comme dit plus haut est liée notamment à la présence de la chaîne latérale d'acides gras. S'inspirant de ce constat, les glycopeptides semi-synthétiques ou lipoglycopeptides, au nombre de trois, à savoir la télavancine [Figure 16], la dalbavancine [Figure 16] et l'oritavancine [Figure 16] comportent dans leurs structures une chaîne latérale hydrophobe outre l'heptapeptide. Cette chaîne latérale favorise l'encrage des molécules dans la bicouche lipidique de la membrane bactérienne.

La télavancine est un dérivé semi-synthétique de la vancomycine. Elle diffère de la vancomycine par deux fragments chimiques, l'un hydrophobe et l'autre hydrophile. Le fragment hydrophobe est un decylaminoéthyle fixé à la vancomycine, le fragment hydrophile est un acide phosphonique aminé fixé à un des résidus phénylglycine de l'heptapeptide.⁷⁶ La télavancine possède un effet concentration dépendant et son efficacité supérieure à la vancomycine s'explique par le fait qu'en plus d'inhiber la synthèse du peptidoglycane comme la vancomycine, elle perturbe l'intégrité de la paroi bactérienne par un mécanisme non encore parfaitement élucidé.⁷³

L'oritavancine est un dérivé semi-synthétique de la chloroéremomycine synthétisée par *Amycolatopsis orientalis*. La chloroéremomycine diffère de la vancomycine par le modèle de glycosylation sur les résidus 4 et 6 de l'heptapeptide, la chaîne hydrophobe benzyl-chlorophényle fixé à la vancosamine et le monosaccharidique fixé sur le résidu phenylserine de l'heptapeptide.⁷⁶ L'oritavancine agit en inhibant la synthèse du peptidoglycane et en entraînant une désintégration de la paroi bactérienne grâce à son groupe biaryle. Cette double action offre des avantages en termes d'activités antimicrobiennes.⁷³

La dalbavancine, quant à elle, est un dérivé semi-synthétique d'une molécule teicoplanine-like, l'A40926. Cette dernière a été isolée de l'actinomycete *Nonomuraea sp.* ATCC 39727, provenant d'un échantillon de sol indien collecté au milieu des années 1980. La dalbavancine est le dérivé diméthylaminopropylique d'amide de l'A40926. La dalbavancine est l'une des molécules qui a montré une activité *in vitro* supérieure à celle de la vancomycine au cours d'un projet de recherche de nouveaux glycopeptides.⁷³ Elle a été introduite en clinique en 2014.⁷⁶

4.2. Résistances aux glycopeptides

Les premières résistances aux glycopeptides ont été d'abord décrites chez les entérocoques, puis chez les staphylocoques. Il est établi que c'est l'utilisation massive des glycopeptides qui a exercé une pression de sélection sur les entérocoques. Cela a induit l'émergence de souches résistantes aux glycopeptides⁷⁸ dès 1986 en France⁷⁹, et 1987 en Angleterre. Aux Etats-Unis, les résistances ont été observées dans les années 1990 où les souches résistantes représentaient 28,5 % des souches d'entérocoques responsables d'infections liées aux soins dans les services de réanimation.⁸⁰

Plusieurs études ont montré que les microorganismes producteurs d'antibiotiques dont les actinomycètes disposent de techniques diverses pour échapper à la toxicité des molécules antibiotiques qu'ils synthétisent.⁸¹ L'un des moyens utilisés par ces microorganismes est la résistance aux antibiotiques autoproduits, ce qui fait de ces microorganismes un potentiel réservoir des gènes de résistances. C'est dans les années 1990 qu'a été rapportée pour la première fois, une résistance aux glycopeptides chez les actinomycètes, médiée par le gène *van*. En effet un orthologue du gène *vanHAX* d'*enterococcus* a été cloné de deux actinomycètes producteurs de glycopeptides, *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009 et *Amycolatopsis orientalis* C329.2.⁸² Des études similaires ont été rapportées sur des microorganismes producteurs de glycopeptides suggérant que les actinomycètes seraient la source originelle du gène *van* retrouvé dans les bactéries pathogènes isolées en clinique.⁸³⁻⁸⁶

L'expression moléculaire de la résistance est le résultat de la coopération de plusieurs gènes organisés en opérons et appelés *van*. A l'heure actuelle, 9 opérons *van* ont été décrits. Les protéines exprimées par ces gènes se chargent de la reprogrammation de la biosynthèse de la paroi bactérienne. La résistance aux glycopeptides se traduit par la modification des

⁷⁸ French, G. L. Clin. Infect. Dis. **1998**, 27 (Supplement 1), S75–S83.

⁷⁹ Leclercq, R.; Derlot, E.; Duval, J.; Courvalin, P. N. Engl. J. Med. **1988**, 319 (3), 157–161.

⁸⁰ Gaynes, R. P.; Culver, D. H.; Horan, T. C.; Edwards, J. R.; Richards, C.; Tolson, J. S.; System, N. N. I. S. Clin. Infect. Dis. **2001**, 33 (Supplement 2), S69–S77.

⁸¹ Cundliffe, E.; Demain, A. L. Soc. Ind. Microbiol. **2010**, 643–672.

⁸² Marshall, C. G.; Broadhead, G.; Leskiw, B. K.; Wright, G. D. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997, 94 (12), 6480–6483.

⁸³ Marshall, C. G.; Lessard, I. A.; Park, I.; Wright, G. D. Antimicrob. Agents Chemother. **1998**, 42 (9), 2215–2220.

⁸⁴ Sosio, M.; Kloosterman, H.; Bianchi, A.; De Vreugd, P.; Dijkhuizen, L.; Donadio, S. Microbiology **2004**, 95–102.

⁸⁵ Li, T.-L.; Huang, F.; Haydock, S. F.; Mironenko, T.; Leadlay, P. F.; Spencer, J. B. Chem. Biol. **2004**, 11 (1), 107–119.

⁸⁶ Schäberle, T. F.; Vollmer, W.; Fräsch, H. J.; Hüttel, S.; Kulik, A.; Röttgen, M.; Von Thaler, A. K.; Wohlleben, W.; Stegmann, E. Antimicrob. Agents Chemother. **2011**, 55 (9), 4283–4289.

précurseurs pentapeptidiques du peptidoglycane.²⁰ Ces opérons *van* peuvent être classés en deux grandes catégories, les un (*vanA*, *vanB*, *vanD* et *vanM*) dont les protéines exprimées remplacent le dernier D-alanine de la chaîne pentapeptidique par un D-acide lactique et les autres (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* et *vanN*) dont les protéines exprimées oeuvrent pour le remplacement par une D-sérine [Figure 17].^{74,87-92}

Ceci aboutit à la diminution de l'affinité de la vancomycine pour sa cible d'un facteur 1000 pour les précurseurs comportant le depsipeptide D-Ala-D-Lac et d'un facteur 6 pour les précurseurs se terminant par D-Ala-D-Ser [Figure 18].^{73,78,93}

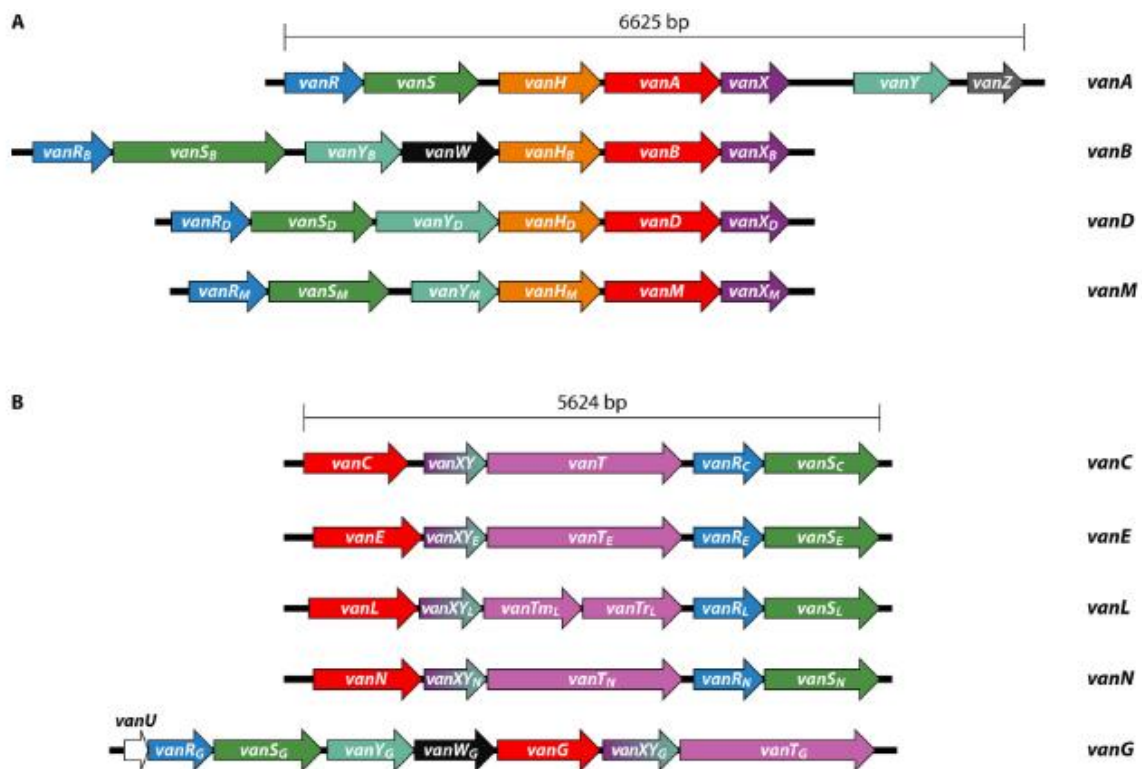


Figure 17 : Opérons *van* connus de résistance aux glycopeptides. A. Les quatre opérons de résistance aux glycopeptides qui donnent des précurseurs de peptidoglycane se terminant par D-Ala-D-Lac. Les flèches reflètent les directions de transcription et les tailles relatives des cadres de lecture ouverts. B. Les cinq opérons de résistance aux glycopeptides qui donnent des précurseurs de peptidoglycane se terminant par D-Ala-D-Ser

⁸⁷ Evers, S.; Sahm, D. F.; Courvalin, P. *Gene* **1993**, 124 (1), 143–144.

⁸⁸ Perichon, B.; Reynolds, P.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41 (9), 2016–2018.

⁸⁹ Fines, M.; Perichon, B.; Reynolds, P.; Sahm, D. F.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43 (9), 2161–2164.

⁹⁰ Xu, X.; Lin, D.; Yan, G.; Ye, X.; Wu, S.; Guo, Y.; Zhu, D.; Hu, F.; Zhang, Y.; Wang, F.; et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (11), 4643–4647.

⁹¹ Lebreton, F.; Depardieu, F.; Bourdon, N.; Fines-Guyon, M.; Berger, P.; Camiade, S.; Leclercq, R.; Courvalin, P.; Cattoir, V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55 (10), 4606–4612.

⁹² Sassi, M.; Guérin, F.; Leseq, L.; Isnard, C.; Fines-Guyon, M.; Cattoir, V.; Giard, J. C. J. *Antimicrob. Chemother.* **2018**, 73 (4), 852–855.

⁹³ Walsh, C. *Nature* **2000**, 406 (6797), 775–781.

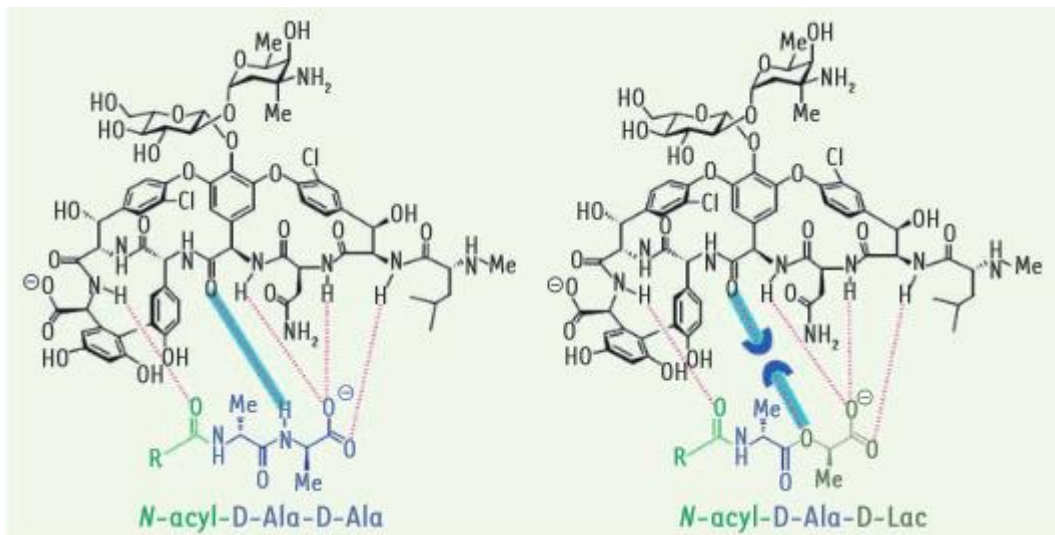


Figure 18 : Liaisons de la vancomycine avec sa cible native, et mutée (d'après [74])

Les différents types phénotypiques résultants des opérons *van* sont également au nombre de 9, VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN [Tableau 2]. Seul VanC procède d'un mécanisme de résistance naturelle, les huit autres procèdent d'un mécanisme de résistance acquise. Les espèces *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* possèdent l'opéron *vanC* ; elles sont donc naturellement résistantes à la vancomycine. *E. faecium* et *E. faecalis*, les espèces les plus retrouvées dans les infections humaines, quant à elles, deviennent résistantes aux glycopeptides par acquisition de gènes de résistance.⁷³

Tableau 2 : Phénotypes de résistances van (d'après [73])

Espèces bactériennes	Phénotypes de Résistance	Niveau d'expression de la résistance	CMI (mg/L)	Support du gène de résistance	Mode d'expression	Terminaison des précurseurs
<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	VanA	Haut	Vancomycin 64–100 Teicoplanin 16–512	Plasmide Chromosome	Inductible	D-Ala-D-Lac
<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	VanB	Variable	Vancomycin 4–1000 Teicoplanin 0.5–1	Plasmide Chromosome	inductible	D-Ala-D-Lac
<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	VanC	Résistance intrinsèque Bas	Vancomycin 2–32 Teicoplanin 0.5–1	Chromosome	Constitutive	D-Ala-D-Ser
<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	VanD	Modéré	Vancomycin 64–128 Teicoplanin 4– 64	Chromosome	Constitutive	D-Ala-D-Lac
<i>E. faecalis</i>	VanE	Bas	Vancomycin 8–32 Teicoplanin 0.5	Chromosome	Inducible	D-Ala-D-Ser
<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	VanG	Bas	Vancomycine 16 Teicoplanine 0.5	Chromosome	Inducible	D-Ala-D-Ser
<i>E. faecalis</i>	VanL	Bas	Vancomycine 8 Teicoplanine susceptible	Chromosome	Inducible	D-Ala-D-Ser
<i>E. faecium</i>	VanM	Variable	Vancomycine > 256 Teicoplanine 0.75	Plasmide Chromosome	Inducible	D-Ala-D-Lac
<i>E. faecium</i>	VanN	Bas	Vancomycine 16 Teicoplanine 0.5	Plasmide	Constitutive	D-Ala-D-Ser

La plupart des souches d'entérocoques isolées en clinique possèdent des plasmides et des éléments transposables qui sont des supports de résistance aux antibiotiques, de facteurs de

virulence.^{94,95} Les éléments transposables constituent la majorité des éléments génétiques mobiles (*mobile genetic element (MGE)*) présents chez les entérocoques [Figure 19].^{96–98}

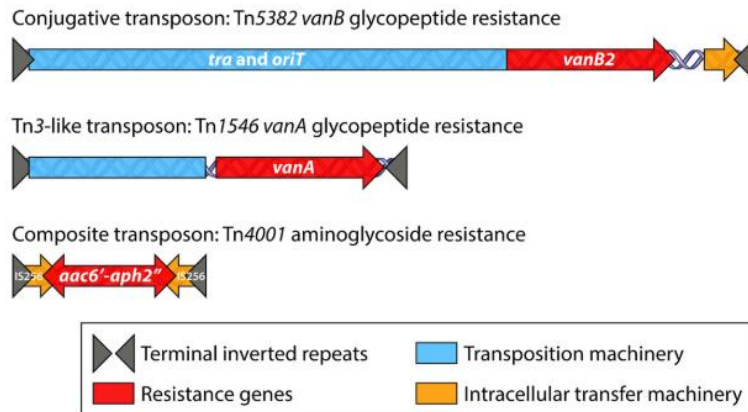


Figure 19 : Éléments génétiques transposables chez les entérocoques.

Trois types d'éléments transposables retrouvés chez les entérocoques: les transposons conjuguatifs, tels que Tn5382 support de l'opéron *vanB2*; les éléments de séquence d'insertion (IS) de la famille Tn3, tels que Tn1546 support de l'opéron *vanA*; et les transposons composites, tels que Tn4001, support de résistance à haut niveau aux aminosides. Ces trois types d'éléments transposables peuvent exister soit dans le chromosome, soit dans les plasmides.

Les opérons *vanA* et *vanB* sont le plus souvent retrouvés chez *E. faecium*. Ils sont fréquemment portés par un élément génétique mobile. L'opéron *vanA* confère une résistance de haut niveau à la vancomycine et à la téicoplanine. Il est porté par un transposon de la famille des Tn-3, le Tn1546, qui comporte des points de mutations, de délétions et d'insertion de séquences.^{99,100} L'apparition de la résistance aux glycopeptides chez *Staphylococcus*, suggère que le gène de résistance lui a été transféré grâce au transposon Tn1546 d'entérocoques résistants aux glycopeptides. L'opéron *vanA* a aussi été décrit chez *Staphylococcus aureus*.¹⁰¹ Le premier cas clinique de *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine (SARV) a été identifié en 2002 aux USA, suivi de plusieurs autres cas au Brésil, au Royaume-Uni, en France et en Inde.¹⁰⁰ Mais ceci reste un événement rare.

⁹⁴ Mazaheri Nezhad Fard, R.; Barton, M. D.; Heuzenroeder, M. W. Lett. Appl. Microbiol. 2011, 52 (6), 559–564.

⁹⁵ Clewell, D. B.; Weaver, K. E.; Dunny, G. M.; Coque, T. M.; Francia, M. V.; Hayes, F. 2014.

⁹⁶ Lam, M. M. C.; Seemann, T.; Bulach, D. M.; Gladman, S. L.; Chen, H.; Haring, V.; Moore, R. J.; Ballard, S.; Grayson, M. L.; Johnson, P. D. R.; et al. J. Bacteriol. 2012, 194 (9), 2334–2341.

⁹⁷ Qin, X.; Galloway-Pêa, J. R.; Sillanpaa, J.; Roh, J. H.; Nallapareddy, S. R.; Chowdhury, S.; Bourgogne, A.; Choudhury, T.; Muzny, D. M.; Buhay, C. J.; et al. BMC Microbiol. 2012, 12.

⁹⁸ Paulsen, I. T.; Banerjee, L.; Hyers, G. S. A.; Nelson, K. E.; Seshadri, R.; Read, T. D.; Fouts, D. E.; Eisen, J. A.; Gill, S. R.; Heidelberg, J. F.; et al. Science (80-.). 2003, 299 (5615), 2071–2074.

⁹⁹ Weaver, K. E. Am. Soc. Microbiol. 2019.

¹⁰⁰ Murugaiyah, V. Infect. Dis. 2012.

¹⁰¹ Courvalin, P. Clin. Infect. Dis. An Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 2006, 42 Suppl 1, S25-34

L'opéron *vanA* est le premier opéron de résistance aux glycopeptides à avoir été décrit.¹⁰² C'est aussi le plus fréquemment isolé en clinique. Il comprend cinq gènes impliqués dans le mécanisme de résistance aux glycopeptides (*vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*) et deux gènes de régulation (*vanR*, *vanS*) [Figure 20].^{74,103} Dans le système de régulation à deux composantes, *vanS* code pour un capteur histidine-kinase transmembranaire, qui détecte la présence de glycopeptides dans l'environnement. Le gène *vanR* code pour un activateur transcriptionnel, VanR, qui régule l'expression des gènes *van*.¹⁰⁴ Le gène *vanH* code pour une déshydrogénase qui réduit le pyruvate en D-Lac. Avec ce D-Lac, la ligase codée par le gène *vanA* catalyse la formation d'un depsipeptide D-Ala-D-Lac. Ce depsipeptide est incorporé au précurseur tripeptidique du peptidoglycane (UDP-MurNac).¹⁰² Le gène *vanX* code pour une D-Ala-D-Ala-dipeptidase, qui hydrolyse le dipeptide « normal » D-Ala-D-Ala formé par la ligase naturelle Ddl, baissant ainsi les taux intracytoplasmiques de dipeptides D-Ala-D-Ala qui auraient pu être utilisés pour la synthèse de peptidoglycane « sensibles » à la vancomycine.¹⁰⁵ Cette fonction de VanX est cruciale car sans elle, il suffirait que quelques éléments du peptidoglycane restant sensibles à la vancomycine s'insèrent dans la paroi pour que la résistance soit levée.⁷⁴ Le gène *vanY* qui code pour une D,D-carboxypeptidase élimine la D-Ala en position C-terminale des précurseurs pentapeptidiques.¹⁰⁶ Le gène *vanZ* code pour une protéine dont la fonction n'est pas parfaitement élucidée à l'heure actuelle. Toutefois cette protéine est connue pour être impliquée dans l'expression de la résistance contre la téicoplanine.¹⁰⁷

¹⁰² Arthur, M.; Molinas, C.; Depardieu, F.; Courvalin, P. J. *Bacteriol.* **1993**, 175 (1), 117–127.

¹⁰³ Depardieu, F.; Podglajen, I.; Leclercq, R.; Collatz, E.; Courvalin, P. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, 20 (1), 79–114.

¹⁰⁴ Arthur, M.; Depardieu, F.; Gerbaud, G.; Galimand, M.; Leclercq, R.; Courvalin, P. J. *Bacteriol.* **1997**, 179 (1), 97–106.

¹⁰⁵ Reynolds, P. E.; Depardieu, F.; Dutka-Malen, S.; Arthur, M.; Courvalin, P. *Mol. Microbiol.* **1994**, 13 (6), 1065–1070.

¹⁰⁶ Arthur, M.; Molinas, C.; Courvalin, P. *Gene* **1992**, 120 (1), 111–114.

¹⁰⁷ Arthur, M.; Depardieu, F.; Molinas, C.; Reynolds, P.; Courvalin, P. *Gene* **1995**, 154 (1), 87–92.

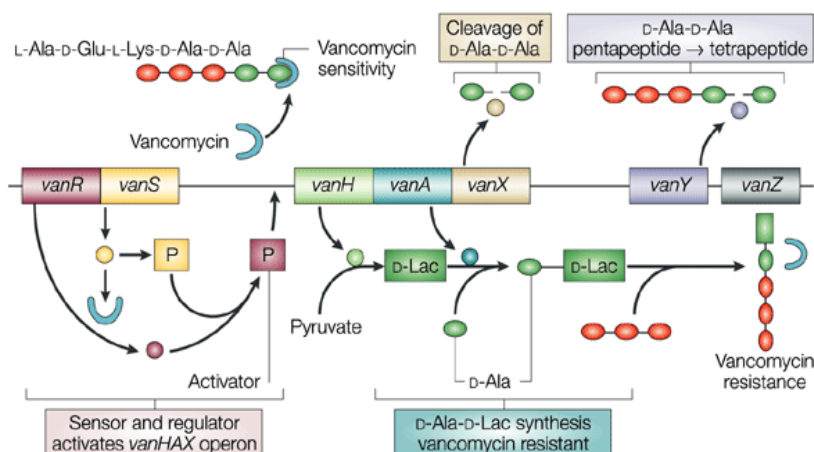


Figure 20 : Fonctionnement de l'opéron vanA d'après [108]¹⁰⁸

4.3. Méthodes de détection des résistances aux glycopeptides

Les méthodes de détection de la résistance aux antibiotiques, plus précisément aux glycopeptides peuvent être regroupées en deux catégories, à savoir les méthodes phénotypiques dites conventionnelles et les méthodes génotypiques.

Les méthodes phénotypiques, encore dites méthodes de culture, nécessitent une culture bactérienne. Ce sont principalement : la méthode des disques avec établissement de l'antibiogramme et la méthode des dilutions (microdilution et macrodilution) avec détermination des CMI (concentration minimale inhibitrice). De nos jours des systèmes automatisés permettent de réaliser des antibiogrammes et des mesures de CMI avec un gain de temps considérable. De plus, ces automates permettent la réalisation d'analyses sur plusieurs échantillons à la fois. Cependant, d'autres techniques beaucoup plus modernes existent. C'est par exemple le MALDI-TOF couplé à la masse qui permet l'identification d'une bactérie grâce au spectre de masse qui lui est propre avec élaboration d'un antibiogramme.¹⁰⁹

Les méthodes génotypiques dites de biologie moléculaire permettent l'identification de la bactérie pathogène par amplification, par hybridation de séquences d'ADN ou par séquençage partiel ou total de génome. Ce qui permet de se passer des étapes fastidieuses de mise en culture de certaines souches et de s'affranchir du risque de contamination et de propagation de souches virulentes. Ces techniques donnent accès aux gènes de résistances aux antibiotiques. Ce sont principalement la PCR (*polymerase chain reaction*), les micropuces

¹⁰⁸ Hughes, D. Nat. Rev. Genet. **2003**, 4 (6), 432–441.

¹⁰⁹ Khan, Z. A.; Siddiqui, M. F.; Park, S.; Khan, Z. A.; Siddiqui, M. F.; Park, S. Diagnostics **2019**, 9 (2), 49.

d'ADN capables de détecter des gènes de résistances, et le séquençage massif (*Whole genome sequencing WSG*).^{109–111}

En France, les biologistes et les cliniciens se réfèrent aux recommandations de la Société Française de Microbiologie (SFM) et de l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* pour la détermination de la sensibilité et la résistance des germes aux antibiotiques. Les recommandations peuvent être consultées gratuitement sur les sites *web* de l'*EUCAST* et de la SFM. Aux USA le *Clinical and Laboratory Standards Institute* propose des recommandations similaires mais à accès payant.

Détection de la résistance aux glycopeptides chez les staphylocoques

L'apparition de staphylocoques à sensibilité diminuée aux glycopeptides dites hétéro-GISA ou GISA (encore appelés VISA) a potentialisé le danger que représentent les d'entérocoques résistants à la vancomycine, plus généralement aux glycopeptides en clinique. La première infection à VISA a été identifiée au Japon en 1997. Par la suite, des souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine dites, SARV ont été isolées et la corrélation de la transmission du gène de résistance d'*E. faecium* à *S. aureus* a été établie. Les glycopeptides étaient jusqu'alors le traitement de référence des infections à staphylocoques multi-résistants. Pour limiter l'expansion des résistances aux glycopeptides chez les staphylocoques avec une prise en charge efficace des patients, des méthodes précises sont proposées par la SFM. Ainsi la méthode de référence pour la détermination des CMI des glycopeptides, la microdilution en milieu liquide (référence ISO 20776) a été proposée. Elle ne doit pas être réalisée par diffusion en milieu gélosé. Pour éviter d'en arriver à des échappements thérapeutiques en cas d'infection à souches hétéro-GISA/GISA, le seuil de résistance est fixé à 2 mg/L et la souche devra être envoyée à un laboratoire référent pour confirmation.¹¹²

Pour les utilisateurs d'automates, les souches pour lesquelles la CMI de la teicoplanine et la CMI de la vancomycine sont ≤ 1 mg/L peuvent être catégorisées sensibles aux glycopeptides. Il est recommandé de déterminer la CMI par microdilution en milieu liquide des souches pour lesquelles la CMI mesurée par un automate est > 1 mg/L pour la teicoplanine ou pour la vancomycine. Les souches de *S. aureus* ayant une CMI vancomycine et/ou teicoplanine > 1

¹¹⁰ Trotter, A. J.; Aydin, A.; Strinden, M. J.; O'Grady, J. Recent and Emerging Technologies for the Rapid Diagnosis of Infection and Antimicrobial Resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2019, 51, 39–45.

¹¹¹ Billy, C. *Reanimation* 2003, 12 (3), 192–197.

¹¹² EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Breakpoints.* 2019, 0–99.

mg/L par microdilution en milieu liquide peuvent être envoyées à un centre référent pour la confirmation du caractère hétéroGISA/GISA (la méthode de référence permettant de confirmer ce phénotype étant l'analyse de population).¹¹³

Détection de la résistance à la vancomycine chez les entérocoques

D'après l'EUCAST, il existe 4 principales méthodes de détection des ERV que sont la détermination de la CMI, la méthode des disques, le test de screening et la détection génotypique par PCR.¹¹⁴ Pour les trois premières méthodes, il est essentiel d'avoir un temps d'incubation de 24-48h pour une meilleure détection.

Détermination de la CMI

La détermination de la CMI peut être effectuée par dilution en milieu gélosé, ou microdilution de bouillon avec un gradient de concentration d'antibiotique défini. La microdilution est effectuée conformément à la norme ISO 20776-1 comme recommandée par l'EUCAST. Le temps minimum d'incubation est de 24 h.

Méthode des disques

Pour la méthode des disques à diffusion, la méthode spécifiée par EUCAST doit être suivie minutieusement. Inspecter les zones de bords flous et / ou microcolonies avec la lumière transmise. Des zones d'inhibition avec des bords francs et nets indiquent que l'isolat est sensible à la vancomycine. Les isolats avec des bords flous ou des colonies dans la zone d'inhibition peuvent être résistants indépendamment de la taille de la zone d'inhibition et ne doivent pas être déclarés comme sensibles sans confirmation par détermination de la CMI [Figure 21]. Un temps d'incubation minimum de 24 h est nécessaire.

¹¹³ Janvier, V.; Cattoir, V.; Courvalin, P.; Dubreuil, L.; Jarlier, V.; Lina, G.; Merens, A.; Plesiat, P.; Ploy, M. Comité de l'Antibiogramme de La Société Française de Microbiologie Recommandations 2019. **2019**.

¹¹⁴ EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. **2017**.

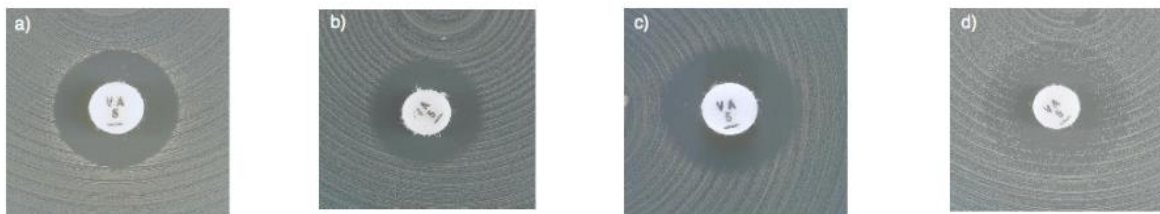


Figure 21 : Méthode des disques : Exemples de zones d'inhibition de souches d'*Enterococcus spp.* Avec la vancomycine (disque chargé à 5 μ g) a : Bord à contours nets et diamètre d'inhibition \geq 12 mm, Sensible à la vancomycine, b-d : Bord à contours flous ou présence de colonies dans la zone d'inhibition, Résistants à la vancomycine

Test de screening

Le test de screening se réalise, soit sur gélose BHI (Brain Heart Infusion) soit sur microplaques. Le screening s'effectue par application de 1×10^5 - 1×10^6 UFC (10 μ l d'une suspension de McFarland à 0,5) sur gélose BHI avec 6 mg /L de vancomycine. Une incubation de 24-48h à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ dans l'air ambiant est nécessaire. Une croissance de plus d'une colonie est considérée comme un test positif. Ce test est fiable pour la détection des isolats *vanA*- et *vanB*-positifs.

Les tests génotypiques

La détection de la résistance à la vancomycine peut s'effectuer par l'utilisation de la PCR ciblant les gènes *vanA* et *vanB*.

5. Problématique des entérocoques résistants aux glycopeptides et projet de thèse

5.1. Problématique des entérocoques résistants aux glycopeptides

Le terme entérocoque a été utilisé pour la première fois par Thiercelin en 1899 pour décrire une bactérie du tractus digestif ayant un pouvoir pathogène. Initialement considéré comme streptocoques du groupe D, c'est seulement en 1984 que le genre *enterococcus* a été admis comme un genre à part entière.¹¹⁵ Ce sont des cocci à Gram positif, commensaux de l'homme et des animaux. Ils sont également retrouvés dans le sol, l'eau et associés à des plantes notamment le soja, le sorgho, etc. Ce sont des bactéries non exigeantes, capables de supporter de fortes variations de température (10-45 °C), de pH (4-10), des concentrations

¹¹⁵ Schleifer, K. H.; Kilpper-Balz, R. Int. J. Syst. Bacteriol. **1984**, 34 (1), 31–34.

élevées de NaCl (6.5 %) et même des désinfectants chimiques tels que l'alcool et la chlorhexidine.^{116–118}

Les entérocoques sont des bactéries intrinsèquement résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques. Ils ont également un fort potentiel d'acquisition de gènes de résistances.¹¹⁹ Leur résilience et leur plasticité génomique ont pérennisé le genre dans son environnement avec des expressions diverses et variées de résistance aux antibiotiques [Figure 22].¹¹⁹

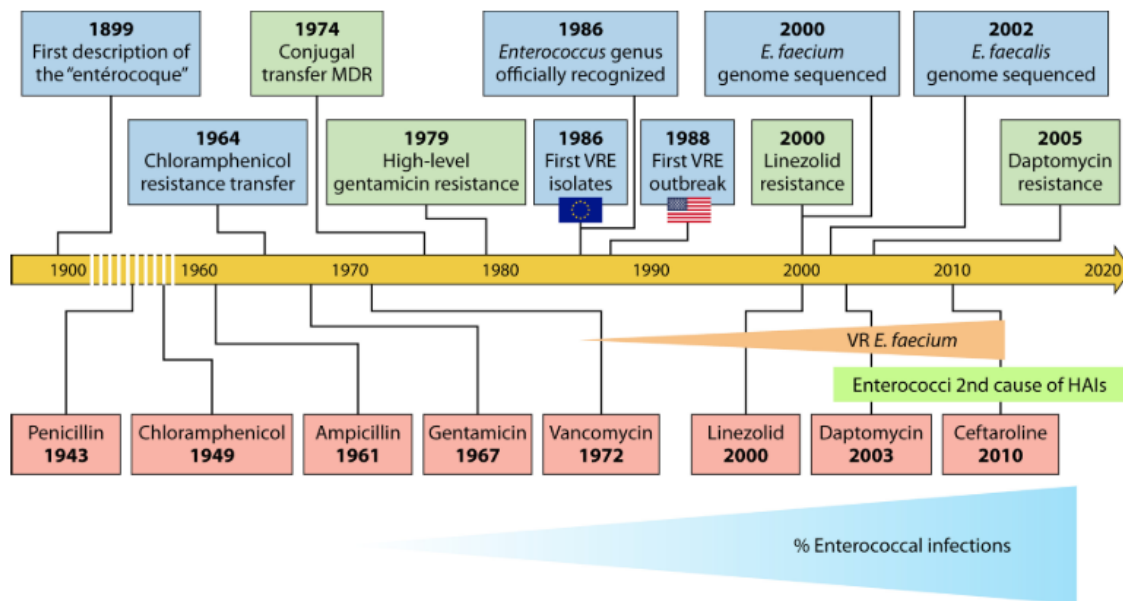


Figure 22 : Chronologie des événements marquants de l'histoire des entérocoques en tant que pathogène de l'Homme, (rectangles bleus) ; apparition d'une résistance aux antibiotiques (rectangles verts) ; initiations cliniques d'antibiotiques (rectangles rouges). La chronologie commence en 1899 avec la première description officielle des entérocoques en tant que bactéries entériques rondes. Puis en 1964 la première description du transfert de la résistance au chloramphénicol, 15 ans seulement après son introduction clinique. Des histoires similaires se sont produites pour les aminosides et les glycopeptides. Depuis la fin des années 1980, la prévalence d'*E. faecium* résistant à la vancomycine (ERV) a augmenté, de même que le pourcentage global d'infections liées aux soins dus aux entérocoques. La résistance aux nouveaux antibiotiques introduits, le linézolide et la daptomycine, est apparue très rapidement après leur introduction en clinique (d'après ^[119])

Ils sont pathogènes opportunistes et font partie des bactéries les plus rencontrées dans les infections liées aux soins. Ils sont ainsi impliqués dans des infections du tractus urinaire, intra-abdominales, méningées, endocardites, bactériémie, etc.^{38,119} Les espèces les plus rencontrées en clinique sont *E. faecium* et *E. faecalis*.^{38,118,120}

¹¹⁶ Miller, W. R.; Murray, B. E.; Rice, L. B.; Arias, C. A. Infect. Dis. Clin. North Am. **2016**, 30 (2), 415–439.

¹¹⁷ Lee, T.; Pang, S.; Abraham, S.; Coombs, G. W. Journal of Global Antimicrobial Resistance. **2019**.

¹¹⁸ Bra\ek, O. Ben; Smaoui, S. **2019**.

¹¹⁹ García-Solache, M.; Rice, L. B. Clin. Microbiol. Rev. **2019**, 32 (2), 1–28.

¹²⁰ Golob, M.; Pate, M.; Kušar, D.; Dermota, U.; Avberšek, J.; Papić, B.; Zdovc, I.; Bondi, M. Biomed Res. Int. **2019**.

Au vu des caractéristiques citées ci-dessus, l'émergence de souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) se comprend donc parfaitement. En plus de la grande adaptabilité des entérocoques, l'utilisation abusive et inadaptée des glycopeptides en clinique et dans l'élevage (avec l'avoparcine notamment comme facteur de croissance^{121,122}) ont entraîné l'émergence des ERG. Ces ERG, encore appelés entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) constituent de nos jours un problème majeur de santé publique, au point que *E. faecium* résistant à la vancomycine fait partie de la liste des bactéries à priorité élevée de l'OMS [Tableau 1]. Non seulement les ERG sont des pathogènes opportunistes mais ils constituent également un réservoir de gènes de résistance transférables à d'autres bactéries. Ainsi les infections à ERG pourraient avoir comme conséquences des impasses thérapeutiques et des risques d'épidémies voire d'endémies.

Cependant, des alternatives existent et sont mises en œuvre pour lutter contre l'antibiorésistance. Parmi ces alternatives il y a la mise au point de méthodes rapides et simples de détection des résistances. Il est évident que pour lutter contre l'antibiorésistance, la rapidité du diagnostic est un point essentiel. Les tests de diagnostic rapide permettront (i) d'éviter une antibiothérapie inutile en cas d'infection virale, (ii) de prescrire une antibiothérapie adaptée et spécifique et non plus probabiliste, (iii) de dépister les patients porteurs de BMR et de prendre les précautions qui s'imposent lors de leur prise en charge médicale et leur éducation thérapeutique. Les tests rapides d'orientation diagnostique de l'angine (TROD) ont montré leur efficacité en France. En effet l'utilisation des TROD angine a permis de réduire l'utilisation inutile des antibiotiques dans les infections d'origine virale avec une baisse considérable du taux de streptocoque du groupe A résistants aux macrolides-lincosamides-streptogramine (MLS), passant de 35 % en 2004 à 5 % en 2010.¹²³ Le rendu d'un résultat par un test TROD est de 15 minutes en moyenne, ce qui est compatible avec la durée de la consultation en médecine de ville. Cela est d'un avantage considérable pour le patient, le soignant et la société, d'abord en évitant des dépenses inutiles liées à l'utilisation inutile d'antibiotiques. Ensuite cela est d'un intérêt écologique parce que le risque d'émergence de résistance dû à mésusage d'antibiotiques est évité. Enfin, cela permet une antibiothérapie de première intention non probabiliste mais spécifique et adaptée. Ainsi un

¹²¹ Aarestrup, F. M. *Microb. Drug Resist.* **1995**, 1 (3), 255–257.

¹²² Klare, I.; Heier, H.; Claus, H.; Reissbrodt, R.; Witte, W. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 125 (2–3), 165–172.

¹²³ Aymeric Cantais, Roland Cash, Brigitte Lamy, Claire Poyart, G. R. **2016**, 84

diagnostic rapide permet un gain de temps (diminution de la durée d'hospitalisation), une diminution de la morbidité et de la mortalité.

L'identification des patients porteurs de bactéries multirésistantes (BMR) grâce au test de diagnostic rapide a donc plusieurs impacts positifs dans la lutte contre l'antibiorésistance. Elle permettra une utilisation pertinente des antibiotiques chez le patient en cas d'acte chirurgical, de septicémie, etc. Elle permettra également une baisse du risque de propagation de la BMR, donc du risque d'épidémie, en prenant les précautions qui s'imposent (bonnes pratiques d'hygiène et de prévention : lavage des mains, mise en quarantaine du patient, etc) et en entreprenant une éducation thérapeutique du patient.¹²³

5.2. Projet de thèse

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de la mise au point d'une méthode de détection rapide des résistances aux glycopeptides et permettrait d'assurer une prise en charge rapide des patients et d'éviter l'expansion de la souche résistante, réduisant ainsi les risques d'épidémie et d'endémie. Les méthodes classiques de détection des résistances aux glycopeptides nécessitent plus de 24 h. Les méthodes de biologie moléculaire prennent moins de temps mais sont onéreuses et lourdes en équipements. Développer un test de diagnostic rapide qui conjugue spécificité, sensibilité, robustesse, praticabilité avec un temps de rendu des résultats de 15 minutes en moyenne contribuerait à lutter contre l'antibiorésistance. Un tel test faciliterait la détection de la résistance aux glycopeptides en routine hospitalière. Le concept proposé dans cette thèse est basé sur la détection de l'activité D-Ala-D-Ala dipeptidase de VanX par clivage-libération d'un agent de détection chromogénique. Plusieurs avantages soutiennent le choix de VanX comme cible de la détection de la résistance à la vancomycine. D'une part son rôle est crucial dans la manifestation de la résistance aux glycopeptides. D'autre part le phénotype VanX, c'est-à-dire l'activité D-Ala-D-Ala dipeptidase, est retrouvée dans l'expression de tous les opérons *van* actuellement décrits. Ce sont les gènes *vanX* et *vanXY* qui sont responsables de l'expression de ce phénotype D-Ala-D-Ala dipeptidase. L'outil de diagnostic qui sera développé permettra donc de mettre en évidence la résistance aux glycopeptides quel que soit l'opéron de résistance.

Le concept de l'étude obéit au grand principe des systèmes auto-immolables de l'anglais *self-immolative system or linker*. Le premier article évoquant les SAI a été publié il y a un peu moins

de quarante ans. Ces systèmes ont été largement exploités dans divers domaines dont le domaine du diagnostic.

Chapitre 2 : Systèmes chimiques auto-immolables, principe et domaines d'application

Chapitre 2 : Systèmes chimiques auto-immolables, principe et domaines d'application

1. Introduction sur les systèmes auto-immolables

Les *self-immolative systems*, qui pourraient être traduits en français par systèmes auto-immolables (SAI), ont vu leur utilisation s'accroître et leurs domaines d'application se diversifier au cours des trente dernières années. Beaucoup plus utilisés dans les sciences biomédicales, les SAI ont constitué une percée innovatrice dans la recherche pharmaceutique et médicale. Ils sont considérés comme des *linker* auto-immolables par certains auteurs, des espaceurs auto-immolables par d'autres et actuellement appelés bras auto-immolable dans le corps scientifique francophone. Quelle que soit l'appellation, le rôle joué par ces systèmes reste le même. Par définition, Philip *et al.* considèrent les SAI comme un type de connecteur, qui relie un fragment transporteur à un fragment médicament et qui permet un gain en stabilité de la molécule ainsi obtenue.¹²⁴

Dans la suite de ce travail, le terme système auto-immolable désignera à la fois les *linkers*, les espaceurs et les bras auto-immolables. Les scientifiques ont fait de ces systèmes auto-immolables un outil clé dans les domaines de l'administration de médicaments, en particulier les médicaments anticancéreux, dans les domaines de la bio-analyse et de la bio-détection, de l'ingénierie des molécules-cages et des nanoparticules. La présente étude expose le principe et les domaines d'application des SAI.

2. Systèmes auto-immolables : généralités

Un SAI peut être défini comme étant une entité chimique qui, en présence d'un stimulus donné, entraîne la libération, par une cascade intramoléculaire, un substrat d'intérêt. Le stimulus peut être de nature chimique (ions fluorures,¹²⁵ Zn/AcOH,¹²⁶ peroxyde d'hydrogène,¹²⁷⁻¹²⁹ pH acide ou basique), physique (chaleur, rayonnements UV),¹²⁵

¹²⁴ Philip L. Carl, Prasun K. Chakravarty, J. A. K. J. Med. Chem. **1981**, 24, 479–480.

¹²⁵ Roth, M. E.; Green, O.; Gnam, S.; Shabat, D. Chem. Rev. **2016**, 116, 1309–1352.

¹²⁶ Wong, A. D.; DeWit, M. A.; Gillies, E. R. Adv. Drug Deliv. Rev. **2012**, 64 (11), 1031–1045.

¹²⁷ Wu, W.; Li, J.; Chen, L.; Ma, Z.; Zhang, W.; Liu, Z.; Cheng, Y.; Du, L.; Li, M. Anal. Chem. 2014, 86 (19), 9800–9806.

¹²⁸ Sella, E.; Shabat, D. J Am Chem Soc **2009**, 131, 9934–9936

¹²⁹ Gnam, S.; Shabat, D. Acc. Chem. Res. **2014**, 47 (10), 2970–2984.

biochimique^{128–132} (β -glucuronidase, β -galactosidase, Penicilline-G Amidase, cathepsine B) ou immunologique (Anticorps 38C2).^{125,133} Le substrat d'intérêt peut être un principe actif ou une molécule fluorescente ou encore UV-visible. L'idée des chercheurs est que le principe de libération du substrat puisse être exploité dans l'administration sélective et efficace d'un principe actif dans une zone précise de l'organisme d'une part, et dans le diagnostic de pathologies d'autre part. Les SAI peuvent être également exploités dans la détection de certains problèmes environnementaux à travers des analyses d'écotoxicologie. Deux types de réactions régissent les cascades intramoléculaires dans les SAI, à savoir des réactions d'élimination et des réactions de cyclisation.

2.1. Agencement des systèmes auto-immolables

Un SAI est constitué le plus souvent de trois parties [Figure 23] à savoir une *gâchette*, un SAI et une molécule d'intérêt.¹²⁶ En d'autres termes, le SAI comporte dans sa structure un groupe protecteur, un système auto-immolable et un groupe partant.¹³⁴ Certaines modifications ont été apportées par divers chercheurs à cette topologie tripartite des SAI, notamment l'ajout de molécules de ciblage (l'acide folique,^{135–139} sous-unité B de la Shiga toxine STxB¹⁴⁰) et d'espaces hydrophiles^{135,136}.

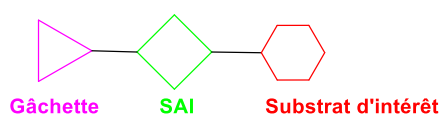


Figure 23 : Topologie classique des SAI

¹³⁰ Park, J.; Kim, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2332–2335.

¹³¹ Zhang, J.; Bao, X.; Zhou, J.; Peng, F.; Ren, H.; Dong, X.; Zhao, W. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 164–170.

¹³² Sloniec-Myszk, J.; Resch-Genger, U.; Hennig, A. J. *Phys. Chem. B* **2016**, *120* (5), 877–885.

¹³³ Wang, R. E.; Costanza, F.; Niu, Y.; Wu, H.; Hu, Y.; Hang, W.; Sun, Y.; Cai, J. J. *Control. Release* **2012**, *159* (2), 154–163.

¹³⁴ Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (26), 7492–7509.

¹³⁵ Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (7), 1357–1369.

¹³⁶ Leamon, C. P.; Vlahov, I. R.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Bloomfield, A.; Dorton, R.; Nelson, M.; Kleindl, P.; et al. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (3), 560–568.

¹³⁷ Vlahov, I. R.; Wang, Y.; Kleindl, P. J.; Leamon, C. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4558–4561.

¹³⁸ Vlahov, I. R.; Vite, G. D.; Kleindl, P. J.; Wang, Y.; Krishna, H.; Santhapuram, R.; You, F.; Howard, S. J.; Kim, S.-H.; Lee, F. F. Y.; et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4578–4581.

¹³⁹ Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D.; Hilgenbrink, A. R.; Kularatne, S. A.; Low, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350–5335.

¹⁴⁰ El Alaoui, A.; Schmidt, F.; Amessou, M.; Sarr, M.; Decaudin, D.; Florent, J. C.; Johannes, L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (34), 6469–6472.

2.2. Mécanismes de Libération des SAI

Le mécanisme d'action de libération de la molécule d'intérêt dans les SAI est à l'image de ce qui se produit lors du déclenchement d'une arme à feu comme le fusil. En appuyant sur la détente d'un fusil, la gâchette agit sur le percuteur qui frappe l'amorce, laquelle déclenche la détonation avec explosion de la charge de poudre qui propulse la charge de plomb. De même, en présence d'un stimulus donné, la *gâchette* est décrochée et par auto-immolation, la molécule d'intérêt est libérée [Figure 24].

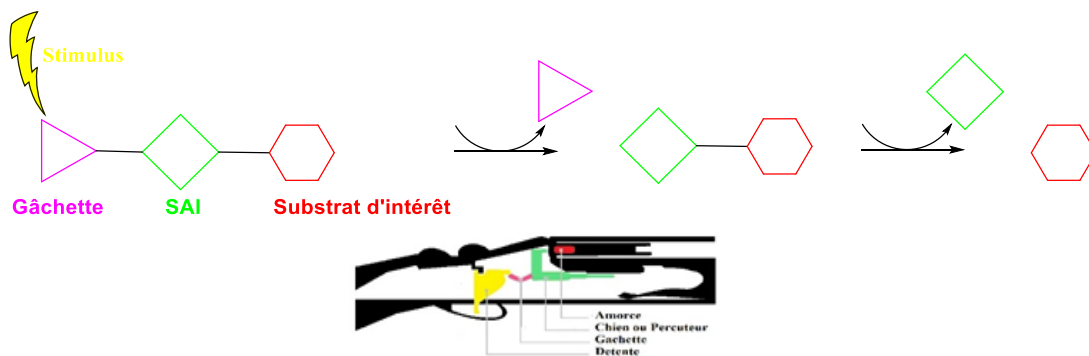


Figure 24 : Mécanisme comparatif des SAI et d'un fusil

Réactions d'élimination

Les réactions d'élimination [Figure 25] dans les SAI se traduisent par une désintégration spontanée et irréversible médiée par une «cascade électronique». Elle a lieu grâce à une augmentation de l'entropie et à la formation de produits thermodynamiquement stables, le dioxyde de carbone par exemple.

Les SAI qui procèdent d'un mécanisme d'élimination pour libérer le substrat d'intérêt contiennent un noyau aromatique substitué par un groupement électro-donneur masqué (hydroxy, amine, thiol) en *ortho* ou en *para* du substrat d'intérêt qui est, lui-même, le plus souvent en position benzylique. Les réactions d'élimination sont de type 1,4-élimination,^{125,129} 1,6-élimination avec ou sans décarboxylation couplée,^{127–131,141–145} et 1,8-élimination.^{129,133,146}

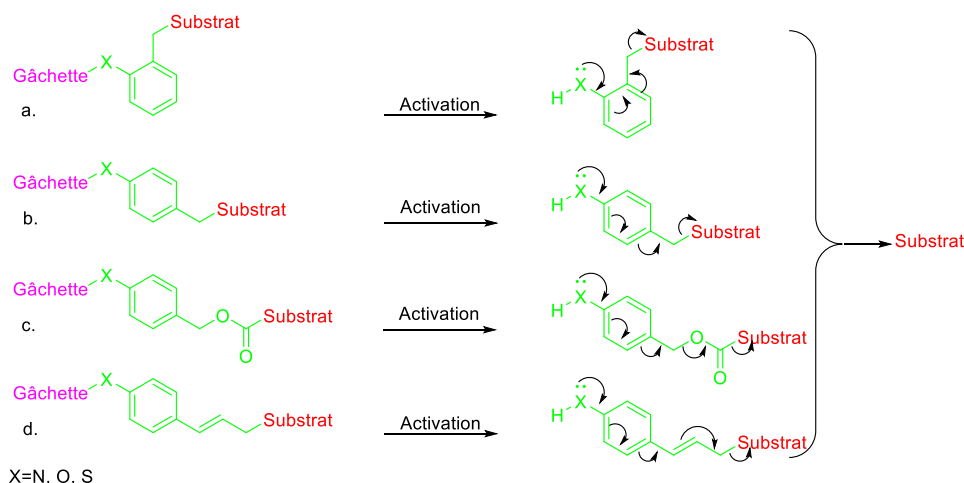


Figure 25 : Réactions d'élimination des SAI. a. 1,4-élimination ; b. 1,6-élimination ; c. 1,6-élimination avec décarboxylation ; d. 1,8-élimination

¹⁴¹ Park, C. S.; Ha, T. H.; Choi, S.-A.; Nguyen, D. N.; Noh, S.; Kwon, O. S.; Lee, C.-S.; Yoon, H. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *89*, 919–926.

¹⁴² Jiang, Y.; Wu, Q.; Chang, X. *Cells. Talanta* **2014**, *121*, 122–126.

¹⁴³ Ervin, E. M.; Adams, B. T.; Snyman, N.; Phenix, C. P.; Kariuki, J. K.; Rempel, B. P. *Int. J. Electrochem. Sci* **2014**, *9* (9), 6043–6058.

¹⁴⁴ Kolakowski, R. V.; Haelsig, K. T.; Emmerton, K. K.; Leiske, C. I.; Miyamoto, J. B.; Cochran, J. H.; Lyon, R. P.; Senter, P. D.; Jeffrey, S. C. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (28), 7948–7951.

¹⁴⁵ Tranoy-Opalinski, I.; Legigan, T.; Barat, R.; Clarhaut, J.; Thomas, M.; Renoux, B.; Papot, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 302–313.

¹⁴⁶ Weinstain, R.; Segal, E.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. *Chem. Commun* **2009**, *46*, 553–555.

Réactions de cyclisation

Les structures qui favorisent la cyclisation intramoléculaire [Figure 26] des SAI sont le plus souvent des chaînes alkyles comportant un ou plusieurs hétéroatomes ou un noyau aromatique *mono* ou *di* substitué en *ortho*. De même que les réactions d'élimination, la cyclisation intramoléculaire a lieu grâce à une augmentation de l'entropie et à la formation de produits thermodynamiquement stables, comme les hétérocycles, par exemple la 1,3-diméthylimidazolidin-2-one. Les réactions de cyclisation mises en jeu dans les SAI sont de type : 1,3-cyclisation avec ou sans décarboxylation couplée,^{147–149} 1,5-cyclisation,^{126,133,150,151} et 1,6-cyclisation^{125,134,152}.

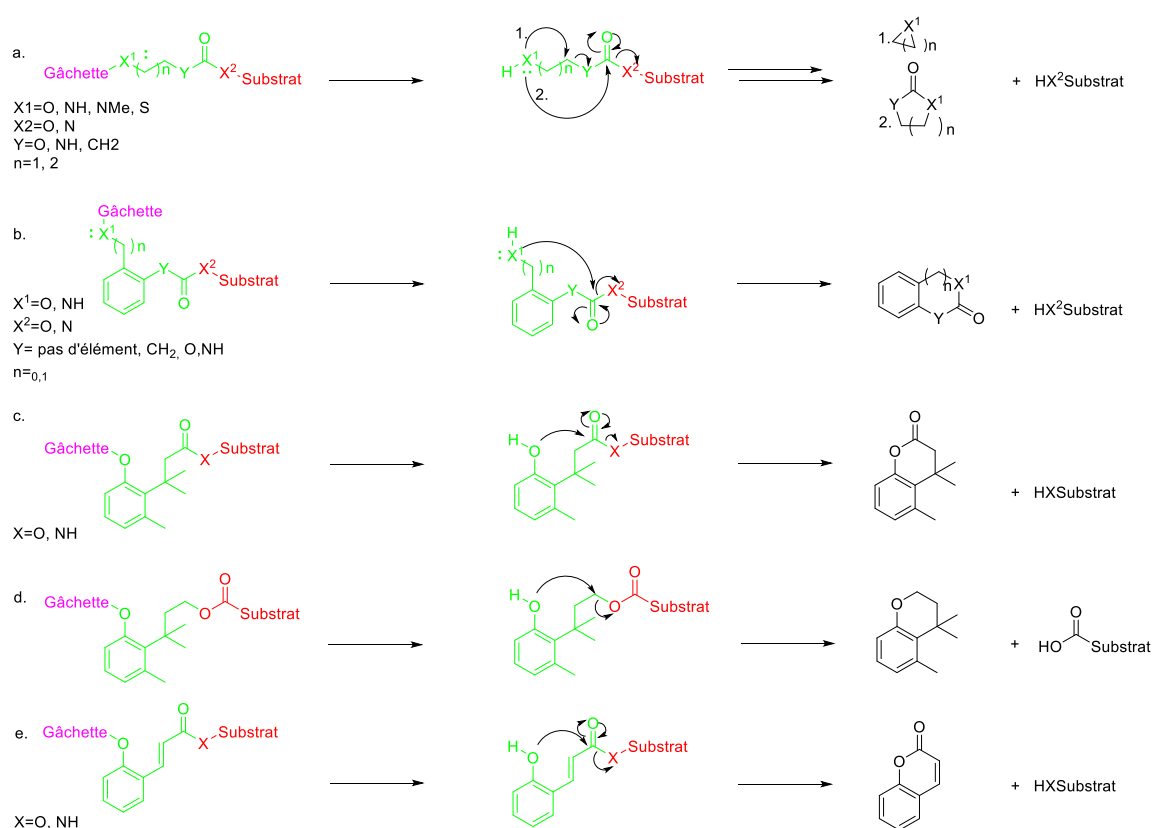


Figure 26 : Réactions de cyclisation des SAI, a. SAI avec chaîne alkyle, b-e. SAI avec un noyau aromatique *mono* ou *di*-substitué

¹⁴⁷ Batisse, E.; Dransart, E.; Sarkouh, R. A.; Brulle, L.; Bai, S.-K.; Godefroy, S.; Johannes, L.; Ed, F.; Schmidt, E. Eur. J. Med. Chem. 2015, 95, 483–491.

¹⁴⁸ Satyam, A. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2008**, 18, 3196–3199.

¹⁴⁹ Tan, X.; Lu, X.; Jia, F.; Liu, X.; Sun, Y.; Logan, J. K.; Zhang, K. J. Am. Chem. Soc. **2016**, 138, 10834–10837.

¹⁵⁰ DeWit, M. a; Gillies, E. R. Org. Biomol. Chem. **2011**, 9 (6), 1846–1854.

¹⁵¹ Kock, A.; Zuwala, K.; Smith, A. A. A.; Ruiz-Sanchis, P.; Wohl, B. M.; Tolstrup, M.; Zelikin, A. N. Chem. Commun. **2014**, 50 (50), 14498–14500.

¹⁵² Blencowe, C. A.; Russell, A. T.; Greco, F.; Hayes, W.; Thornthwaite, D. W. Polym. Chem. **2011**, 2 (4), 773–790.

Dendrimères, polymères linéaires et polymères multi-branches

Dans certains SAI, sont retrouvées des réactions couplées.^{125,145,147} Il s'agit des réactions d'élimination associées entre elles, des réactions d'élimination et de cyclisation associées ou non à une décarboxylation. Cette technique de couplage des SAI est surtout employée dans les polymères et les dendrimères auto-immolables [Figure 27]. La structure de ces polymères et dendrimères comporte un point focal, l'enchaînement de SAI et des groupes fonctionnels. Ce sont des systèmes qui permettent une amplification du signal ou une augmentation de la quantité d'une molécule thérapeutique. Le point focal sera le point de départ du désassemblage. Les groupes fonctionnels correspondent à ce qui a été appelé précédemment substrat d'intérêt. Dans ces SAI, la fragmentation a lieu à la suite de l'activation par un stimulus avec un désassemblage "du sommet à la base" de l'anglais "*head to tail*". Dans ces polymères, la désintégration des polymères suite à l'activation par un stimulus donné est gouvernée par des groupements caractéristiques tels que les sulfones, les phthalaldéhydes, les glyoxylates.¹²⁵

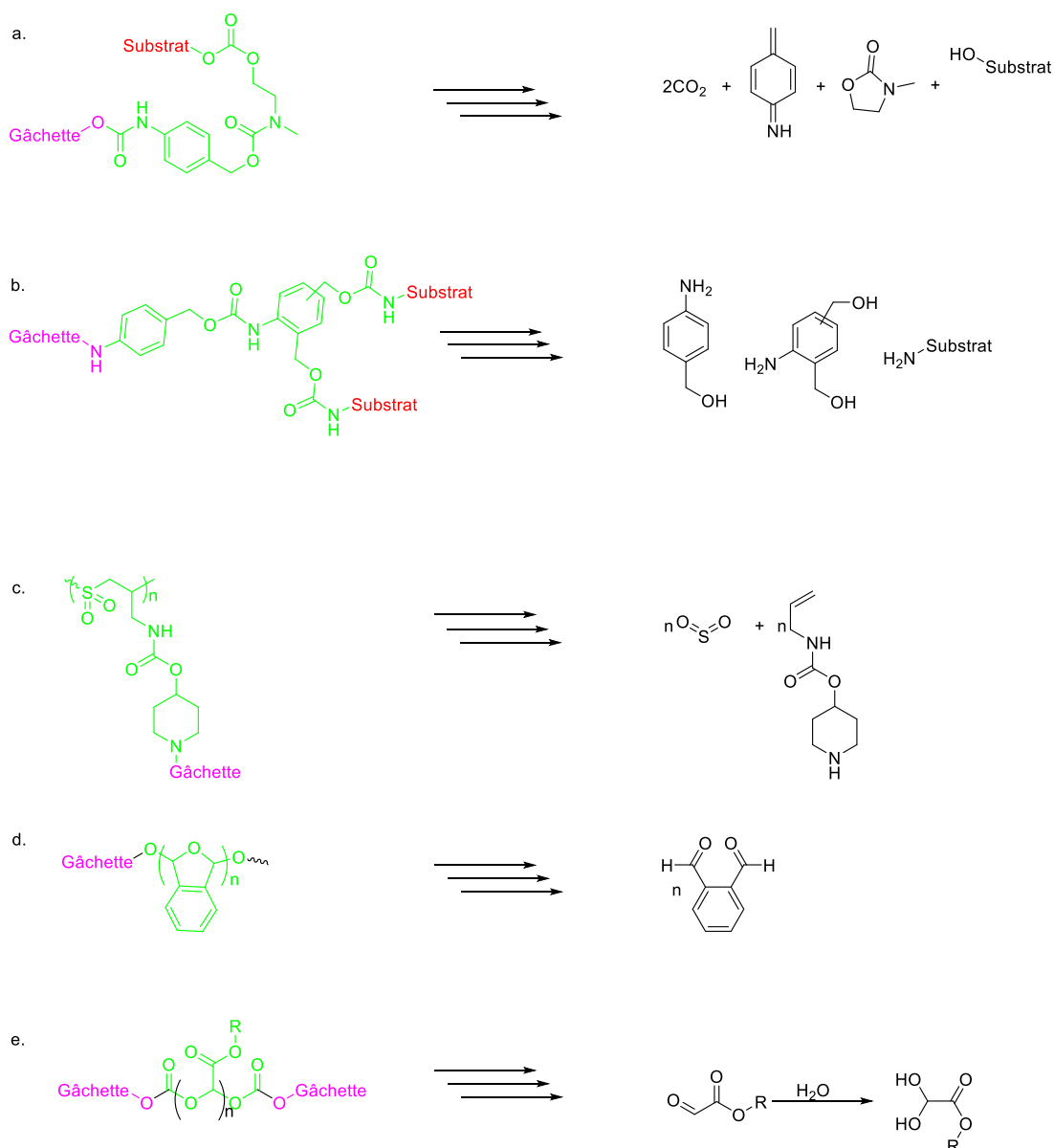


Figure 27 : Systèmes auto-immolables en chaines. a. Association Elimination-cyclisation, b. Association Elimination entre elles, c. Polymère avec sulfone, d. Polymère avec phthalaldéhydes, e. Polymères avec glyoxylates

2.3. Aspect cinétique des SAI

De façon générale, l'étude cinétique chimique consiste à suivre l'évolution des constituants d'une réaction chimique dans le temps, et d'en déterminer la vitesse d'apparition ou de disparition. Pour les SAI, l'étude cinétique concerne non seulement l'étude de la libération du substrat d'intérêt dans le temps mais aussi dans l'espace, surtout quand il s'agit de SAI libérant un principe actif dans une zone précise de l'organisme.¹³⁴

D'après la théorie des collisions, la désintégration d'un système auto-immolable depuis l'activation par le stimulus adéquat jusqu'à la libération du substrat d'intérêt est une réaction

dite complexe. En effet il y a deux ou trois étapes jusqu'à la libération du substrat d'intérêt à savoir l'activation par le stimulus, l'auto-immolation elle-même qui entraîne la libération du substrat d'intérêt avec ou sans passage par un intermédiaire stabilisé [Figure 28].¹³⁴ Le type de stimulus utilisé influe sur la vitesse globale de la réaction. Ainsi, la vitesse de libération du substrat d'intérêt sous l'effet d'un stimulus photochimique est plus rapide que celles déclenchées par les stimuli chimique et enzymatique ; celle du stimulus enzymatique étant la plus lente. La vitesse de libération du substrat d'intérêt est également fonction du type de mécanisme mis en jeu ; les réactions d'élimination étant plus rapides que les réactions de cyclisation.

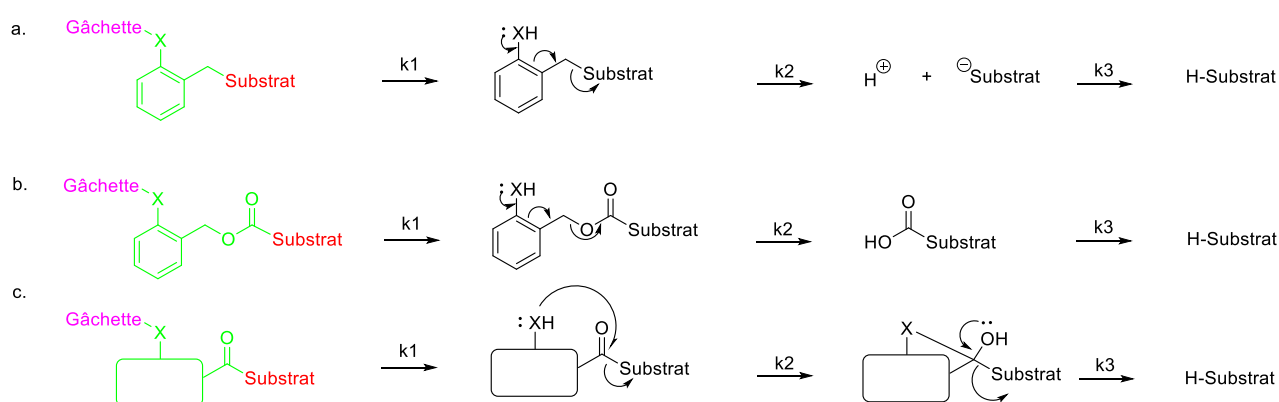


Figure 28 : Cinétique des SAI : a) Auto-immolation en 2 étapes, b) Auto-immolation en 3 étapes (d'après [134])

3. Domaines d'application des SAI

3.1. De la détection au diagnostic clinique

Les SAI sont utilisés dans la détection et la quantification de certaines molécules biologiques dans un but de diagnostic de diverses pathologies, telles que les cancers, les maladies neurodégénératives, les infections bactériennes, etc. Ces molécules peuvent être regroupées en deux catégories à savoir les petites molécules et les macromolécules. Certains auteurs ont testé leurs molécules *in vitro* et même parfois *in vivo* sur des animaux de laboratoire.

Petites molécules endogènes

Des sondes fluorescentes, comportant des SAI capables de détecter des petites molécules endogènes comme le sulfure d'hydrogène (H₂S) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou de petites molécules exogènes comme les ions fluorures ont été décrites.^{127,141,153}

-Sulfure d'hydrogène (H₂S)

Le sulfure d'hydrogène est un gaz endogène, un gazotransmetteur comme le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO). Il est considéré comme un messenger biologique important. Cette petite molécule neutre a montré une action protectrice sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins, une action antivirale et anti-inflammatoire ainsi qu'une action vasodilatatrice sur des vaisseaux sanguins isolés.¹⁵⁴ Des taux élevés de sulfure d'hydrogène ont été retrouvés chez des patients souffrant de sepsis tandis que des taux bas ont été retrouvés chez des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. Au vue de ce qui précède, la détermination de la concentration de sulfure d'hydrogène permettra de poser un diagnostic.

Chul Soon *et al.*¹⁴¹ ont développé une sonde à base d'azoture absorbant dans le proche infrarouge. Cette sonde tri-substituée et dérivée de l'hydroxanthène possède en position 7 un azoture aromatique, réduit en fonction amine par le sulfure d'hydrogène. Cette fonction amine libre, point de départ d'une auto-immolation, conduit à la libération d'un composé fluorescent alors que la sonde est faiblement ou non fluorescente à l'instant initial [Figure 29].

Les études de sensibilité, de sélectivité et des études cinétiques de cette sonde montrent qu'elle pourrait être utilisée efficacement pour la détection et la quantification du sulfure d'hydrogène. Les études *in vivo* sur des cellules vivantes RAW264.7 montrent que la sonde a une bonne perméabilité membranaire et il y a bien émission de fluorescence en fonction de la concentration de sulfure d'hydrogène sodique (NaHS). Les études *in vivo* sur des rats montrent également une émission de fluorescence qui augmente avec la quantité additionnelle de sulfure d'hydrogène sodique et avec le temps. Au vu des résultats des tests

¹⁵³ Hisamatsu, S.; Suzuki, S.; Kohmoto, S.; Kishikawa, K.; Yamamoto, Y.; Motokawa, R.; Yaita, T. *Tetrahedron* **2017**, 73 (27–28), 3993–3998.

¹⁵⁴ Ivanciuc, T.; Sbrana, E.; Ansar, M.; Bazhanov, N.; Szabo, C.; Casola, A.; Garofalo, R. P. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2016**, 55 (5), 684–696.

in vitro et *in vivo* la sonde de Chul Soon *et al.* a un excellent profil pour le dosage de sulfure d'hydrogène dans des échantillons biologiques comme le sang et les homogénats tissulaires.

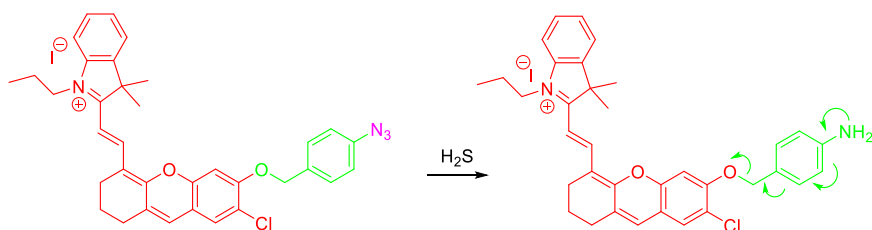


Figure 29 : Azoture profluorescent et mécanisme de libération

Yin Jiang *et al.* font partie des premiers chercheurs à développer une sonde fluorescente sélective dont le SAI comporte un groupement azoture sensible au sulfure d'hydrogène. Dans cette sonde, l'émission de fluorescence est basée sur le transfert de proton intramolécule dans l'état excité de l'anglais *Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT)*.¹⁴² La sonde contient un chromophore *ESIPT*, 2-(2'-hydroxyphenyl)-benzothiazole (HBT) [Figure 30].

En présence de sulfure d'hydrogène, le SAI de la sonde libère le chromophore HBT par un mécanisme de 1,6-élimination. Les études *in vitro* sur des cellules HeLa montrent que la fluorescence émise augmente avec la quantité de NaHS. Les cellules contenant uniquement la sonde émettent bien moins de fluorescence que celles contenant la sonde et du NaHS. Cette sonde permettrait une détection sélective de sulfure d'hydrogène avec une haute sensibilité.

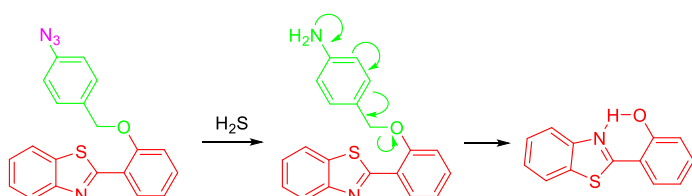


Figure 30 : Azoture prochromophore ESIPT et mécanisme de libération

- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est le principal constituant des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Il est impliqué dans plusieurs processus physiologiques comme la signalisation cellulaire, la production d'énergie, la croissance cellulaire, le métabolisme cellulaire, le vieillissement cellulaire. Il est aussi impliqué dans des processus pathologiques tels que les tumeurs malignes, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer et les syndromes parkinsoniens.¹²⁷

Wenxiao Wu *et al.* ont synthétisé et évalué, *in vitro* et *in vivo*, une sonde bioluminescente pour la détection par imagerie du peroxyde d'hydrogène. Cette sonde comporte trois parties : un acide boronique aromatique sensible au peroxyde d'hydrogène, un SAI et un fragment aminoluciférine bioluminescent [Figure 31].¹²⁷ Le mécanisme qui permet d'observer cette bioluminescence s'effectue en deux étapes, une première étape qui est une oxydation de l'acide boronique par le peroxyde d'hydrogène et une deuxième étape qui est l'activation de l'aminoluciférine par la luciférase avec émission de luminescence. Les analyses *in vitro* montrent que parmi différentes espèces réactives de l'oxygène, la sonde est sélective du peroxyde d'hydrogène et très sensible à celui-ci. Les études de sensibilité *in vitro* montrent une relation linéaire entre l'augmentation de la concentration de H₂O₂ et l'intensité de la fluorescence émise. Les études *in cellulo* sur cellules vivantes et *in vivo* sur des modèles de souris porteuses d'une tumeur, révèlent que la sonde est un bon candidat pour l'imagerie en temps réel dans la détection des concentrations de H₂O₂. Toutefois l'exploration d'une bioluminescence observée en une seule étape serait avantageuse.

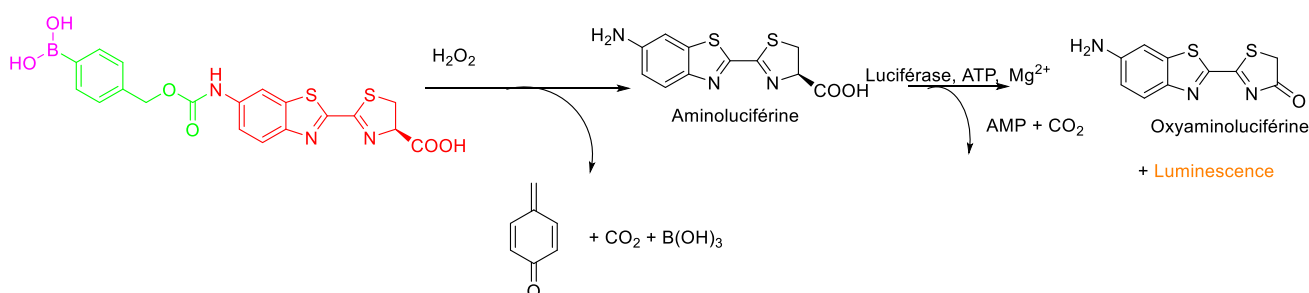


Figure 31 : Sonde probioluminescent et mécanisme de libération

Eran Sella *et al.* ont décrit une sonde basée sur des réactions de désassemblage en chaîne pour la détection de peroxyde d'hydrogène [Figure 32].¹²⁸ Le mécanisme de désintégration procède par 1,6-élimination qui intervient après le décrochage de l'acide boronique sous l'action du peroxyde d'hydrogène. La 1,6-élimination est suivie d'une décarboxylation et d'un désassemblage par triple élimination conduisant à la libération d'une *para*-nitroaniline et de deux unités de cholines. La *para*-nitroaniline émet un signal chromogène quantifiable. La réaction de désassemblage en chaîne est très intéressante en raison de l'amplification du signal, mais présente l'inconvénient que le signal ne soit pas proportionnel à la quantité de peroxyde d'hydrogène. En effet cette méthode produit un bruit de fond dû au peroxyde d'hydrogène supplémentaire provenant de l'oxydation des deux unités de cholines. Elle est certes une bonne méthode pour la détection mais il n'en est pas de même pour la

quantification. Or c'est justement la quantification du peroxyde d'hydrogène qui est intéressante dans un contexte de diagnostic de pathologies.

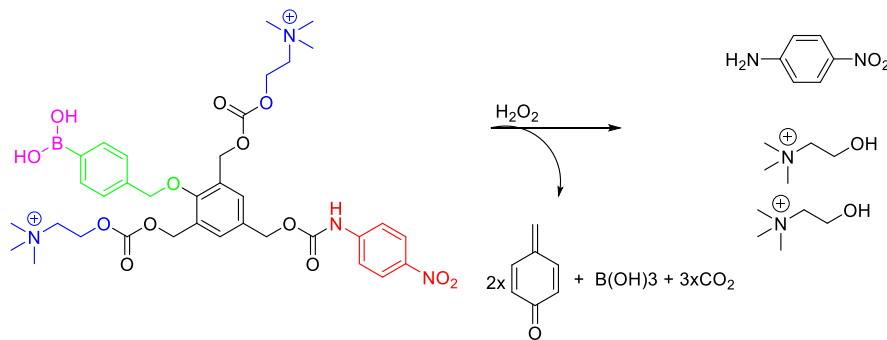


Figure 32: Sonde basée sur des réactions de désassemblage en chaîne

La plupart des molécules rapportées permettent la détection de petites molécules et non la détermination avec précision de leurs concentrations. Le challenge est que la concentration des petites molécules endogènes soit déterminée avec précision et que cela permette de définir s'il s'agit d'un processus pathologique ou physiologique. En cas de processus pathologique, la catégorisation par intervalles de la concentration de la molécule endogène permettra donc de classer les pathologies.

Macromolécules

La détection de macromolécules telles que la phosphatase alcaline (PAL), la β -galactosidase, le glutathion réduit (GSH), le Cytochrome P450, la furine constitue une méthode de diagnostic de diverses pathologies. La penicilline G-amidase (PGA), quant à elle, a été utilisée comme modèle enzymatique *in vitro*.

- β -galactosidase

La β -galactosidase, comme son nom l'indique est un enzyme qui hydrolyse les liaisons osidiques dans lesquelles il y a en position β -terminale un β -galactoside (gangliosides, et autres β -galactosides conjugués). Goberdhan et *al.* ont montré que dans les cellules sénescents une activité β -galactosidase est détectable à pH 6, il s'agit de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal).¹⁵⁵ Cette activité est actuellement

¹⁵⁵ Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1995**, 92 (20), 9363–9367.

considérée comme un marqueur de sénescence.^{155–157} Dans les traitements chimiothérapeutiques anticancéreux, un évènement fréquent est la chimiorésistance, elle est d'office primaire avant toute chimiothérapie ou secondaire.¹⁵⁸ Elle constitue un obstacle majeur à la guérison du patient, l'une des raisons de la chimiorésistance est l'hétérogénéité intratumorale.^{158,159} Il s'avère que les cellules cancéreuses, de façon générale (ou tout au moins certaines d'entre elles), possèdent la capacité de vieillir.¹⁶⁰ Cela est très intéressant car une alternative à la chimiorésistance peut être l'induction de la sénescence : d'où l'émergence de la thérapie par induction de sénescence. Dans cette façon de traiter le cancer, il s'agit d'administrer au patient des agents capables d'induire la sénescence.¹⁶⁰ C'est dans le but de contribuer à la recherche et au développement de telles molécules que Filho et *al.* ont synthétisé 4 profluorophores capables de détecter l'activité SA- β gal. L'objectif des auteurs est de mettre à disposition des chercheurs une méthode qui permette le criblage à haut débit de molécules inductrices de sénescence. Parmi les quatre molécules, une s'est révélée efficace. Il s'agit de la molécule qu'ils ont nommé β gal-1. Structuellement elle est tripartite avec une gâchette constituée de la β -D-galactopyranose reliée par la fonction alcool au SAI le parahydroxybenzylcarbamate. Au SAI est relié par une liaison amide le fluorophore (E)-2-(4-Methoxystyryl)benzo[d]thiazol-6-amine [Figure 33]. Les quatre profluorophores ont été traités en conditions physiologiques (tampon phosphate ; pH 7,4 ; 37 °C) avec la β gal afin de mesurer l'émission de fluorescence induite par la libération des fluorophores de chacun. L'émission de fluorescence induite par la libération du fluorophore de β gal-1 a été largement plus intense que les autres (200 fois). De plus lorsque le pH varie, β gal-1 reste stable même au bout de 96h. Des analyses *in cellulo* montrent qu'il n'y a pas d'autres enzymes susceptibles d'hydrolyser β gal-1, preuve de la sélectivité de l'enzyme β gal pour β gal-1. Dans des modèles cancéreux de sénescence, β -Gal-1 est capable de détecter et de suivre l'activité SA- β gal en temps réel sur plusieurs heures. Comparativement aux méthodes de la visualisation de SA- β gal existantes, β gal-1 est plus avantageux car il ne nécessite aucun traitement préalable avant la visualisation de coloration, il est compatible avec les cellules vivantes et sa limite de détection est basse.

¹⁵⁶ Filho, M. S.; Dao, P.; Gesson, M.; Martin, A. R.; Benhida, R. *Analyst* **2018**, 143, 2680–2688.

¹⁵⁷ Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J. D.; Campisi, J.; Toussaint, O. *Nat. Protoc.* **2009**, 4 (12), 1798–1806.

¹⁵⁸ Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer* 2013, 13 (10), 714–726.

¹⁵⁹ Roux, J.; Gouze, J. L.; Hofman, P. *Medecine/Sciences* **2015**, 31 (1), 28–31.

¹⁶⁰ Mikuła-Pietrasik, J.; Niklas, A.; Uruski, P.; Tykarski, A.; Książek, K. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**.

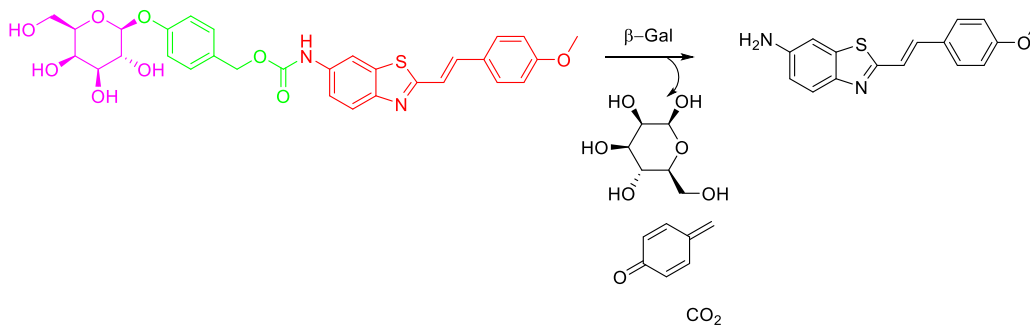


Figure 33 : Profluorophore β gal-1 et mécanisme de libération

- La phosphatase alcaline

Park *et al.* ont conçu une sonde fluorigène tripartite comprenant une structure pro-fluorescente, un SAI et une gâchette sensible à la phosphatase alcaline [Figure 34]. La phosphatase alcaline est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des phosphoesters. La concentration de cette enzyme est élevée dans les os, l'intestin, le placenta, les reins et le foie.¹⁶¹ L'activité PAL est utilisée de manière routinière pour le diagnostic de certaines pathologies hépatobiliaires et osseuses.¹⁶¹ Dans cette sonde, la présence d'un SAI augmente son affinité pour la phosphatase alcaline.¹³⁰ En présence de la sonde, la PAL catalyse l'hydrolyse de la liaison P-O. Cette étape est immédiatement suivie d'une 1,6-élimination du SAI et d'une cyclisation intramoléculaire conduisant à l'iminocoumarine de benzothiazole, une molécule fortement fluorescente. La sonde permet non seulement de détecter la PAL mais aussi de quantifier son activité. Elle permet aussi de faire le criblage d'inhibiteurs en vue de les utiliser comme agents thérapeutiques.¹³⁰ Le fragment phosphate étant une base, l'une des faiblesses de cette sonde pourrait être la présence de réaction acide/base en milieu acide. Il est donc nécessaire que des études de stabilité de ce fragment phosphate en fonction du pH soient réalisées.

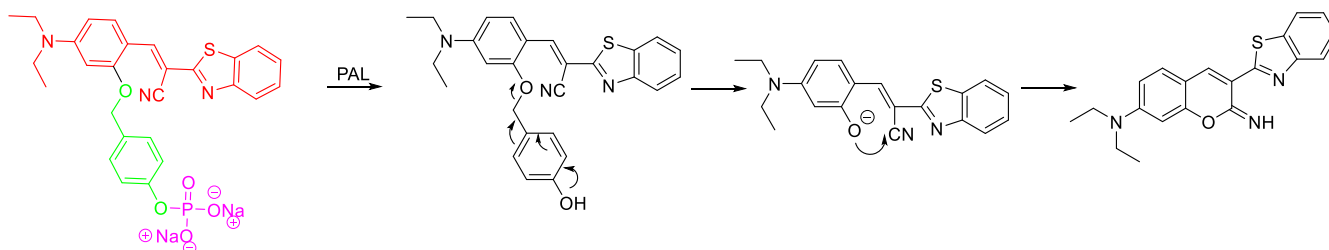


Figure 34 : Sonde fluorogénique PAL-sensible et mécanisme de libération

¹⁶¹ Sharma, U.; Deeksha, •; Prasad, R. Ind J Clin Biochem **2014**, 29, 269–278.

- Le glutathion réduit

Zhang *et al.* ont développé une sonde basée sur le principe du BODIPY (Bore-dipyrométhène). Cette sonde comprend un fragment BODIPY lié à un fragment *para*-dinitrophenoxy-benzyl de pyridinium qui contient le SAI [Figure 35].¹³¹ La sonde détecte sélectivement le glutathion réduit qui est un tripeptide connu comme biomarqueur du stress oxydant.¹⁶² Les pathologies comme le SIDA, le cancer, les hépatopathies et les maladies neurodégénératives présentent des taux anormaux de glutathion réduit.¹⁶³ En présence de la sonde, le glutathion réduit agit selon une réaction de substitution nucléophile aromatique sur le fragment dinitrophenyl, ce qui conduit à une désintégration par cascade électronique du SAI suivie de la libération du colorant BODIPY caractérisé par une forte fluorescence.¹³¹ Du fait d'une faible toxicité cette sonde permet notamment la détection de glutathion dans des cellules vivantes.

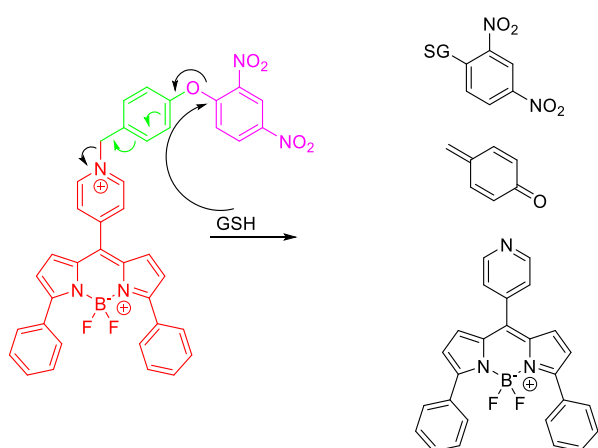


Figure 35 : Sonde fluorogénique BODIPY et mécanisme de libération

Sur les mêmes principes de BODIPY, et d'auto-immolation, les mêmes auteurs ont publié en 2017 leurs travaux sur une sonde permettant la détection simultanée de sulfure d'hydrogène mais aussi de dérivés organo-soufrés comme le glutathion, la cystéine et l'homocystéine.¹⁶⁴

¹⁶² Armstrong, J. S.; Steinauer, K. K.; Hornung, B.; Irish, J. M.; Lecane, P.; Birrell, G. W.; Peehl, D. M.; Knox, S. J. **2002**, 9 (3), 252–263.

¹⁶³ Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, 57, 134–144.

¹⁶⁴ Zhang, J.; Ji, X.; Zhou, J.; Chen, Z.; Dong, X.; Zhao, W. *Chem.* **2018**, 257, 1076–1082.

- Pénicilline G-Amidase

Dans le but de contribuer à l'avancement de la recherche en imagerie cancéreuse, Sloniec-Miszk *et al.* ont développé un concept de sondes bio-activables comportant des SAI et qui sont capables de former des agrégats H ou des agrégats J chiraux. Aussi ont-ils choisi la Pénicilline G-Amidase (PGA) comme modèle d'enzyme pour tester les sondes.^{132,165} En ce qui concerne la première série de sondes qu'ils ont publiée, le principe repose sur la formation intramoléculaire d'agrégats H entre deux molécules fluorophores identiques et leur disposition dans la structure de la sonde est telle qu'elles sont côte à côte. Ainsi il y a inhibition de fluorescence en présence des agrégats, il s'agit de « quenching » tandis que la fluorescence est émise après clivage enzymatique avec désintégration de la molécule et donc disparition des agrégats H et libération des fluorophores.

La première série de sondes synthétisées comporte structurellement un site de clivage enzymatique, un SAI en pince comportant à ses deux extrémités deux fluorophores formant des agrégats-H [Figure 36]. Ces sondes absorbent et fluorescent dans le proche infrarouge. Les auteurs, en faisant varier le fluorophore et la position des substituants sur le SAI, ont remarqué que les propriétés photophysiques des sondes sont influencées aussi bien par le type de fluorophore que par la position des substituants sur le SAI. Ils ont ainsi mis au point un concept permettant la détection d'enzymes. Toutefois l'efficacité d'émission de fluorescence des molécules n'est pas optimale. En effet la valeur des rendements quantiques est largement inférieure à 0,8 et n'est donc pas satisfaisante.¹⁶⁶

Sur la même topologie que les sondes formant des agrégats H, les mêmes auteurs ont synthétisé et analysé des sondes contenant des SAI et associant la formation d'agrégats J chiraux [Figure 36, Figure 37]. Des résultats complexes ont été observés à l'issue de l'étude. Ainsi pour deux sondes sélectionnées F2S et F4S, la première montre une augmentation de la fluorescence après hydrolyse enzymatique tandis que la seconde ne montre aucune augmentation de fluorescence. Après plusieurs analyses, les auteurs concluent que l'augmentation de fluorescence dans F2S est due à la formation d'agrégats J entre les fluorophores et la protéine PGA. L'absence d'augmentation de fluorescence dans F4S

¹⁶⁵ Sloniec, J.; Resch-Genger, U.; Hennig, A. J. *Phys. Chem. B* **2013**, 117 (46), 14336–14344.

¹⁶⁶ Locquet, N. *Les Principes de La Spectroscopie de Fluorescence : De La Théorie à La Pratique.*

s'expliquerait par l'inhibition de PGA par des sous-produits d'hydrolyse enzymatique de cette sonde F4S avec une persistance d'agrégats H. Les deux sondes F2S et F4S diffèrent seulement par deux groupements sulfonates absents chez la première et présents chez la seconde. Il serait donc intéressant d'élargir l'étude à d'autres fluorophores en faisant varier les substituants sur les fluorophores pour établir la source de la formation d'agrégats J. Toutefois il semble que la formation d'agrégats J dépende des substituants présents sur le fluorophore.

La méthode proposée par Jagoda *et al.* pour la détection d'enzymes utilise efficacement les SAI en mettant à jour des techniques d'exploitation de la spectroscopie de fluorescence dans un but de diagnostic.

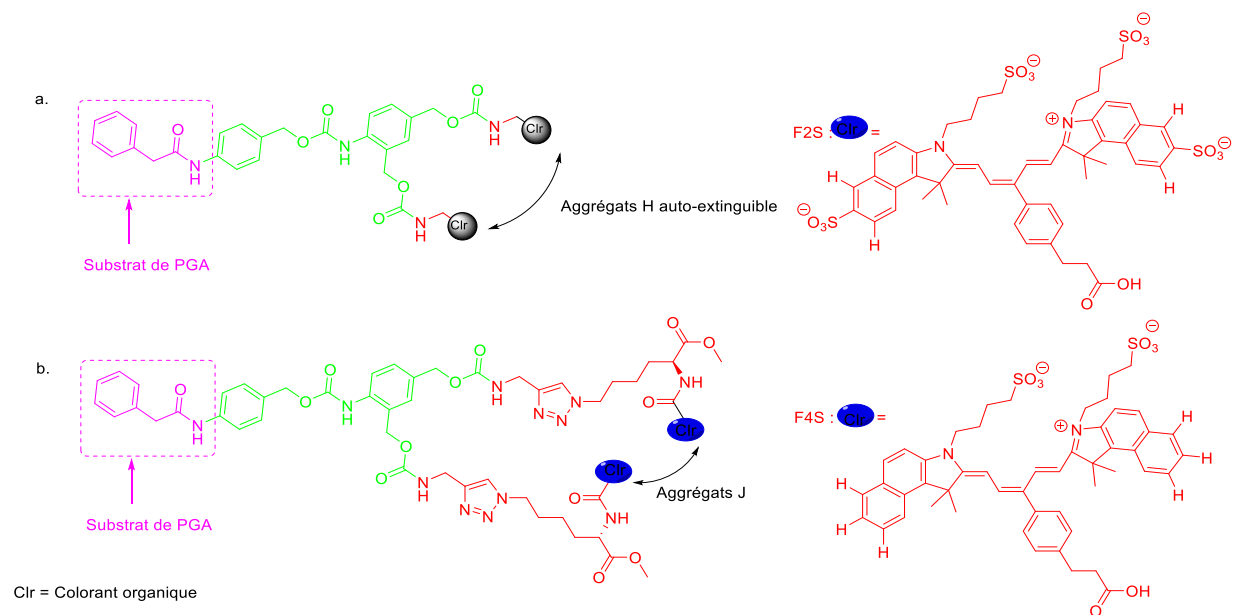


Figure 36 : a. Sondes formant des agrégats H b. Sondes formant des agrégats J (d'après [9 et 36])

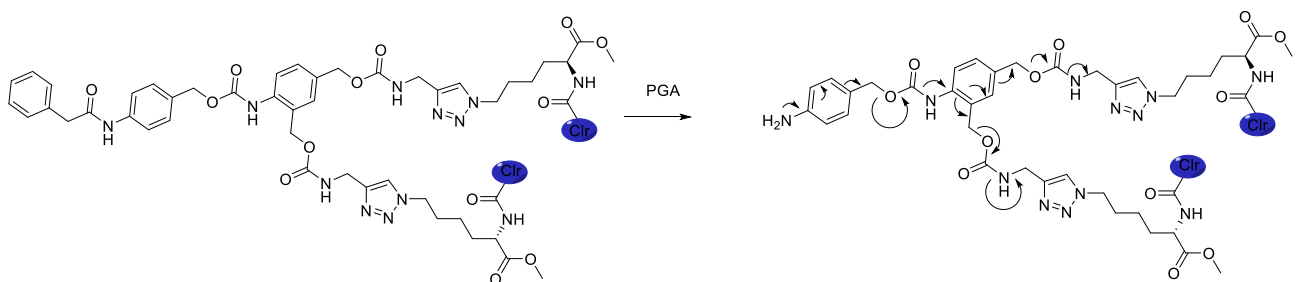


Figure 37 : Mécanisme de libération

- Glycosidases

Les travaux d'Ervin *et al.* ont permis de développer une sonde électrochimique contenant un SAI sensible à la glycosidase.¹⁴³ La détection des glycosidases est intéressante

dans la mesure où ces enzymes jouent des rôles importants dans les processus industriels comme le développement et le raffinage des biocarburants. Elles sont également impliquées dans des pathologies comme le SIDA, les cancers, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Gauchers. Les travaux d'Ervin *et al.* ont également permis de constater que l'incorporation d'un SAI dans la sonde électrochimique, rend l'enzyme plus affine à la gâchette [Figure 38]. Ces auteurs ont choisi des linkers de type alcool 3-nitro-4-hydroxybenzylique comme SAI. Ce SAI a été placé entre le fragment sucre et le noyau aromatique fixé à une électrode. Ce choix s'explique par la facilité de synthèse du SAI et par le fait que le noyau aromatique du SAI ne perturbe pas l'activité enzymatique des glycosidases. Le développement de cette sonde constitue une avancée significative dans le long processus de conception de sonde électrochimique sensible à l'activité des glycosidases. Cependant cette sonde électrochimique n'est pas spécifique aux glycosidases. Ainsi, l'emploi d'un acide fort comme l'acide chlorhydrique hydrolyse la liaison acétal. Aussi est-il important de mener des études complémentaires de sensibilité et de spécificité de cette sonde.

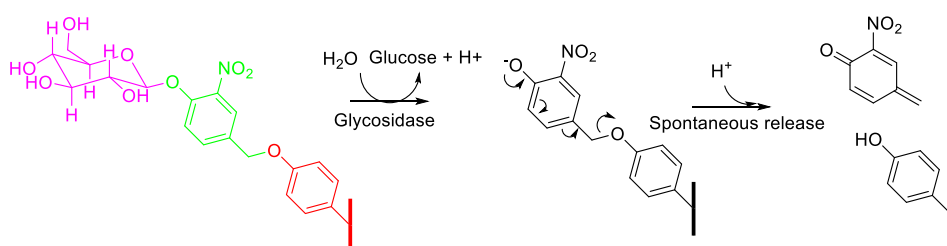


Figure 38 : Sonde électrochimique sensible à la glycosidase et mécanisme de libération

- Cytochrome P450J2

Les cytochromes P450 sont des hème-mono-oxygénases, une super famille d'enzymes hépatiques jouant un rôle essentiel dans le métabolisme oxydatif de diverses molécules endogènes et exogènes dont les médicaments. Ils sont classés en familles et en sous-familles.^{167,168} CYP2J2 est un de ces enzymes, il métabolise les acides gras polyinsaturés en acide époxyeicosatriénoïque (EET). Cet acide EET stimule la progression cellulaire. Des taux élevés de CYP2J2 sont retrouvés dans plusieurs cancers solides (œsophage, sein, foie, poumons...) corrélés à des taux élevés de l'acide EET dans les liquides biologiques des patients

¹⁶⁷ Gonzalez, F. J.; Nebert, D. W. Trends Genet. **1990**, 6 (C), 182–186.

¹⁶⁸ Jarrar, Y. B.; Lee, S.-J. Int. J. Mol. Sci. **2019**, 20 (17), 4274.

atteints de ces mêmes cancers.^{169–171} La surexpression de CYP2J2 stimule la prolifération, la survie et la migration cellulaire et l'acide EET stimule l'angiogenèse dans le tissu tumoral primaire, ainsi que l'expansion des métastases.^{169,172–174} Il apparaît que CYP2J2 est un excellent biomarqueur de cancer. Ainsi Ning J. et *al.* ont synthétisé une sonde fluorescente pour la détection en temps réel de CYP2J2.¹⁷⁵ L'utilisation de SAI, le para-hydroxybenzyle, a permis aux auteurs d'optimiser la disposition spatiale du groupement O-methyl dans le site catalytique du CYP2J2 pour une meilleure spécificité enzymatique de celui-ci. Des analyses effectuées montrent que l'auto-immolation intervient après O-déméthylation par le CYP2J2, il s'ensuit une émission de fluorescence induite par la libération de la molécule fluorescente, l'iodure de (E)-2-(2-(6-hydroxy-2, 3- dihydro-1H-xanthen-4-yl)vinyl)-3,3-diméthyl-1-propyl-3H-indol-1-ium (HXPI) [Figure 39]. Suivant des études de sensibilité et de sélectivités, *in vitro* et *in vivo*, il apparaît que la sonde BnXPI de Ning J. et al, est un excellent outil de diagnostic de cancers sur-exprimant CYP2J2. Cette sonde est également un excellent outil pour une meilleure compréhension du rôle de CYP2J2 dans les cancers et pour la recherche et le développement de nouveaux traitements.

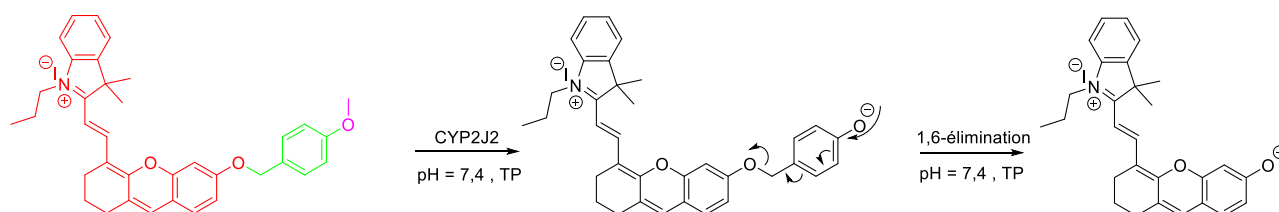


Figure 39 : Sonde BnXPI et mécanisme de libération

¹⁶⁹ Wang, D.; DuBois, R. N. *Journal of Clinical Investigation*. January 3, **2012**, pp 19–22.

¹⁷⁰ Jiang, J. G.; Chen, C. L.; Card, J. W.; Yang, S.; Chen, J. X.; Fu, X. N.; Ning, Y. G.; Xiao, X.; Zeldin, D. C.; Wang, D. W. *Cancer Res*. **2005**, 65 (11), 4707–4715.

¹⁷¹ Chen, C.; Wei, X.; Rao, X.; Wu, J.; Yang, S.; Chen, F.; Ma, D.; Zhou, J.; Dackor, R. T.; Zeldin, D. C.; et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, 336 (2), 344–355.

¹⁷² Jiang, J. G.; Ning, Y. G.; Chen, C.; Ma, D.; Liu, Z. J.; Yang, S.; Zhou, J.; Xiao, X.; Zhang, X. A.; Edin, M. L.; et al. *Cancer Res*. **2007**, 67 (14), 6665–6674.

¹⁷³ Panigrahy, D.; Edin, M. L.; Lee, C. R.; Huang, S.; Bielenberg, D. R.; Butterfield, C. E.; Barnés, C. M.; Mammoto, A.; Mammoto, T.; Luria, A.; et al. *J. Clin. Invest.* **2012**, 122 (1), 178–191.

¹⁷⁴ Karkhanis, A.; Hong, Y.; Chan, E. C. Y. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc. July 1, **2017**, pp 12–21.

¹⁷⁵ Ning, J.; Liu, T.; Dong, P.; Wang, W.; Ge, G.; Wang, B.; Yu, Z.; Shi, L.; Tian, X.; Huo, X.; et al. *J Am Chem Soc* **2018**, No. 141, 1126–1134.

- Furine proprotéine convertase

La furine est une protéase qui appartient à une famille ancienne de proprotéines convertases dites proprotéines convertases de type subtilisine/kexine (PCSK).¹⁷⁶ Elle active plus de 150 proprotéines d'origines diverses (mammifère, virale, bactérienne). La surexpression de cette protéase est associée non seulement à divers cancers (peau, colon, poumons, tête, cou, cerveau...) mais aussi à leur agressivité, ce qui en fait un excellent biomarqueur.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Li K. et *al.* ont ainsi développé une sonde pour la détection *in situ* de l'activité de la furine.¹⁸⁰ Pour obtenir cette sonde les auteurs ont utilisé un SAI, la piperidin-2-ylmethylamine, pour joindre un substrat peptidique spécifique de la furine à un fluorophore 6-chloro-2-(2-hydroxyphenyl) quinazolin-4(3H)-one (Cl-HPQ) [Figure 40]. Le SAI apporte à la sonde, outre une stabilité en absence de furine, une baisse de l'encombre stérique lors de l'interaction de la furine avec son substrat. Dans un tampon phosphate la sonde est stable jusqu'à 96h. Après auto-immolation en présence de furine, l'émission de fluorescence est basée sur le transfert de proton intramoléculaire dans l'état excité (ESIPT) avec une agrégation du fluorophore. En effet au bout de 4h à 37°C dans un lysat cellulaire en présence de furine, la sonde s'auto-désintègre et émet une fluorescence atteignant 62 fois la fluorescence au temps initial tandis qu'en l'absence de furine la sonde reste stable.

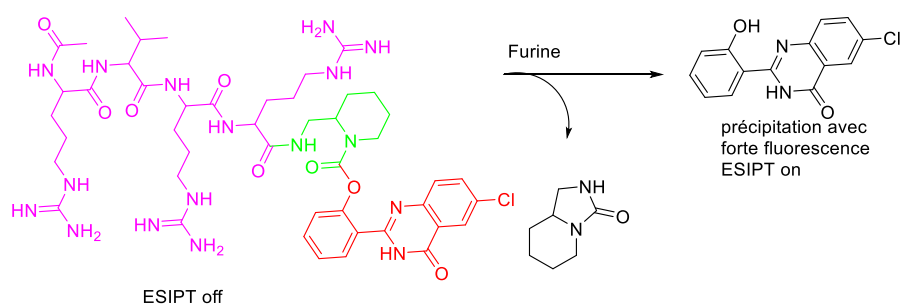


Figure 40 : Profleurophore HPQ et mécanisme de libération

¹⁷⁶ Braun, E.; Sauter, D. Clin. Transl. Immunol. **2019**, 8 (8).

¹⁷⁷ Bassi, D. E.; Fu, J.; De Cicco, R. L.; Klein-Szanto, A. J. P. Molecular Carcinogenesis. November **2005**, pp 151–161.

¹⁷⁸ Klein-Szanto, A. J.; Bassi, D. E. Biochemical Pharmacology. Elsevier Inc. September 15, **2017**, pp 8–15.

¹⁷⁹ Jaaks, P.; Bernasconi, M. International Journal of Cancer. Wiley-Liss Inc. August 15, **2017**, pp 654–663.

¹⁸⁰ Li, K.; Hu, X.-X.; Liu, H.-W.; Xu, S.; Huan, S.-Y.; Li, J.-B.; Deng, T.-G.; Zhang, X.-B. Anal. Chem **2018**, 90, 11680–11687.

- Stimuli divers

D'autres auteurs ont mis au point très récemment des profluorophores pour la détection d'une diversité d'enzymes dont des enzymes d'origine bactérienne, des enzymes impliquées dans des cancers ou des maladies de la peau.¹⁸¹⁻¹⁸⁴

Dans tous ces cas, la reconnaissance spécifique de la gâchette par l'enzyme étudiée, suivie de l'auto-immolation conduit à l'émission de fluorescence.

3.2. Systèmes d'administration et de distribution des médicaments

La biodisponibilité des principes actifs est fortement liée à l'efficacité du système d'administration et du système de distribution de médicaments. En effet, l'obtention de l'effet thérapeutique recherché dépend de la biodisponibilité du principe actif. Pour l'administration des médicaments, la chimie des SAI présente deux avantages : premièrement la réduction ou la suppression d'effets indésirables ; deuxièmement l'obtention d'un effet thérapeutique optimal du fait de la libération sans résidu du principe actif au niveau du site souhaité.

La chimie des SAI a été utilisée pour plusieurs types de thérapies dont les thérapies anti-cancéreuses, les thérapies antivirales et les thérapies antibactériennes. Pour ce qui concerne les médicaments anti-cancéreux, l'objectif des chercheurs est de mettre au point des systèmes de distribution ciblée avec libération du principe actif dans le tissu cancéreux. Pour cela, plusieurs stratégies sont utilisées, à savoir les systèmes de libération contrôlée, notamment les nanoparticules, les liposomes, les gels, les cyclodextrines,^{185,186} ainsi que les SAI avec libération du principe actif après clivage spécifique dans le tissu cancéreux.

¹⁸¹ Żądło-Dobrowolska, A.; Szczygieł, M.; Koszelewski, D.; Paprocki, D.; Ostaszewski, R. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14 (38), 9146–9150.

¹⁸² Luo, Z.; Feng, L.; An, R.; Duan, G.; Yan, R.; Shi, H.; He, J.; Zhou, Z.; Ji, C.; Chen, H. Y.; et al. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, 23 (59), 14778–14785.

¹⁸³ Safir Filho, M.; Dao, P.; Gesson, M.; Martin, A. R.; Benhida, R. *Analyst* **2018**, 143 (11), 2680–2688.

¹⁸⁴ Miao, Q.; Yeo, D. C.; Wiraja, C.; Zhang, J.; Ning, X.; Xu, C.; Pu, K. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, 57 (5), 1256–1260.

¹⁸⁵ Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Bannerjee, S. K. *Int. J. Pharm. Investig.* **2012**, 2 (1), 2–11.

¹⁸⁶ Aznar, E.; Oroval, M.; Pascual, L.; Murguía, J. R.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (2), 561–718.

Libération contrôlée des thérapies anti-cancéreuses

Les médicaments anti-cancéreux sont toxiques aussi bien pour les cellules cancéreuses que pour les cellules saines, d'où les effets secondaires constatés pendant les chimiothérapies. Un ciblage réussi et une bonne biodisponibilité des thérapies anti-cancéreuses dans les tissus tumoraux uniquement permettraient une diminution des effets secondaires et une augmentation de l'efficacité des principes actifs. Ainsi, une nouvelle classe de médicaments a vu le jour grâce aux SAI. Ces médicaments sont constitués de trois^{147,187,188} ou de quatre^{135,136,189–191} parties, à savoir le fragment permettant le ciblage, le fragment espaceur (parfois absent), le SAI et le principe actif [Figure 41]. Le fragment de ciblage peut être une petite molécule comme l'acide folique ou une macromolécule comme la shigatoxine B, ligand d'un récepteur spécifique par exemple, ou un anticorps.

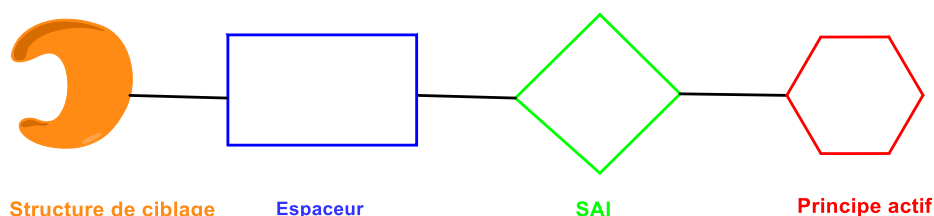


Figure 41 : Topologie des SAI à visée thérapeutique anti-cancéreuse

- Prodrogues auto-immolables de la monométhyl auristatine

Batisse *et al.* ont exploité les SAI dans la mise au point d'un système de libération des dérivés de l'auristatine.¹⁴⁷ Ce système se compose de trois parties à savoir la sous-unité B non toxique de la shigatoxine (STxB) qui est le fragment permettant le ciblage, le SAI qui est le 2-mercaptoethyl méthylcarbamate, le principe actif anti-cancéreux qui est la monométhyl auristatine (MMA) E ou F [Figure 42]. Le globotriaosylcéramide (Gb3) est un sphingolipide ubiquitaire, et récepteur de la STxB. Il est exprimé dans les cancers humains comme le lymphome de Burkitt, les cancers du sein, de l'ovaire, des testicules et du colon.^{192,193}

¹⁸⁷ Zhang, X.; Li, X.; Li, Z.; Wu, X.; Wu, Y.; You, Q.; Zhang, X. *Org. Lett.* **2018**, 20, 3635–3638.

¹⁸⁸ Doura, T.; Takahashi, K.; Ogra, Y.; Suzuki, N. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, 8 (2), 211–214.

¹⁸⁹ Gébleux, R.; Stringhini, M.; Casanova, R.; Soltermann, A.; Neri, D. *Int. J. Cancer* **2017**, 140 (7), 1670–1679.

¹⁹⁰ Kanduluru, A. K.; Low, P. S. *Mol. Pharm.* **2017**, 14 (11), 3859–3865.

¹⁹¹ Vlahov, I. R.; Qi, L.; Kleindl, P. J.; Santhapuram, H. K.; Felten, A.; Parham, G. L.; Wang, K.; You, F.; Vaughn, J. F.; Hahn, S. J.; et al. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28 (12), 2921–2931.

¹⁹² Sandvig, K.; Van Deurs, B. *Gene Ther.* **2005**, 12, 865–872.

¹⁹³ Johannes, L.; Decaudin, D. *Gene Ther.* **2005**, 12, 1360–1368.

Deux de leurs dérivés ont montré des résultats intéressants, à savoir des effets cytotoxiques sur les cellules Gb3⁺ contrairement aux cellules Gb3⁻. Cela révèle leur spécificité. Ces deux dérivés présentent aussi une stabilité à 37 °C dans le sérum. Des études complémentaires, notamment sur la stabilité de ces dérivés en fonction du pH et en présence de divers oxydants tels que les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) sont nécessaires.

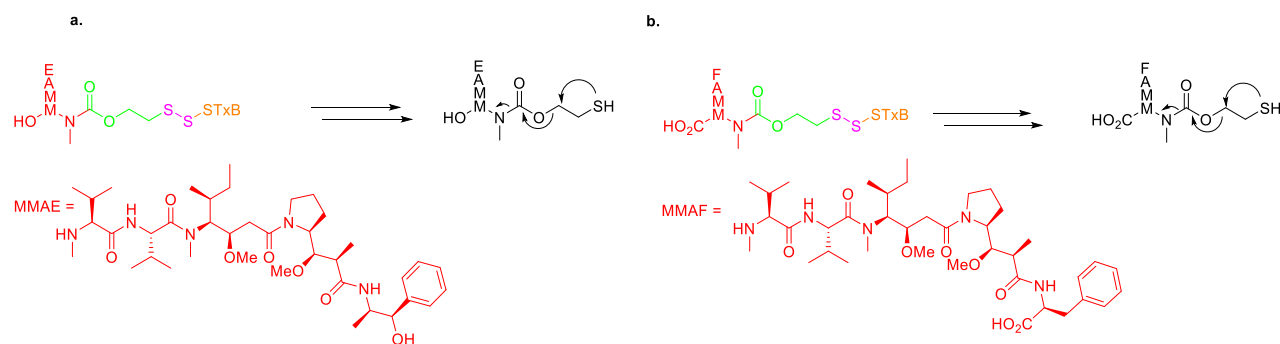


Figure 42 : Prodrugs de la MMA. a. STxB -SAI-MMAE et mécanisme de libération, b. STxB -SAI-MMAF et mécanisme de libération

Gébleux *et al.* ont, quant à eux, utilisé comme agent de ciblage un anticorps dans la synthèse de leur prodrug de MMAE auto-immolable.¹⁸⁹

Kolakowski *et al.* ont développé une stratégie d'administration ciblée de médicaments antitumoraux basée sur un SAI contenant un carbamate. Le système d'administration ciblée comporte le fragment β -glucuronide, le SAI, le principe actif qui est l'auristatine E et l'anticorps monoclonal [Figure 43]. L'anticorps qui a été utilisé est un anti-CD30, qui après hydrolyse partielle possède 4 régions thiols libres de conjugaison. Le récepteur CD30 est un marqueur de certains cancers. Ainsi l'étape de conjugaison aboutit à 4 molécules de β -glucuronide -SAI-AE par unité d'anticorps. Ce système d'administration est caractérisé par une bonne stabilité dans les conditions physiologiques (*in vitro* et *in vivo*) et une spécificité immunologique.¹⁴⁴ Aussi une excellente libération du principe actif est-elle obtenue après clivage de la gâchette. Cela montre l'efficacité de l'utilisation des SAI pour gagner en stabilité et en libération sans résidu du substrat d'intérêt.

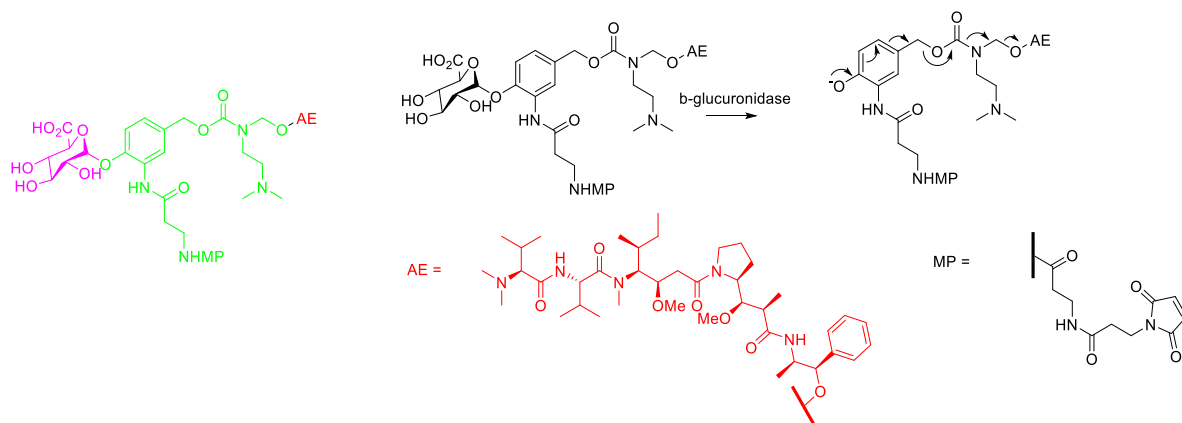


Figure 43 : β -glucuronide-SAI-AE et mécanisme de libération

Le Brentuxumab, est une prodrogue auto-immolable de la MMAE. Il est actuellement autorisé pour le traitement des lymphomes hodgkiniens CD30+, et les lymphomes anaplasiques à grandes cellules CD30+.¹⁹⁴

- Prodrogues auto-immolables β -glucuronidases-sensibles

Tranoy-Opalinski *et al.* font l'état des lieux des progrès qu'à connus le développement des prodrogues β -glucuronidases-sensibles utilisées dans la chimiothérapie sélective du cancer.¹⁴⁵ C'est depuis 1988, que Tietze *et al.* ont proposé de mettre à profit l'activité β -glucuronidase pour la libération ciblée de promédicaments dans le microenvironnement des tumeurs.¹⁹⁵ Plusieurs classes de prodrogues β -glucuronidases-sensibles ont été rapportées à savoir les prodrogues de paclitaxel, des inhibiteurs des histones déacétylases, de ciclopamine, de dérivés de camptothécine, de dérivés de duocarmycine, de monométhylauristatine E et d'anthracyclines. En considérant les prodrogues rapportées, la plupart possèdent un SAI qui est un dérivé de l'alcool *para*-hydroxybenzylique, connecté ou non à un carbonate, à un carbamate ou à un aminoéthylcarbamate.¹⁴⁵

Prodrogues auto-immolables du paclitaxel

Les deux composés les plus stables des prodrogues du paclitaxel contiennent un alcool *para*-hydroxybenzylique (1) pour l'un et un alcool *para*-aminobenzylique (2) pour l'autre [Figure

¹⁹⁴ Senter, P. D.; Sievers, E. L. *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30 (7), 631–637.

¹⁹⁵ Tietze, L. F.; Seele, R.; Leiting, B.; Krach, T. *Carbohydr. Res.* **1988**, 180 (2), 253–262.

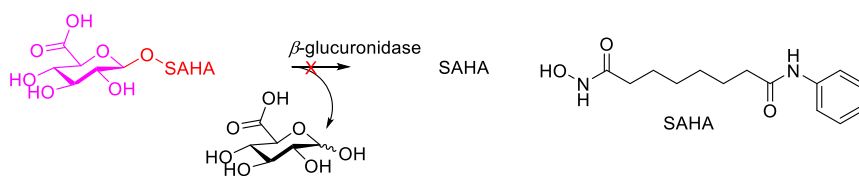


Figure 45: Prodrogue de SAHA sans SAI

Prodrogues auto-immolables de l'antitumoral CI-994

Tronoy-Opalinski *et al.* ont par la suite développé deux dérivés β -glucuronidases-sensibles du CI-994. Le CI-994 est un composé antitumoral de la classe des benzamides des inhibiteurs des histones déacétylases.¹⁹⁹ Cette molécule présente est un puissant antitumoral mais possède une toxicité élevée contre les cellules sanguines et une faible solubilité en milieu aqueux. Le branchement de cette molécule à des SAI, donne deux dérivés auto-immolables qui présentent une solubilité d'environ treize fois (12,5 fois) supérieure à celle de la molécule native.

L'un des deux dérivés contient le carbamate de 4-hydroxy-3-nitrobenzyle comme SAI, tandis que l'autre dérivé contient juste une fonction carbamate [Figure 46]. En l'absence de β -glucuronidases, les deux dérivés ne peuvent pas induire la mort cellulaire, quelle que soit leur concentration. C'est seulement après clivage de la gâchette par les β -glucuronidases que la mort cellulaire est observée, preuve de la libération du CI-994 après libération induite par les SAI.¹⁹⁹

¹⁹⁹ Thomas, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Gesson, J. P.; Roche, J.; Papot, S. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, 16 (17), 8109–8116.

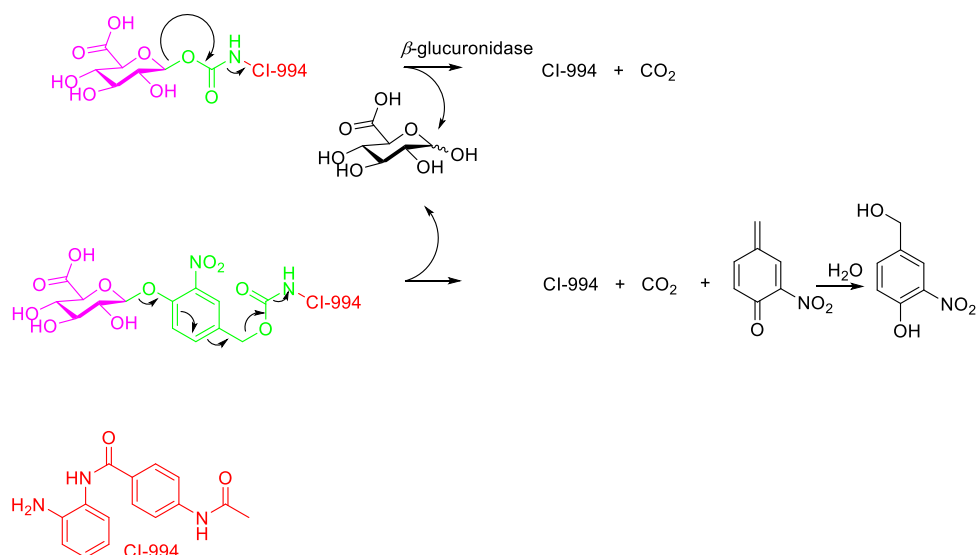


Figure 46 : Prodrogues du CI-994

Prodrogues auto-immolables du cycloamine

S. Papot *et al.*, des chercheurs du même groupe que Tronoy-Opalinski *et al.* ont synthétisé deux prodrogues β -glucuronides sensibles dérivées du cycloamine contenant chacune un SAI.^{200,201} L'un de ces dérivés présente la particularité de posséder un polyéthylène glycol en position benzylique du SAI [Figure 47]. L'avantage de ce groupement est qu'il assure un gain en stabilité et permet d'éviter une accumulation d'intermédiaires après activation enzymatique de la gâchette.

Les SAI permettent la libération de la cycloamine qui est responsable de l'activité antiproliférative. Bien que des études de stabilité n'aient pas été rapportées, la molécule contenant le polyéthylène glycol serait stable, puisque cette molécule demeure stable en l'absence de l'enzyme β -glucuronidase.

²⁰⁰ Hamon, F.; Renoux, B.; Chadéneau, C.; Muller, J. M.; Papot, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (4), 1678–1682.

²⁰¹ Renoux, B.; Legigan, T.; Bensalma, S.; Chadéneau, C.; Muller, J. M.; Papot, S. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (24), 8459–8465.

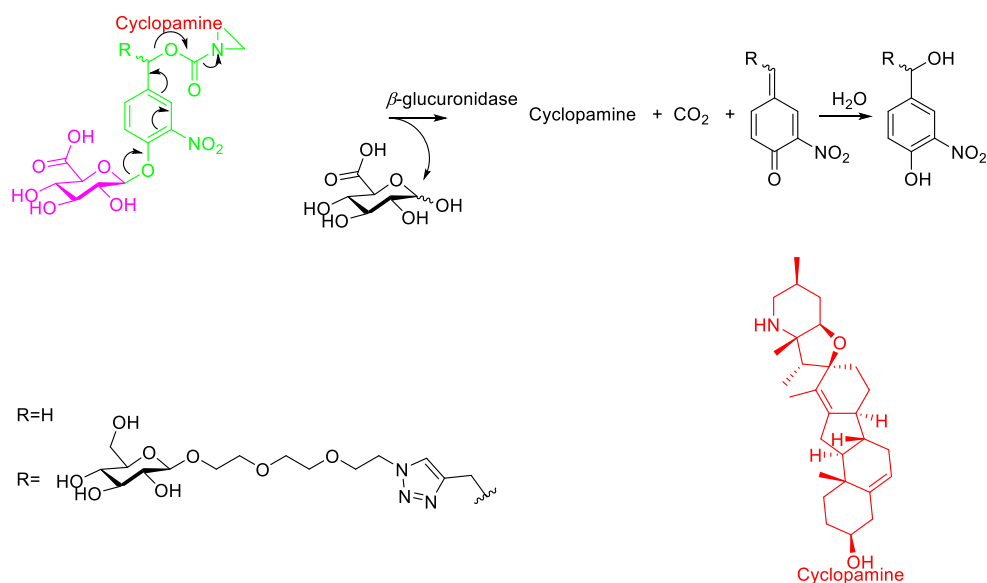


Figure 47 : Prodrogue de la cyclopamine

Prodrogues auto-immolables de la camptothécine

En ce qui concerne la classe des prodrogues β -glucuronides sensibles dérivées de la camptothécine, deux composés ont également été rapportés.^{202–204} L'un contient un SAI *para*-hydroxybenzylcarbamate alors que l'autre contient un alcool *para*-hydroxynitrobenzyle [Figure 48]. Le premier libère la 9-aminocamptothécine après clivage de la gâchette, et le second la 10-hydroxycamptothécine. Avec les SAI, les deux prodrogues montrent une meilleure activité antitumorale et une moindre toxicité par rapport aux mêmes substances actives sans SAI. Aussi, la β -glucuronidase est-elle 520 fois plus affine pour la prodrogue 10-hydroxycamptothécine que pour la prodrogue 9-aminocamptothécine.

Cette différence d'affinité pourrait s'expliquer par le fait que ces deux prodrogues ont des SAI de structures différentes. En effet la présence du groupe nitro, qui est électroattracteur sur le noyau benzyl de la prodrogue de la 10-hydroxycamptothécine, pourrait ainsi accélérer l'hydrolyse enzymatique. Lors des études de stabilité *in vitro*, l'un est stable dans un tampon phosphate à pH 7,4, l'autre dans un plasma humain.

²⁰² Leu, Y. L.; Roffler, S. R.; Chern, J. W. J. Med. Chem. **1999**, 42 (18), 3623–3628.

²⁰³ Prijovich, Z. M.; Chen, B. M.; Leu, Y. L.; Chern, J. W.; Roffler, S. R. Br. J. Cancer **2002**, 86 (10), 1634–1638.

²⁰⁴ Juan, T.-Y.; Roffler, S. R.; Hou, H.-S.; Huang, S.-M.; Chen, K.-C.; Leu, Y.-L.; Prijovich, Z. M.; Yu, C.-P.; Wu, C.-C.; Sun, G.-H.; et al. Clin. Cancer Res. **2009**, 15 (14), 4600–4611.

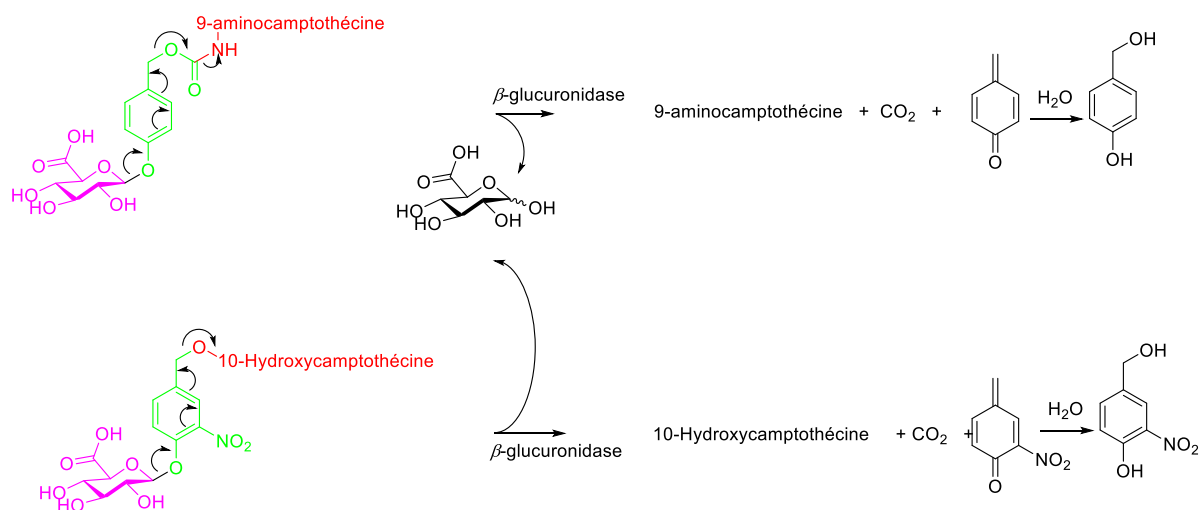


Figure 48 : Prodrogues dérivées de la camptothécine

Prodrogue auto-immolable de la monométhylauristatine E β -glucuronide-sensibles

La prodrogue β -glucuronide sensible de la monométhylauristatine E [Figure 49], montre une toxicité en moyenne 70 fois moins élevée que la monométhylauristatine E seule. De plus, la présence d'une activité antiproliférative a bien été observée après ajout de β -glucuronidase, preuve que l'auto-immolation a bien lieu, tandis qu'en absence de β -glucuronidase la viabilité des cellules tumorales est préservée.²⁰⁵

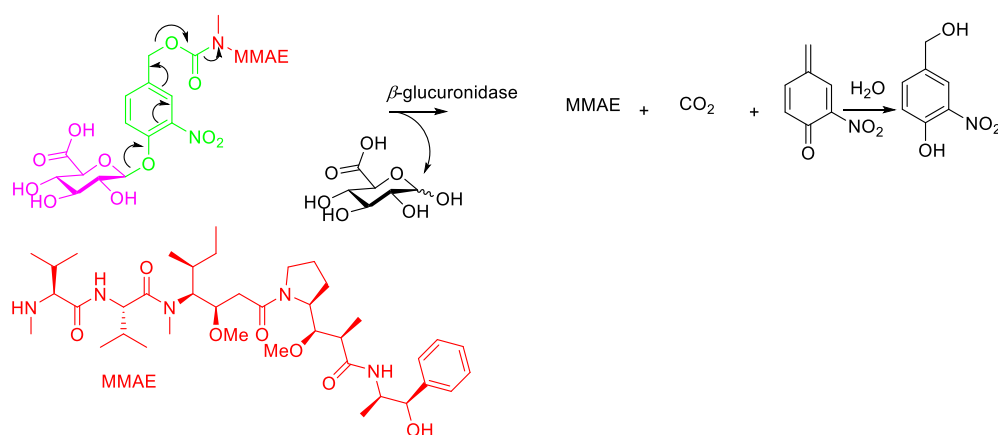


Figure 49 : Prodrogue de la MMAE

Prodrogues auto-immolables amplificatrices et albumine-liantes

En plus du concept de SAI, d'autres concepts ont été associés aux prodrogues β -glucuronides sensibles. Il s'agit du concept des prodrogues amplificatrices, qui permettent une

²⁰⁵ Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Jayle, C.; Alsarraf, J.; Thomas, M.; Papot, S. Eur. J. Med. Chem. **2013**, 67, 75–80.

amplification de la quantité de substance active dans le tissu tumoral, et le concept des prodrogues albumine-liantes qui entraînent l'allongement du temps de demi-vie de la prodrogue.

Malgré la pertinence et la diversité de concepts pouvant être associés aux prodrogues, l'utilisation des SAI qui assurent une libération sans résidu des substances actives demeure particulièrement intéressante. Des molécules conçues et synthétisées par Tranoy-Opalinski *et al.* illustrent parfaitement ce point de vue. Il s'agit d'un dimère β -glucuronide-sensible de la doxorubicine, d'un hétérodimère β -glucuronide-sensible de la doxorubicine et du MS-275 (inhibiteur des histones déacetylases), et d'une prodrogue β -glucuronide-sensible albumine-liante de la doxorubicine [Figure 50].^{206–208} Pour chacun de ces composés, une activité antiproliférative a été mise en évidence. Les tests de l'activité antiproliférative ont été réalisés *in vitro* pour les dimères et *in vivo* sur des modèles de souris porteuses d'une tumeur (Lewis Lung Carcinoma) pour la prodrogue albumine-liante. Cette activité antiproliférative prouve que l'auto-immolation est responsable de la libération des principes actifs sans résidu qui provoquent l'inhibition de la prolifération.

²⁰⁶ Grinda, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Renoux, B.; Monvoisin, A.; Cronier, L.; Papot, S. *Chem Med* **2011**, 6 (12), 2137–2141.

²⁰⁷ Grinda, M.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Papot, S. In *Med Chem Comm*; Royal Society of Chemistry, **2012**; Vol. 3, pp 68–70.

²⁰⁸ Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Berjeaud, J. M.; Guilhot, F.; Papot, S. *J. Med. Chem.* 2012, 55 (9), 4516–4520.

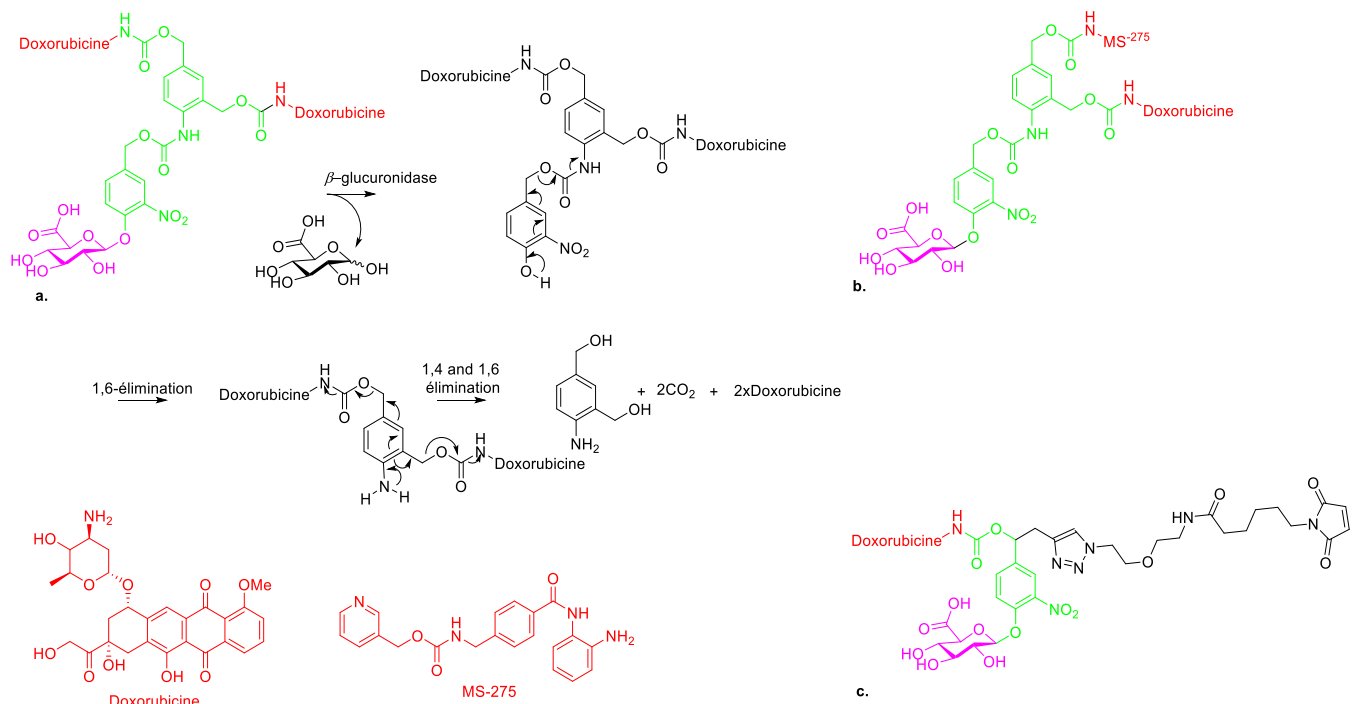


Figure 50 : a. Homodimère de doxorubicine, b. Hétérodimère doxorubicine et MS-275, c. Prodrogue albumine-liante

L'analyse qui ressort de cet état des lieux des prodrogues β -glucuronide-sensibles de Tronoy-Opalinski *et al.* exprime une fois de plus, l'importance des SAI en tant qu'outil pertinent et efficace pour rendre biodisponibles et de façon ciblée des médicaments anticancéreux.

- Bioconjugués auto-immolables ciblant le récepteur de l'acide folique

Leamon *et al.* ont conçu et synthétisé plusieurs bioconjugués ciblant le récepteur à l'acide folique [Figure 51].¹³⁵⁻¹³⁹

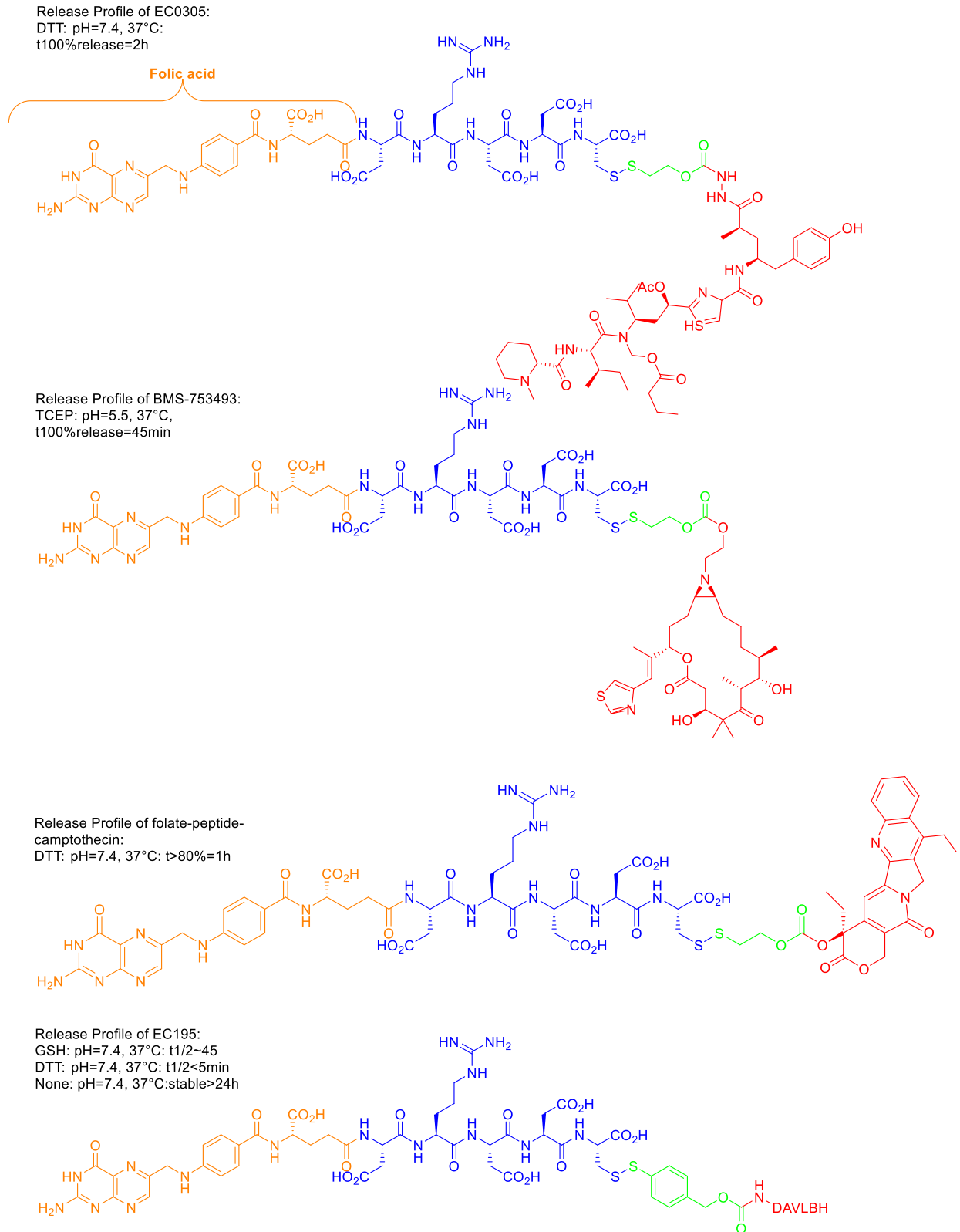


Figure 51 : Bioconjugés ciblant les récepteurs à l'acide folique et profil de libération

Ces bioconjugés dits *SMDC* (small molecule drug conjugate) sont quadripartites comportant (1) l'acide folique, (2) la chaîne peptidique hydrophile, (3) le SAI et (4) le principe actif. Ils se fixent sur le récepteur de l'acide folique et sont absorbés dans la cellule par

endocytose [Figure 52]. Le bioconjugué EC-145 est l'un d'eux et a d'ailleurs franchi plusieurs étapes des essais cliniques [Figure 53].^{209–211} C'est une hydrazine désacétylvinblastine d'acide folique comportant dans sa structure un SAI. EC 145 est une molécule quadripartite composée de (1) l'acide folique (en orange), (2) la chaîne peptidique hydrophile (en bleu), (3) le SAI contenant un pont disulfure (en vert) et (4) le principe actif, le désacétylvinblastine d'hydrazine (DAVLBH) (en rouge). Le fragment acide folique permet une libération ciblée du principe actif, par la fixation du composé EC-145 sur les récepteurs de l'acide folique. Il s'ensuit alors une endocytose avec réduction du pont disulfure et libération du principe actif par auto-immolation.

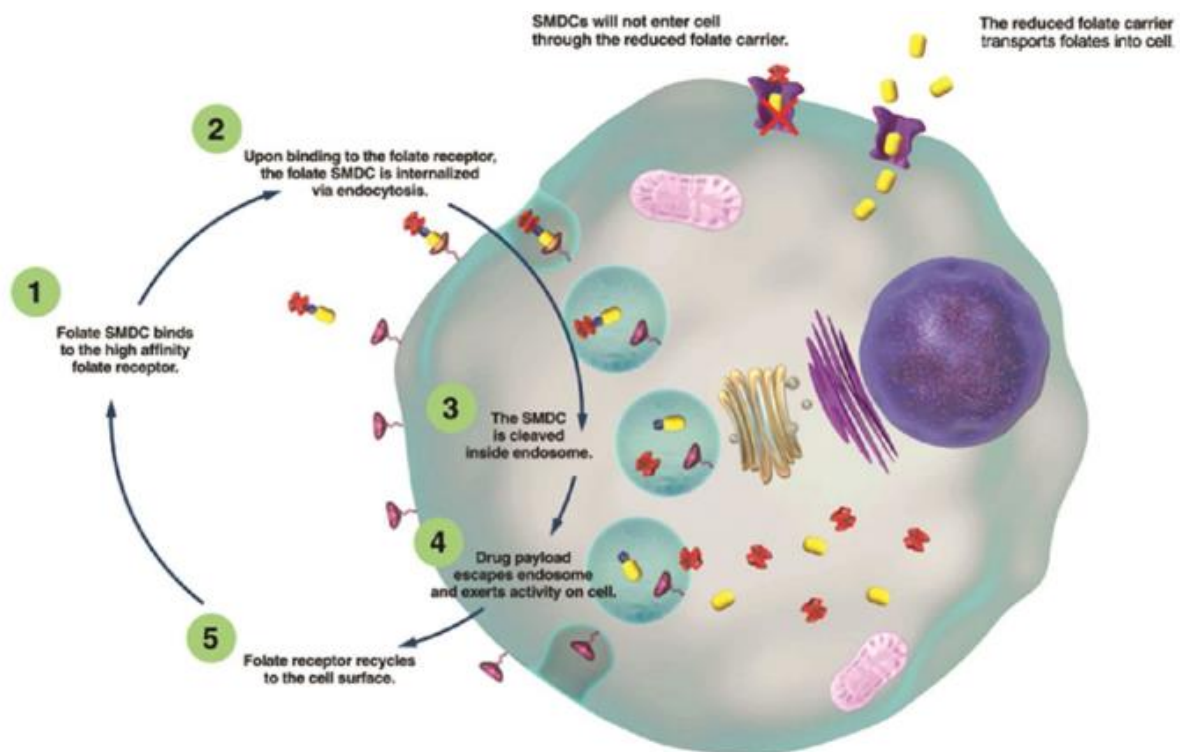


Figure 52 : Molécules anticancéreuses ciblant le récepteur de l'acide folique : endocytose et libération de la molécule active in cellulo

²⁰⁹ Reddy, J. A.; Dorton, R.; Westrick, E.; Dawson, A.; Smith, T.; Xu, L.-C.; Vetzal, M.; Kleindl, P.; Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. Preclinical Evaluation of EC145, a Folate-Vinca Alkaloid Conjugate. *Cancer Res* 2007, 67 (9), 4434–4442

²¹⁰ LoRusso, P. M.; Edelman, M. J.; Bever, S. L.; Forman, K. M.; Pilat, M.; Quinn, M. F.; Li, J.; Heath, E. I.; Malburg, L. M.; Klein, P. J.; et al. *J Clin Oncol* 2012, 30, 4011–4016.

²¹¹ Naumann, R. W.; Coleman, R. L.; Burger, R. A.; Sausville, E. A.; Kutarska, E.; Ghamande, S. A.; Gabrail, N. Y.; Depasquale, S. E.; Nowara, E.; Gilbert, L.; et al. *J. Clin. Oncol.* 2013, 31 (35), 4400–4406.

Le DAVLBH est un dérivé synthétique de la vinblastine, un *vinca* alcaloïde. Son mécanisme d'action est celui des agents déstabilisant les microtubules. Les tests de vérification du mécanisme de libération ont été effectués dans un tampon phosphate à pH 7,4 et à 37 °C et en présence de réducteurs comme le L-glutathion (L-GSH), le (2S,3S)-dithiothréitol (DTT). La libération du principe actif DAVLBH a été confirmée par LCMS. La libération est beaucoup plus rapide en présence de DTT ($t_{1/2} = 5\text{min}$) qu'en présence de GSH ($t_{1/2} = 1\text{h}$). EC-145 qui présente les critères requis par Leamon *et al.* pour un bon médicament *SMDC* ciblant les récepteurs de l'acide folique s'est montré stable dans un tampon phosphate à pH 7,4 et à 37 °C en l'absence de réducteurs.^{135,136}

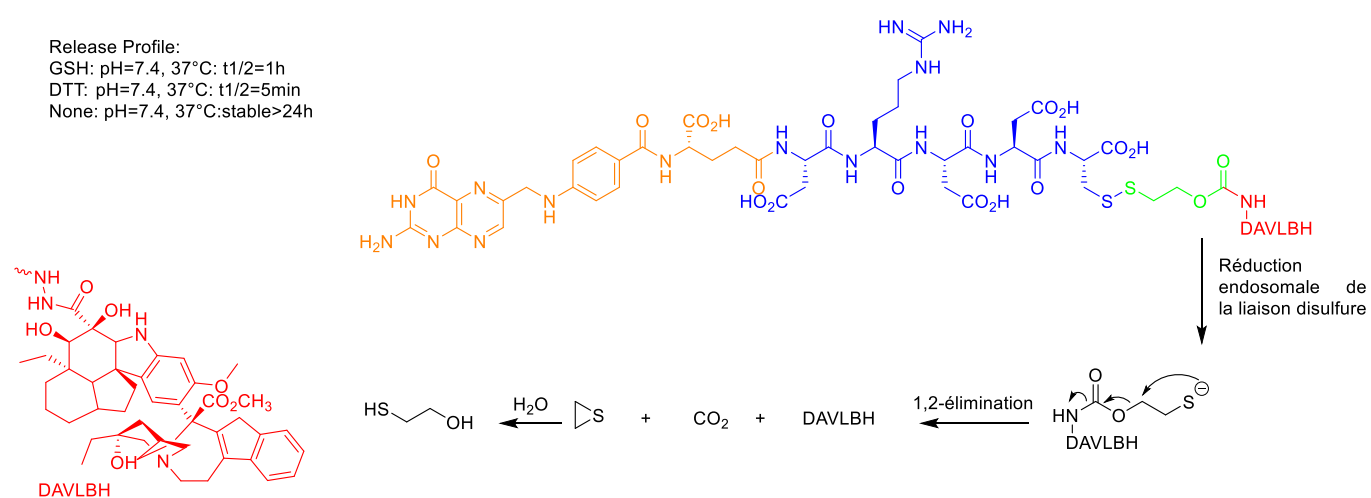


Figure 53: Bioconjugué EC 145 et mécanisme de libération

Très récemment Vlahov *et al.* ont publié une *SMDC* de pyrrolobenzodiazépine pour des applications en thérapie cancéreuse.¹⁹¹ D'autres auteurs ont publié des prodrogues d'anticancéreux auto-immolables dont des prodrogues du 5-fluorouracile, de la combretastatine, de la doxorubicine.^{187,188,212}

Libération contrôlée de thérapies antivirales et antibactériennes

Zelikin *et al.* ont exploité les SAI dans la synthèse de prodrogues anti-VIH (virus de l'immunodéficience acquise) dites macromoléculaires. Le SAI dans ces prodrogues est un carbonate couplé à un disulfure. Le stimulus est le glutathion intracellulaire qui réduit la liaison

²¹² Grinda, M.; Legigan, T.; Clarhaut, J.; Peraudeau, E.; Tranoy-Opalinski, I.; Renoux, B.; Thomas, M.; Guilhot, F.; Papot, S. *Org. Biomol. Chem* **2013**, 11.

disulfure entraînant une auto-immolation par un mécanisme de 1,5-cyclisation avec libération de l'antiviral dans la cellule [Figure 54].

Les prodrogues antivirales comportant les SAI ont montré plusieurs avantages. D'abord elles ont une plus grande efficacité que l'antiviral sans SAI. Ensuite elles possèdent des activités antivirales avant même d'avoir libéré l'antiviral [Figure 55]. Enfin, avec ces prodrogues macromoléculaires, le temps de demi-vie est allongé et donne la possibilité de diminuer le nombre de prises de médicaments par le patient. Cela est fort important pour l'observance du patient dans un contexte de pathologie chronique. Les antirétroviraux utilisés par les auteurs sont la zidovudine et la lamivudine.^{151,213}

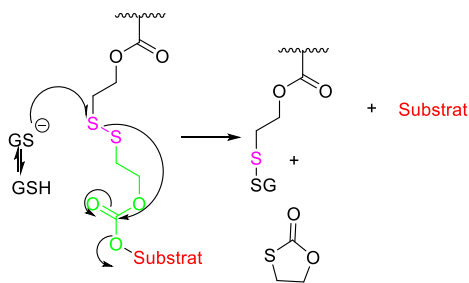


Figure 54 : Mécanisme de libération après réduction par le glutathion

²¹³ Danial, M.; Andersen, A. H. F.; Zuwala, K.; Cosson, S.; Riber, C. F.; Smith, A. A. A.; Tolstrup, M.; Moad, G.; Zelikin, A. N.; Postma, A. Mol. Pharm. **2016**, 13 (7), 2397–2410.

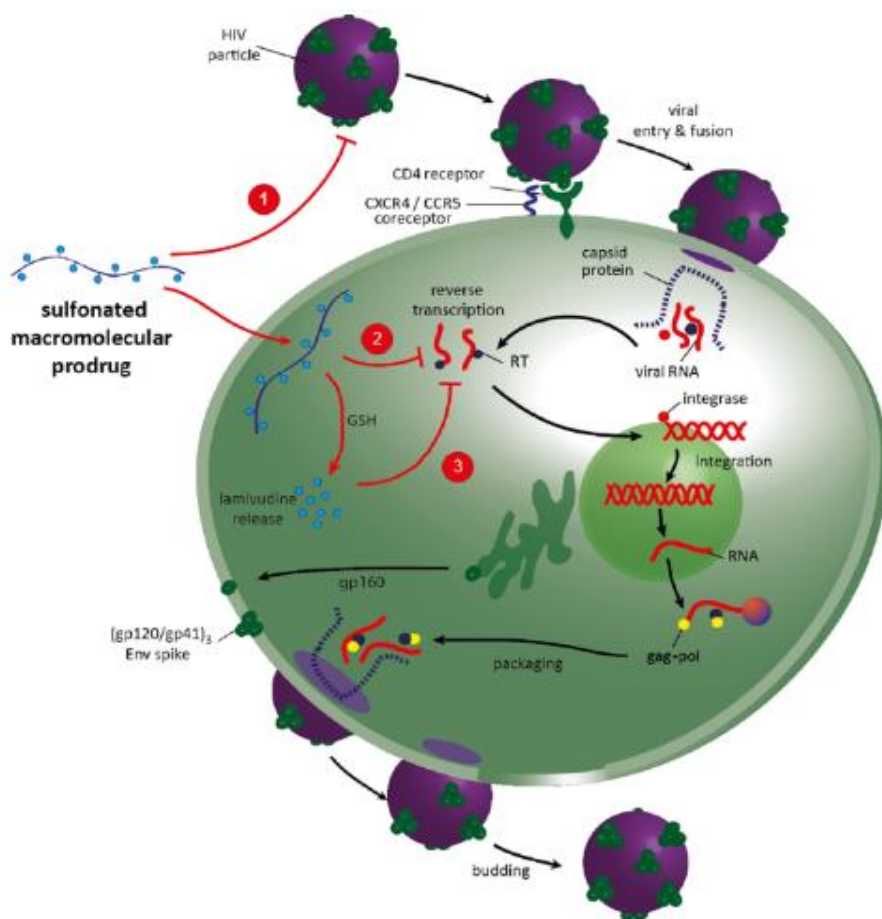


Figure 55 : Mécanisme d'action des prodrogues macromoléculaires

Récemment, d'autres auteurs ont exploité les SAI de type thiocarbamate dans la synthèse de conjugués d'antibiotiques.^{214,215} Neumann *et al.* ont ainsi mis au point un conjugué auto-immolable de la ciprofloxacine qui cible spécifiquement les bactéries à Gram négatif. Wang *et al.* ont, quant à eux, synthétisé un conjugué auto-immolable de la triméthoprime et ont ainsi obtenu une molécule cent fois plus hydrosoluble que la triméthoprime sans SAI.

3.3. Théranostic : agents thérapeutiques et diagnostics

La théranostic est un concept introduit en sciences médicales par Funkhouser J. en 2002 pour définir l'utilisation combinée d'agents thérapeutique et diagnostique. L'avantage de l'administration combinée réside dans le fait de visualiser, de surveiller le tissu malade et d'ajuster si besoin est le traitement afin d'être dans l'optimum de l'efficacité et de la sécurité

²¹⁴ Neumann, W.; Nolan, E. M. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 2018.

²¹⁵ Wang, X.; Borges, C. A.; Ning, X.; Rafi, M.; Zhang, J.; Park, B.; Takemiya, K.; Lo Sterzo, C.; Taylor, W. R.; Riley, L.; et al. *Bioconjug. Chem.* **2018**, 29 (5), 1729–1735.

pour le patient. En théranostic, la prise en charge du patient est personnalisée.^{216–218}

Plusieurs auteurs ont exploité les SAI en vue d'une application théranostique.^{219–223}

Parmi ces auteurs, Yang Z. et al ont synthétisé une prodrogue théranostique noté **1a** constitué d'un agent de ciblage, la biotine, d'un agent d'imagerie, le complexe de gadolinium(III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate (Gd-DOTA), d'un anticancéreux, la camptothécine [Figure 56].²²³ Tous ces constituants étant reliés les uns aux autres grâce à un SAI contenant un pont disulfure désintégréable en milieu réducteur, ce qui est précisément trouvé à l'intérieur des cellules cancéreuses. Les récepteurs de la biotine, à savoir les transporteurs multi-vitamines dépendant du sodium sont surexprimés à la surface de plusieurs cellules cancéreuses d'où l'avantage de l'utiliser comme agent de ciblage pour augmenter l'efficacité de la prodrogue. Le complexe de Gd-DOTA est fréquemment utilisé en clinique comme agent de contraste dans l'imagerie par résonance magnétique. Ce complexe a un autre avantage, celui de maintenir éteinte la fluorescence de la camptothécine. Une fois la camptothécine libérée par auto-immolation il y a émission de fluorescence. Ainsi les auteurs ont montré qu'en présence d'un excès de glutathion la prodrogue **1a** se désintègre et libère la camptothécine puisqu'il y a émission et augmentation d'une fluorescence, ce qui n'est pas le cas avec une prodrogue **1c** qui comporte les mêmes éléments structuraux que **1a** sauf le pont disulfure. Des analyses HPLC ont permis également de confirmer la présence d'un pic correspondant à la camptothécine lorsque la prodrogue **1a** est en présence de glutathion et aucun signal caractéristique de la camptothécine quand la prodrogue **1c** est en présence de glutathion. Ces deux précédents résultats sont la preuve qu'il y a bien auto-immolation de la prodrogue **1a** et qu'elle est induite par le glutathion. Les cellules HeLa et A549 qui surexpriment les récepteurs de la biotine, montrent une fluorescence supérieure à celles de cellules normales en microscopie par fluorescence. Du point de vue de l'IMR, la prodrogue **1a** a un excellent T1 (relaxation longitudinale) comparativement au complexe Gd-DOTA seul.

²¹⁶ Kelkar, S. S.; Reineke, T. M. *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22 (10), 1879–1903.

²¹⁷ Wang, L. S.; Chuang, M. C.; Ho, J. an A. *International Journal of Nanomedicine.* **2012**, pp 4679–4695.

²¹⁸ Jeelani, S.; Jagat Reddy, R. C.; Maheswaran, T.; Asokan, G. S.; Dany, A.; Anand, B. *Medknow Publications* **2014**.

²¹⁹ Redy, O.; Shabat, D. J. *Control. Release* **2012**, 164 (3), 276–282.

²²⁰ Liu, P.; Xu, J.; Yan, D.; Zhang, P.; Zeng, F.; Li, B.; Wu, S. *Chem. Commun. Chem. Commun* 2015, 51 (51), 9567–9570.

²²¹ Wang, Z.; Wu, H.; Liu, P.; Zeng, F.; Wu, S. *Biomaterials* **2017**, 139, 139–150.

²²² Gnaim, S.; Shabat, D. *Acc. Chem. Res.* **2019**.

²²³ Yang, Z.; Lin, H.; Huang, J.; Li, A.; Sun, C.; Richmond, J.; Gao, J. *Chem. Commun* 2019, 55, 4546–4549.

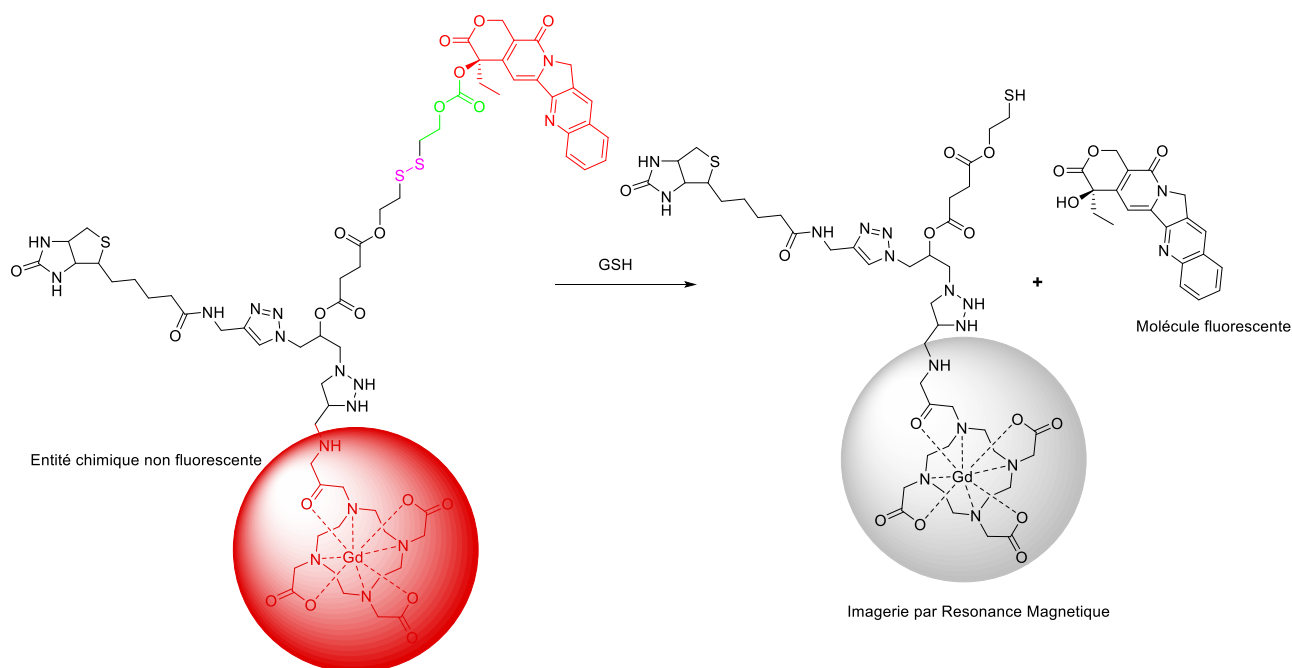


Figure 56 : Prodrogue thérapeutique **1a** et mécanisme de libération

3.4. Matériaux d'amplification et de libération contrôlée

Polymères auto-immolables

Le début des travaux de recherche sur les polymères auto-immolables date de 2001, avec la synthèse des premiers oligomères auto-immolables par De Groot *et al.*²²⁴ La synthèse de ces oligomères a ouvert la voie à plusieurs autres travaux de recherche sur le sujet. Ainsi, en 2003, les travaux de De Groot *et al.*, Shabat *et al.*, McGrath *et al.*, ont permis la synthèse de dendrimères auto-immolables.^{225,226} Il s'en est suivi la synthèse de plusieurs polymères auto-immolables linéaires et de polymères auto-immolables conjugués, soit à d'autres polymères non-auto-immolables, soit à des nanoparticules ou encore à des anticorps.

L'objectif initial des polymères auto-immolables a été l'administration ciblée de molécules thérapeutiques par le biais de prodrogues qui assurent une libération effective de la molécule active dans le site souhaité. Par la suite, les polymères auto-immolables ont été largement exploités dans un but d'amplification du signal observé après libération du substrat d'intérêt.

²²⁴ De Groot, F. M. H.; Loos, W. J.; Koekkoek, R.; Van Berkomp, L. W. A.; Busscher, G. F.; Seelen, A. E.; Albrecht, C.; De Bruijn, P.; Scheeren, H. W. J. *Org. Chem.* **2001**, 66 (26), 8815–8830.

²²⁵ Amir, R. J.; Pessah, N.; Shamis, M.; Shabat, D. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, 42 (37), 4494–4499.

²²⁶ Szalaj, M. L.; Kevitch, R. M.; McGrath, D. V. J. *Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (51), 15688–15689.

De façon schématique, les oligomères sont constitués de deux ou trois *linkers* auto-immolables. Les dendrimères de structure arborescente, sont dites de forme « AB_n/A_nB » où A est le point de départ de l'auto-immolation et B correspond aux molécules d'intérêt relarguées. Quant aux polymères linéaires, ils sont constitués d'un assemblage linéaire de plus de 3 monomères.

- Oligomères auto-immolables

Après avoir émis l'hypothèse que l'augmentation du nombre de SAI réduit l'encombrement stérique généré au niveau de la gâchette, De Groot *et al.* ont synthétisé des prodrogues de paclitaxel et de doxorubicine contenant deux ou trois SAI.²²⁴ Les oligomères auto-immolables présents dans ces prodrogues sont de deux types [Figure 57]. Pour le premier type, les oligomères sont des assemblages de deux ou trois alcools 4-aminobenzyls reliés entre eux par des carbamates.

Pour le deuxième type, les oligomères sont des assemblages de monomères d'alcools 4-aminobenzyls reliés par un carbamate à une diméthyléthylène diamine. À 37 °C et à pH 7,3 les oligomères auto-immolables du premier type procèdent par des mécanismes de 1,6-élimination avec décarboxylation une fois la gâchette peptidique hydrolysée par la plasmine humaine qui joue le rôle de stimulus. Quant aux oligomères du deuxième type, ils procèdent d'un double mécanisme de 1,6-élimination avec décarboxylation et de cyclisation [Figure 57]. Aucune dégradation des prodrogues contenant les oligomères n'est observée après 72h à 37 °C et à pH 7,3. L'étude de cytotoxicité montre que les prodrogues contenant les oligomères auto-immolables sont plus cytotoxiques que les principes actifs natifs sans SAI. Pour les auteurs, cela s'explique par l'efficacité et la rapidité avec lesquelles le stimulus enzymatique hydrolyse la gâchette peptidique. Du reste, cette cytotoxicité accrue pourrait s'expliquer aussi par les produits libérés après auto-immolation puisque le dérivé quinone méthylène libéré après auto-immolation est capable de se fixer à l'ADN ou à des protéines et d'entraîner une toxicité pouvant aboutir à la mort cellulaire.^{227,228}

²²⁷ Bolton, J. L. *Curr Org Chem* **2014**, 18 (1), 61–69.

²²⁸ Bolton, J. L.; Dunlap, T. *Chem Res Toxicol* **2017**, 30, 13–37.

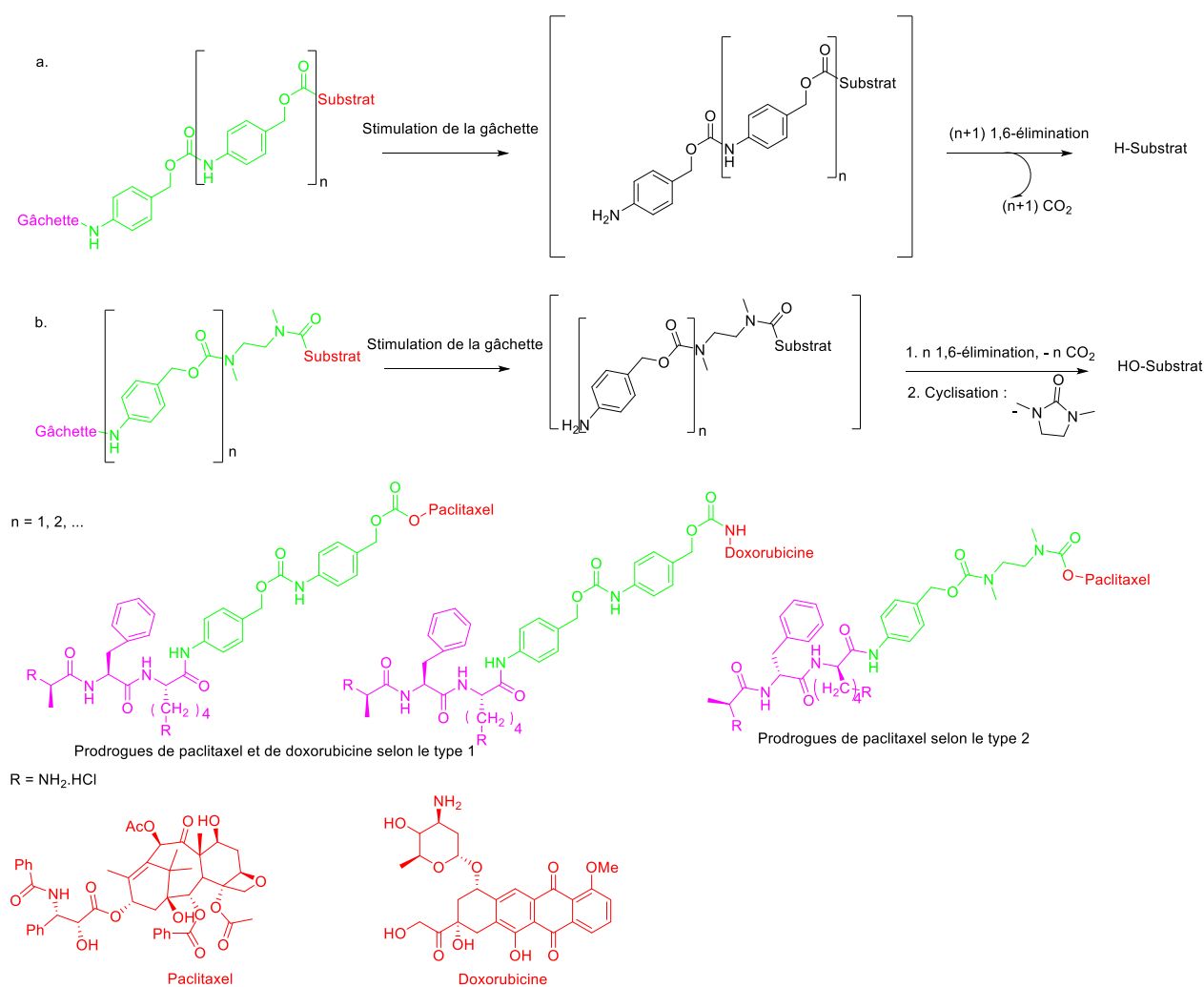


Figure 57 : Structure des oligomères de De Groot *et al.* : a) type 1 et b) type 2

Au regard des résultats rapportés, les oligomères développés par De Groot *et al.* peuvent être utilisés dans un but d'administration et de libération sous contrôle enzymatique de substances actives.

McGrath *et al.* ont eux aussi conçu d'autres types d'oligomères pouvant être utilisés pour la libération contrôlée de substrats d'intérêt. Ces oligomères synthétisés comportent trois ou quatre noyaux d'alcools *para*-hydroxybenzyliques reliés les uns aux autres par des liaisons éthers. En *ortho* de ces noyaux se trouve une liaison éther benzylique ou amine benzylique [Figure 58].^{229,230} L'auto-immolation se produit selon un mécanisme de 1,6-élimination après décrochage de la gâchette en présence de palladium. La molécule représentant le

²²⁹ Li, S.; Szalai, M. L.; Kevitch, R. M.; McGrath, D. V. J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125 (35), 10516–10517.

²³⁰ Ortiz, A.; Shanahan, C. S.; Sisk, D. T.; Perera, S. C.; Rao, P.; McGrath, D. V. J. Org. Chem **2010**, 75, 6154–6162.

substrat d'intérêt est le *para*-nitrophénol, dont l'émission UV a permis de confirmer l'auto-immolation. Sur le modèle des oligomères synthétisés par McGrath *et al*, la molécule d'intérêt peut être une substance à visée thérapeutique ou diagnostique ; de même la gâchette peut être spécifique d'un stimulus biologique.¹²⁵

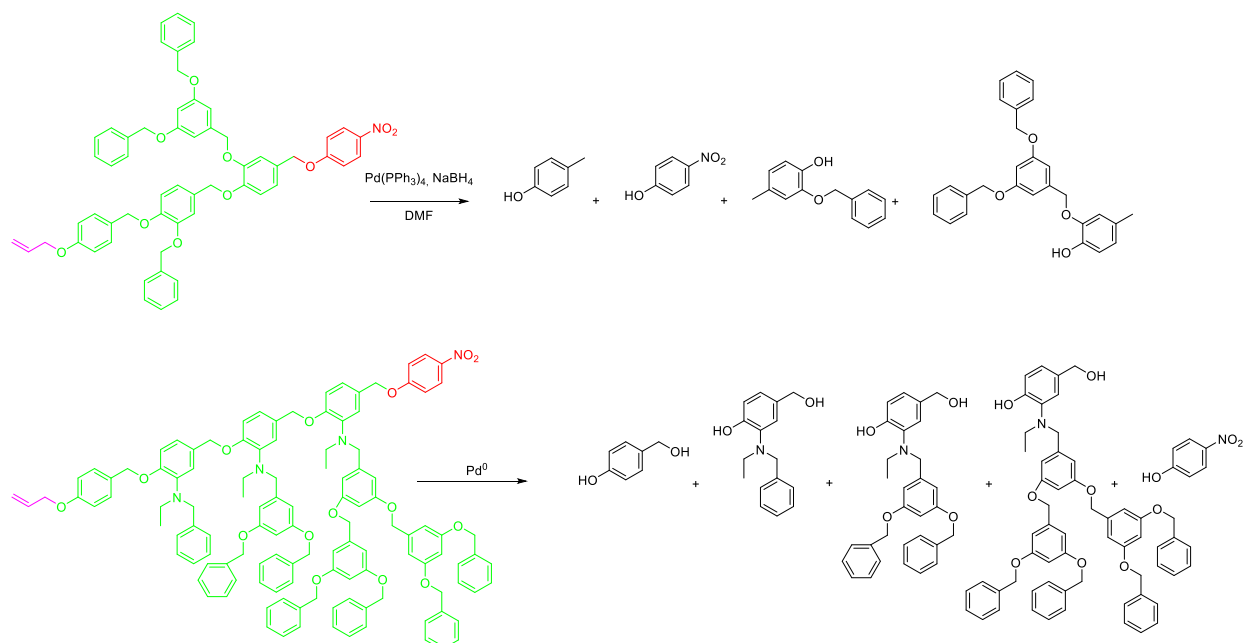


Figure 58 : Oligomères de McGrath *et al*

D'autres auteurs ont synthétisé des oligomères en assemblant plusieurs SAI qui procèdent par un mécanisme de 1,6-élimination, 1,4-élimination et/ou de cyclisation.^{125,126,133,152} Contrairement aux oligomères précédemment rapportés dont l'auto-immolation libère un seul substrat d'intérêt, ceux développés par Warnecke *et al*. permettent une libération de plusieurs substrats d'intérêt.²³¹ Ces auteurs ont été les premiers à mettre au point des oligomères capables de libérer plusieurs substrats d'intérêt après auto-immolation. Ces oligomères comportent trois SAI de type alcool 4-aminobenzyle reliés les uns aux autres par des carbamates. Le substrat d'intérêt est modélisé par la tryptamine, un acide aminé aromatique[Figure 59].¹²⁶

²³¹ Warnecke, A.; Kratz, F. J. *Org. Chem.* **2008**, 73 (4), 1546–1552.

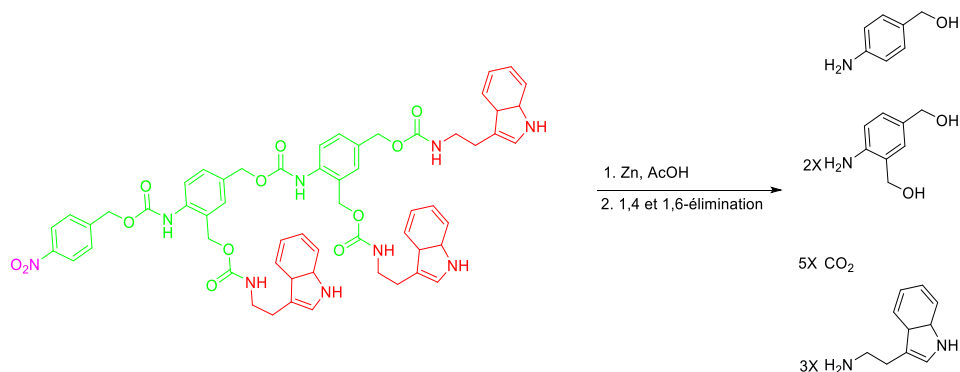


Figure 59 : Schéma de Warnecke et al

- Dendrimères auto-immolables

Les oligomères auto-immolables de Warnecke *et al.* et ceux mis au point par McGrath *et al.* comportent des ramifications. L'apparition de ces ramifications dans la structure des oligomères annonce en effet le passage des oligomères auto-immolables aux dendrimères auto-immolables. C'est ce qui explique d'ailleurs que certains auteurs considèrent ces oligomères comme des dendrimères de génération zéro. Cependant, les dendrimères auto-immolables se caractérisent par une ramification et leur capacité à libérer plusieurs substrats d'intérêt suite à l'action d'un seul stimulus.^{125,126,133,152} Ce sont des macromolécules dont la synthèse s'opère par étapes successives d'assemblage de monomères.

En fonction du nombre de ramifications et de substrats d'intérêt libérés, les dendrimères sont classés en générations zéro, un, deux et trois. Ainsi, pour un dendrimère de génération x , le nombre de substrats d'intérêt libéré est une fonction du type 2^x . Pour les dendrimères, le terme *point focal* désigne la gâchette et l'expression "*unités de molécules périphériques*" désigne les substrats d'intérêt. Plusieurs types de dendrimères sont définis selon la structure chimique des monomères. Il s'agit des dendrimères de type phénylvinyle, de type polycarbamates et de type polybenzyléther.^{125,126}

- Dendrimères de type phénylvinyle

Les auteurs comme De Groot *et al.* ont été les pionniers dans la synthèse des dendrimères de type phénylvinyle. A partir du monomère 2-(4-aminobenzylidène)-propane-1,3-diol, et du paclitaxel comme substrat d'intérêt, ils ont synthétisé des dendrimères de 1^{ère} et 2^{ème} générations [Figure 60]. La réduction du point focal, constitué d'une fonction nitro, se

fait avec du zinc en présence d'acide acétique. Une double 1,8-élimination suivie d'une décarboxylation permettent la libération des substrats d'intérêt.²³²

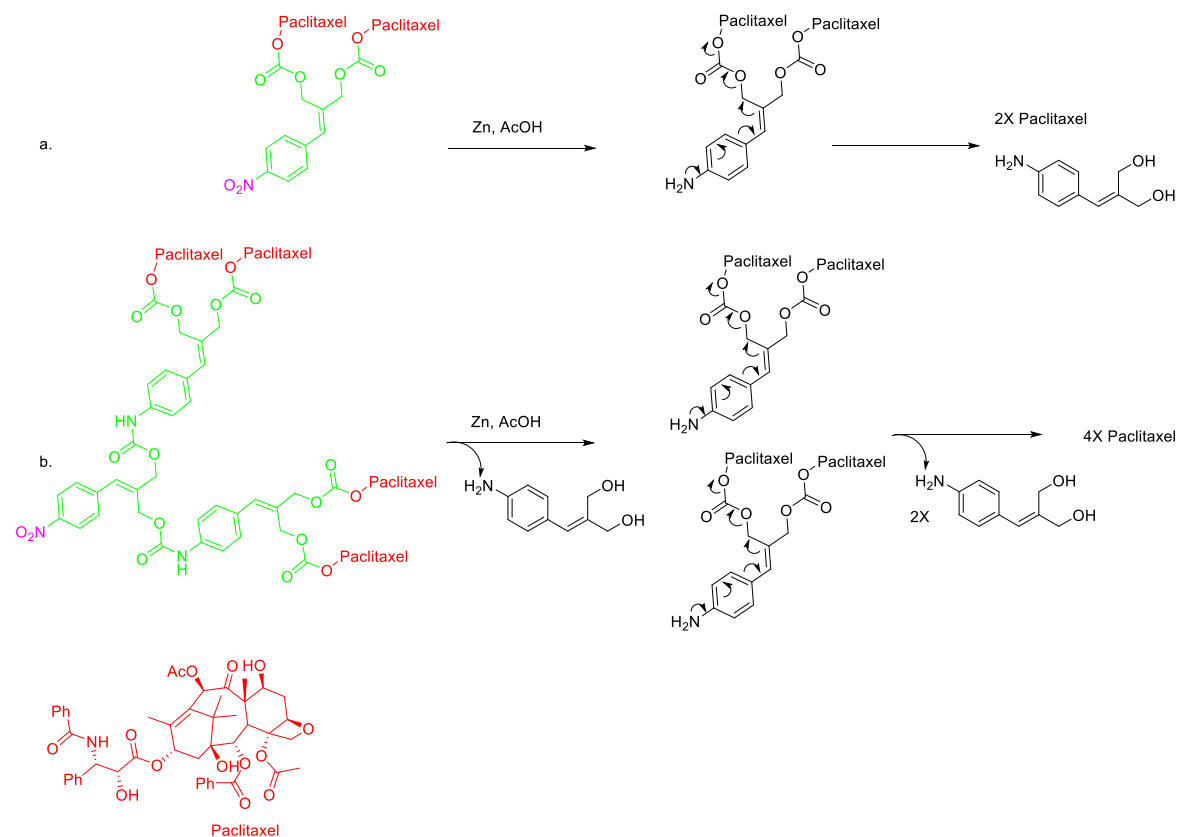


Figure 60 : Dendrimères G1 (a) et G2 (b) de De Groot et al

Shabat *et al.* ont synthétisé un dendrimère phenylpolyvinyl dit de forme AB₆ [Figure 61].²³³

Ce dendrimère a l'avantage de comporter sur un seul noyau benzénique plusieurs ramifications. Le point focal est constitué d'un tert-butoxycarbonyle (Boc) dont l'hydrolyse acide entraîne une cyclisation de la diméthylurée, suivie d'une double 1,8-élimination et d'une quadruple 1,6-élimination associée à des décarboxylations.

²³² De Groot, F. M. H.; Albrecht, C.; Koekkoek, R.; Beusker, P. H.; Scheeren, H. W. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, 42 (37), 4490–4494.

²³³ Shamis, M.; Shabat, D. *Chem. - A Eur. J.* **2007**, 13 (16), 4523–4528.

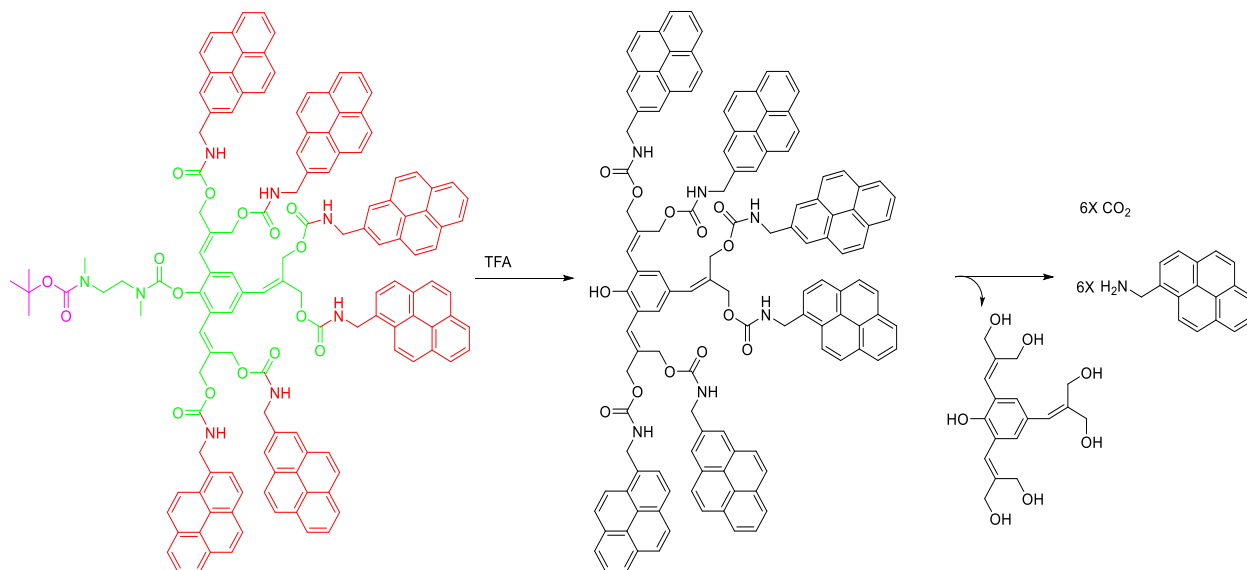


Figure 61 : Dendrimer AB₆ de Shabat *et al.*

- Dendrimères de type polycarbamate

Les dendrimères de type polycarbamate sont le fruit des travaux de recherche de Shabat *et al.* En effet, ces chercheurs ont synthétisé des dendrimères de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations. Les dendrimères polycarbamates sont constitués de noyaux de 2,6-bis-(hydroxyméthyl)-4-crésol reliés les uns aux autres par des diméthyléthylène carbamates [Figure 62].^{125,225}

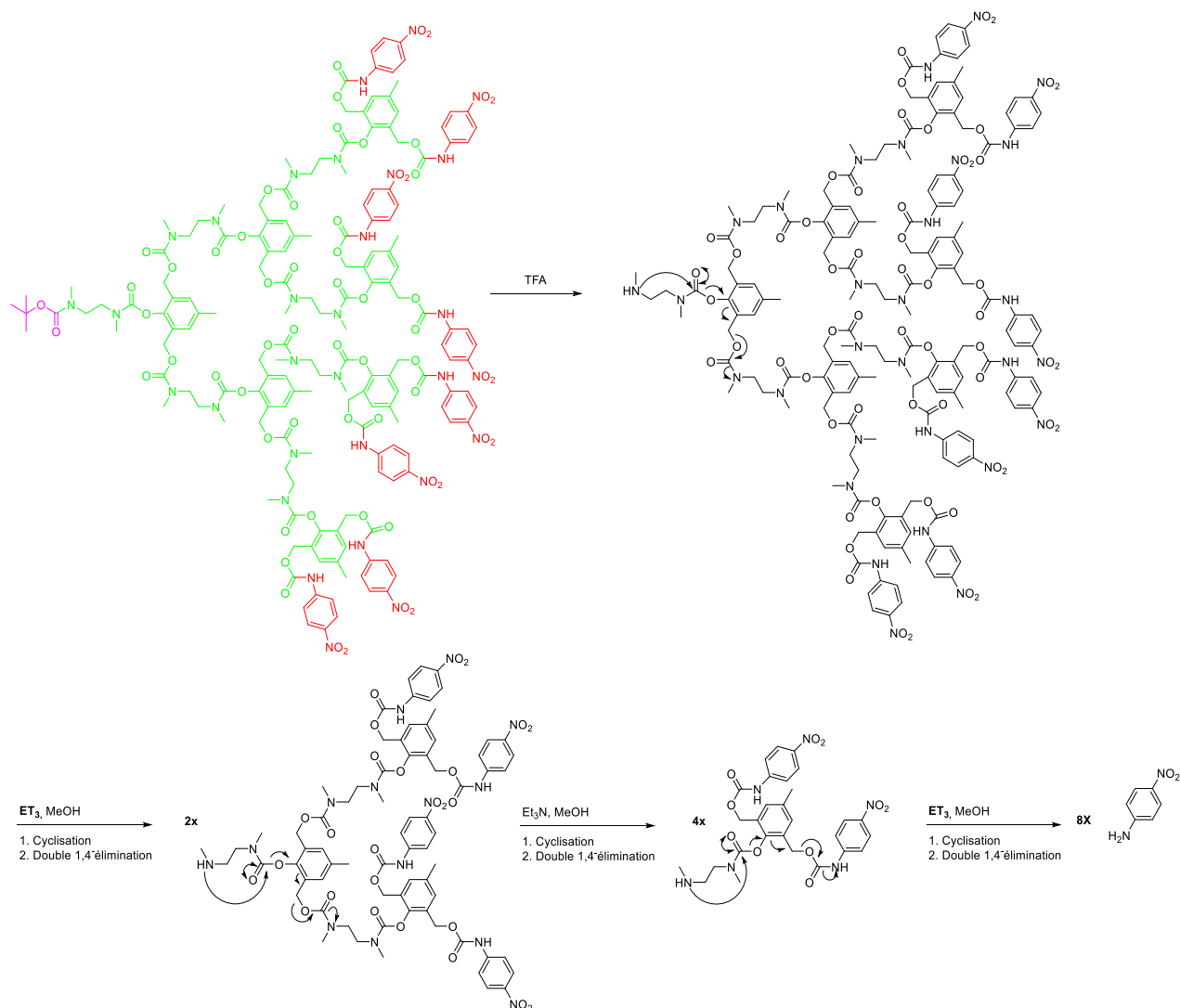


Figure 62 : Dendrimère G3 acido labile de Shabat *et al*

- Dendrimères de type polybenzyléther

Les travaux de McGrath *et al.* ont porté sur la synthèse de dendrimères polybenzyléther de générations zéro, un et deux. Après stimulation de la gâchette éther allylique, il se produit des séquences de 1,4-élimination et/ou 1,6-élimination aboutissant à la libération des substrats d'intérêt, modélisés par le para-nitro-phénol [Figure 63].^{125,226}

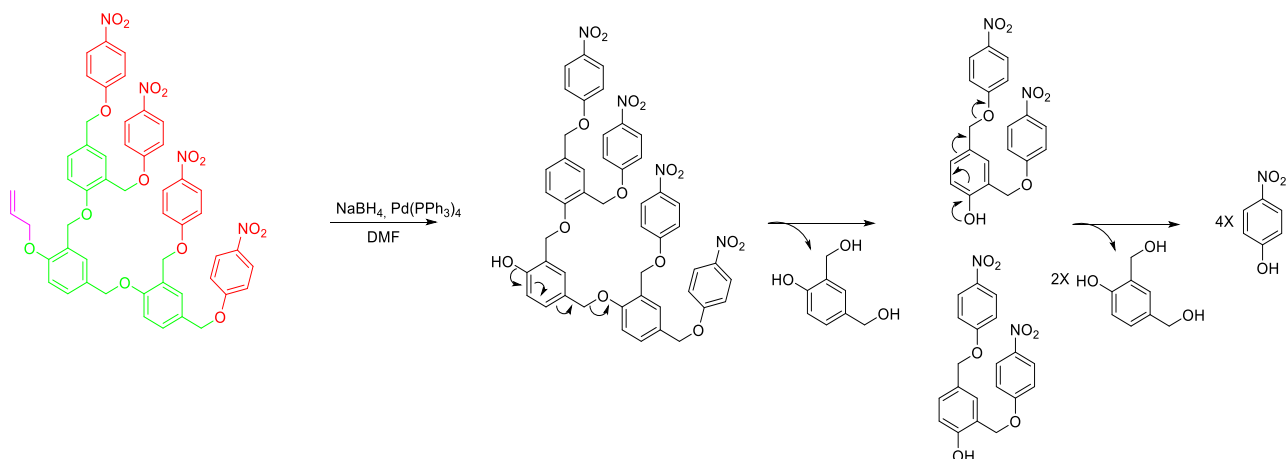


Figure 63 : Dendrimère G2 de McGrath et al

- Alternative à l'hydrophobicité des dendrimères

Les difficultés liées à l'hydrophobicité des dendrimères ont conduit les chercheurs à utiliser des structures chimiques qui permettent un gain d'hydrosolubilité. Il s'agit de fonctions ionisables ajoutées sur le substrat d'intérêt, de polyéthylène glycol ajouté à la périphérie du dendrimère ou de l'utilisation de la pyridine en remplacement des noyaux benzénique [Figure 64].^{125,234–236}

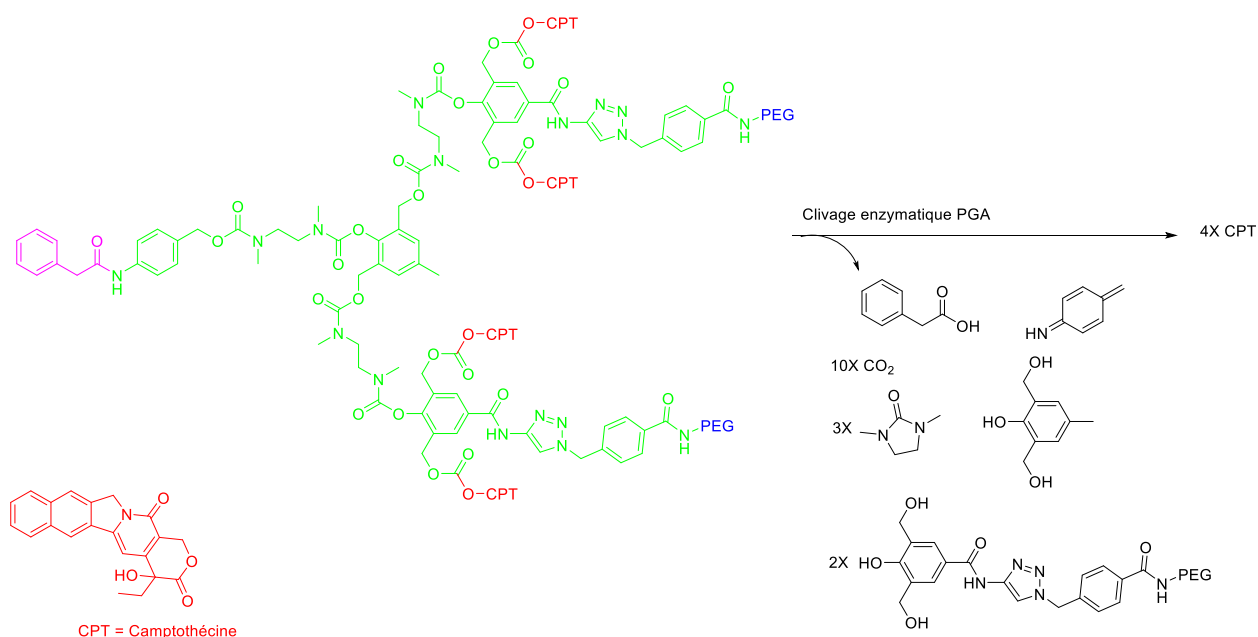


Figure 64 : Dendrimère avec PEG

²³⁴ Avital-Shmilovici, M.; Shabat, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3959–3962.

²³⁵ Gopin, A.; Ebner, S.; Attali, B.; Shabat, D. *Bioco* **2006**, 17, 1432–1440.

²³⁶ Perry-Feigenbaum, R.; Baran, P. S.; Shabat, D. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (23), 4825–4828.

- Dendrimères particuliers

L'architecture des dendrimères a considérablement évolué en s'inspirant de phénomènes physiologiques, comme la transduction du signal neuronal, et d'outils de biotechnologie, notamment la PCR (Polymerase Chain Reaction).^{125,128} Ainsi des dendrimères dits « récepteurs-amplificateurs » ont été mis au point et fonctionnent sur le principe de la transduction d'un signal neuronal. Ces dendrimères ont une fonction de réception d'un signal donné et une fonction d'amplification d'un autre signal [Figure 65].²³⁷ Cette ingénierie chimique est le fruit des travaux de recherche de Shabat *et al.* qui ont beaucoup contribué au développement des SAI.

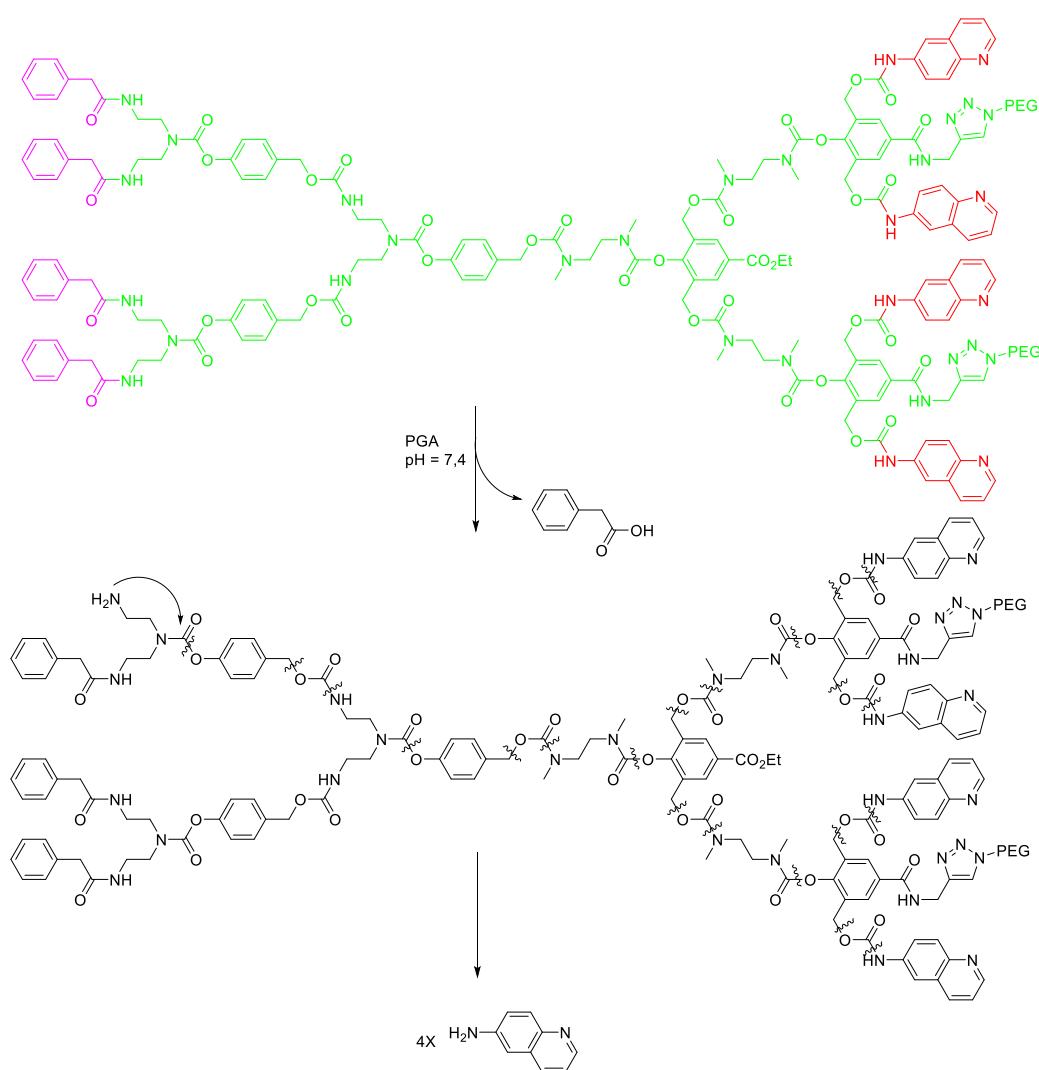


Figure 65 : Dendrimère récepteur-amplificateur

²³⁷ Amir, R. J.; Danieli, E.; Shabat, D. Chem. - A Eur. J. **2007**, 13 (3), 812–821.

S'inspirant de la technique PCR, Shabat *et al.* ont aussi développé des dendrimères dits « *dendrimer chain reaction* » (DCR).¹²⁸ En effet, une fois la gâchette du point focal stimulée, il se produit une auto-immolation avec libération de deux molécules stimulatrices de gâchette et du substrat d'intérêt. A leur tour, chacune des deux molécules stimulatrices libérées provoque, le désassemblage d'un dendrimère ; entraînant ainsi un désassemblage en chaîne.

Cela aboutit à une amplification du substrat d'intérêt libéré et à un désassemblage total de tous les dendrimères qui peuvent être à un ou deux composants [Figure 66, Figure 67].^{238,239}

L'avantage des dendrimères dits « *dendrimer chain reaction* » (DCR) réside dans leur capacité de détection des substances à l'état de traces. Ce qui est très intéressant pour le diagnostic précoce de certaines maladies (biomarqueur à l'état de traces) ou la détection de substances nocives à l'état de traces dans les aliments.

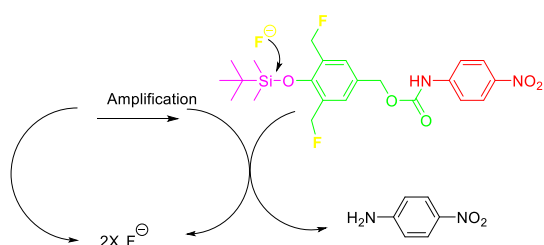


Figure 66 : Dendrimère à un composant pour la détection d'ions fluorures

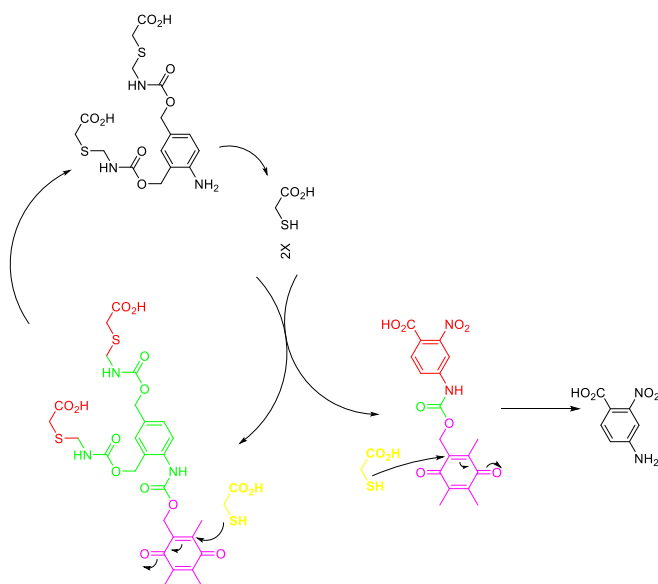


Figure 67 : Dendrimère à deux composants pour la détection de composés soufrés

²³⁸ Perry-Feigenbaum, R.; Sella, E.; Shabat, D. Chem. - A Eur. J. **2011**, 17 (43), 12123–12128.

²³⁹ Sella, E.; Weinstain, R.; Erez, R.; Burns, N. Z.; Baran, S. Chem. Commun. 2010, 46, 6575–6577.

- Polymères auto-immolables

Pour pallier certaines difficultés rencontrées avec les dendrimères auto-immolables, notamment les difficultés de synthèse multi-étapes, de solubilité et d'encombrement stérique et pour éviter de multiplier indéfiniment le nombre de substrats d'intérêt, des polymères auto-immolables ont été développés.¹²⁵ Les polymères auto-immolables présentent l'avantage d'être synthétisés en une seule étape et de pouvoir contenir un grand nombre de substrats d'intérêt. De plus, les polymères auto-immolables ont donné accès à l'ingénierie des micelles, des liposomes et des nanoparticules auto-assemblés et auto-désassemblables.¹²⁶

La capacité d'amplification du substrat d'intérêt des polymères auto-immolables s'explique d'abord par la possibilité de fixation de substrat d'intérêt sur chaque monomère. Ensuite, par le fait que les monomères peuvent constituer en eux-mêmes le substrat d'intérêt. Enfin, par la possibilité d'encapsulation de plusieurs substrats d'intérêt à l'intérieur de nanoparticules, de liposomes ou de micelles. Les polymères auto-immolables sont constitués des mêmes monomères auto-immolables que les dendrimères à quelques différences près. Ainsi il existe des polymères de type polycarbamate/thiocarbamate linéaires ou aromatiques, des polymères de type polybenzyl éther, des polymères de type poly(phtalaldéhyde), des polymères de type polyester amide, des polymères de type poly(caprolactone) et des polymères de type polyhydroxybutyrate.¹²⁵

- Polymères auto-immolables de type polycarbamate

Les polymères auto-immolables de type polycarbamate ont été synthétisés pour la première fois par Shabat *et al.* Ils ont synthétisé des polymères auto-immolables capables de marquages protéiques. Les protéines modèles utilisées ont été la PGA et l'anticorps 38C2 [Figure 68].²⁴⁰ L'activité enzymatique des protéines constitue le stimulus pour l'activation de la gâchette du polymère auto-immolable. L'avantage du principe mis en jeu par ces auteurs est la possibilité de marquage des protéines en vue de poser un diagnostic. D'autres auteurs ont utilisé les polymères auto-immolables dans le développement d'un outil de mesure rapide et simple de la concentration de métaux lourds tels que le mercure et le plomb.²⁴¹

²⁴⁰ Weinstain, R.; Baran, P. S.; Shabat, D. *Bioconjug. Chem.* **2009**, 20 (9), 1783–1791.

²⁴¹ Lewis, G. G.; Robbins, J. S.; Phillips, S. T. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (40), 5352–5354.

Cet outil est particulièrement intéressant car il peut être utilisé dans l'évaluation de la qualité de l'eau de boisson d'après les recommandations de l'OMS.

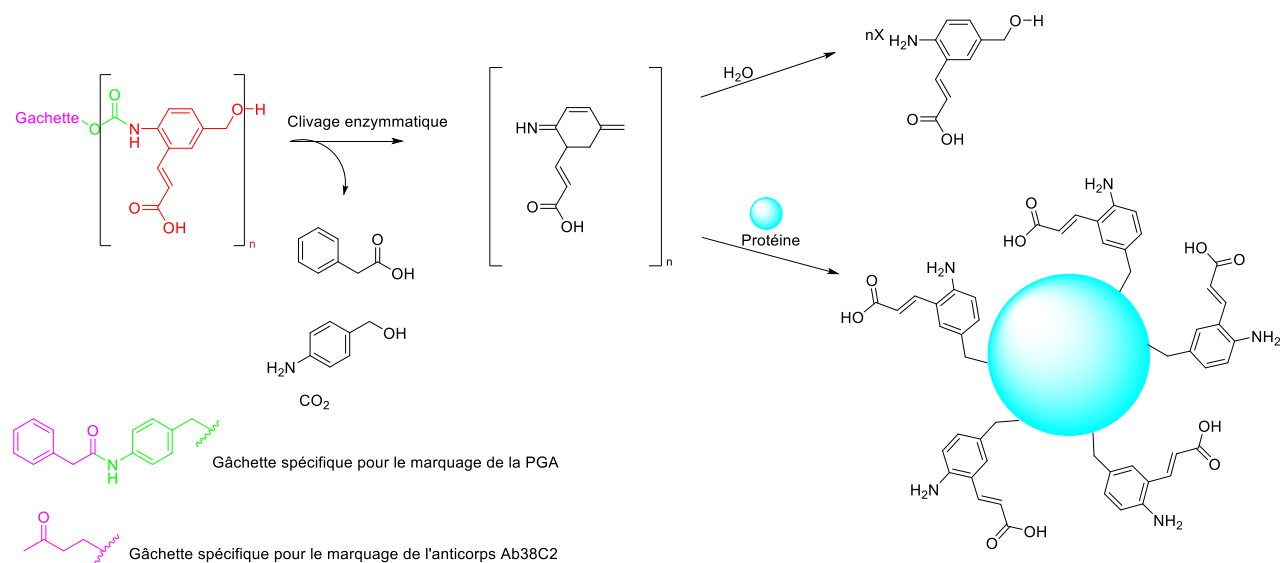


Figure 68 : Polymère pour le marquage protéique

Grâce à l'association de polymères hydrosolubles comme le polyéthylène glycol (PEG), les chercheurs ont pu synthétiser des blocs de copolymères auto-immolables amphiphiles qui ont permis de résoudre les problèmes d'hydrophobicité et d'agrégation rencontrés avec les dendrimères. De plus, ces copolymères amphiphiles sont capables de former des nanostructures pouvant contenir autant de substrats d'intérêt que souhaité ; levant ainsi la contrainte de nombre limité de substrats.

Gillies *et al.* ont synthétisé des copolymères amphiphiles capables de s'auto-assembler en milieu aqueux en nanoparticules contenant des substrats d'intérêt [Figure 69].²⁴² Non seulement ces copolymères amphiphiles résolvent la question de l'hydrophobicité mais aussi permettent un transport d'une plus grande quantité de substrats d'intérêt. Les travaux de ces auteurs offrent ainsi la possibilité de mettre au point des nanoparticules contenant une substance active pouvant être libérée au site souhaité après activation de la gâchette.

²⁴² Dewit, M. A.; Gillies, E. R. *J Am Chem Soc* **2009**, 131, 18327–18334.

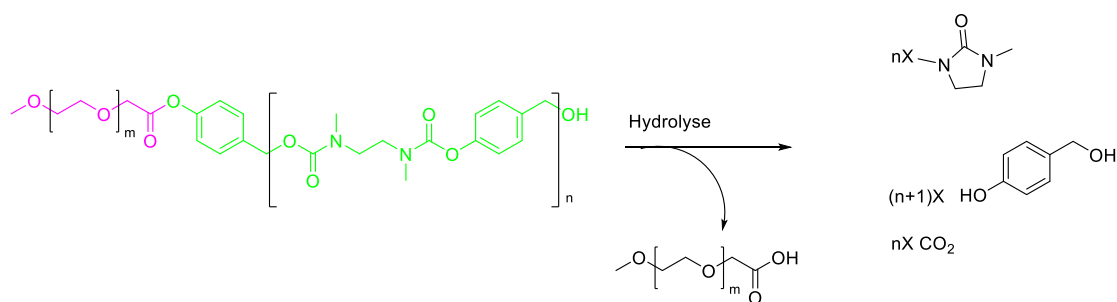


Figure 69 : Copolymères amphiphiles : mécanisme de dégradation en milieu aqueux

L'aboutissement de l'ingénierie chimique dans les polymères auto-immolables a conduit les chercheurs à façonner des micelles, des liposomes et des nanoparticules capables d'encapsuler, de transporter et de libérer la molécule d'intérêt au site souhaité. Dans la suite du présent mémoire, sera examiné, le domaine des nanovecteurs auto-immolables.

Nanoparticules

Les nanosciences constituent une science transversale, faisant appel à la chimie, la physique, la biologie, la médecine etc. Les « nanotechnologies » sont l'ensemble des techniques et moyens utilisés en nanosciences. Ainsi, les nanotechnologies peuvent être définies comme la manipulation, le contrôle et l'intégration des atomes et des molécules pour former des matériaux à l'échelle nanométrique. L'application des nanosciences en « médecine moderne » est appelée « nanomédecine ». A cet effet, des nano-outils (comme les nanovecteurs, nanoparticules) sont utilisés pour assurer le plus souvent une administration et une libération ciblées de principes actifs à des fins de diagnostic, de traitement ou de suivi.^{243,244}

Les SAI ont été utilisés pour l'ingénierie des nanovecteurs et des nanoparticules. Les nanoparticules sont diverses et variées mais les nanoparticules mésoporeuses de silice (Mesoporous Silica Nanoparticles MSN) et les nanoparticules d'or (Gold Nanoparticles) sont les plus utilisées par les chercheurs pour plusieurs raisons. En effet, elles offrent une possibilité de multi-fonctionnalisation de leur surface extérieure. De plus, pour les MSN, le réseau de silice offre un volume important permettant le chargement des molécules d'intérêt.^{243,245} C'est cette possibilité qui a été justement exploitée par les chercheurs qui ont

²⁴³ Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2008**, 1, 17–32.

²⁴⁴ Filippini, L.; Sutherland, D. **2013**.

²⁴⁵ Narayan, R.; Nayak, U.; Raichur, A.; Garg, S. *Pharmaceutics* **2018**, 10 (3), 118.

ainsi modifié les surfaces extérieures des nanoparticules, en y ajoutant des SAI, pour les rendre plus efficaces dans le transport et la libération ciblée de molécules d'intérêt.

- **Nanovéhicules, nanoréacteurs auto-immolables**

Dans les cellules cancéreuses, en particulier les monocytes et les leucocytes, les taux de peroxyde d'hydrogène sont anormalement élevés. Sur cette base, Deng *et al.* ont mis au point des nanovéhicules et des nanoréacteurs possédant une gâchette sensible au peroxyde d'hydrogène et un *linker* auto-immolable constitué d'un carbamate d'alcool 4-aminobenzyle et 4-hydroxybenzyle.²⁴⁶

Ces auteurs ont donc mis au point des nanoparticules auto-déclenchées par le peroxyde d'hydrogène. Ces nanoparticules ont la particularité de demeurer stables en l'absence de peroxyde d'hydrogène et l'auto-immolation ne se produit qu'en présence de peroxyde d'hydrogène ; ce qui entraînera une modification de la perméabilité des vésicules et donc une libération progressive du contenu de ces vésicules. Les nanoparticules de ces auteurs, en plus de contenir un SAI et une gâchette sensible au peroxyde d'hydrogène, possèdent des peptides qui assurent un ciblage des organelles, notamment les mitochondries.

Après des tests en présence de glutathion et d'autres espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux hydroxyl, *tert*-butoxy et l'anion hypochlorite, les nanoparticules de Deng *et al.* se sont révélées être stables, donc sélectives du peroxyde d'hydrogène. En outre, pendant 12 h à pH neutre, les nanoparticules sont stables. Le degré de sensibilité des vésicules au peroxyde d'hydrogène est fonction du type de gâchette Phénylboronate /Naphthylboronate (PB/NB) et de la longueur du *linker* auto-immolable. A taille du *linker* auto-immolable identique, les gâchettes de type PB ont une cinétique plus rapide que les gâchettes de type NB. Cela s'explique par le grand nombre de liaisons π dans le noyau naphthyle. Deng *et al.* ont donc développé des nanovéhicules à visée théranostique contenant des principes actifs tels que le paclitaxel, qui est hydrophobe et le chlorhydrate de doxorubicine qui est hydrophile. En effet, dans l'ingénierie de ces nanovéhicules à visée théranostique, ils ont utilisé un agent de contraste de l'imagerie par résonance magnétique qui assure un suivi non invasif de la libération des principes actifs par émission de signal quantifiable. Ils ont ainsi montré que la libération des principes actifs et l'émission de signal par résonance magnétique des vésicules

²⁴⁶ Deng, Z.; Qian, Y.; Yu, Y.; Liu, G.; Hu, J.; Zhang, G.; Liu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (33), 10452–10466.

dépendent de la présence du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, en l'absence de peroxyde d'hydrogène, le pourcentage de libération des principes actifs est inférieur à 20% tandis qu'en présence de peroxyde d'hydrogène ce pourcentage est supérieur à 90%. En présence d'activateurs, ou d'inhibiteurs d'espèces réactives de l'oxygène, le pourcentage de libération diminue ou augmente, respectivement.

En conclusion Deng *et al.* ont développé des vésicules dont la libération du contenu se fait *via* un stimulus, le peroxyde d'hydrogène. L'oxydation de ces vésicules par le peroxyde d'hydrogène se traduit par le décrochage de la gâchette reconnue spécifiquement par le peroxyde d'hydrogène d'une part, et par le désassemblage du *linker* auto-immolable [Figure 70] d'autre part. Il s'ensuit alors une inversion de polarité membranaire avec libération des substrats d'intérêt.

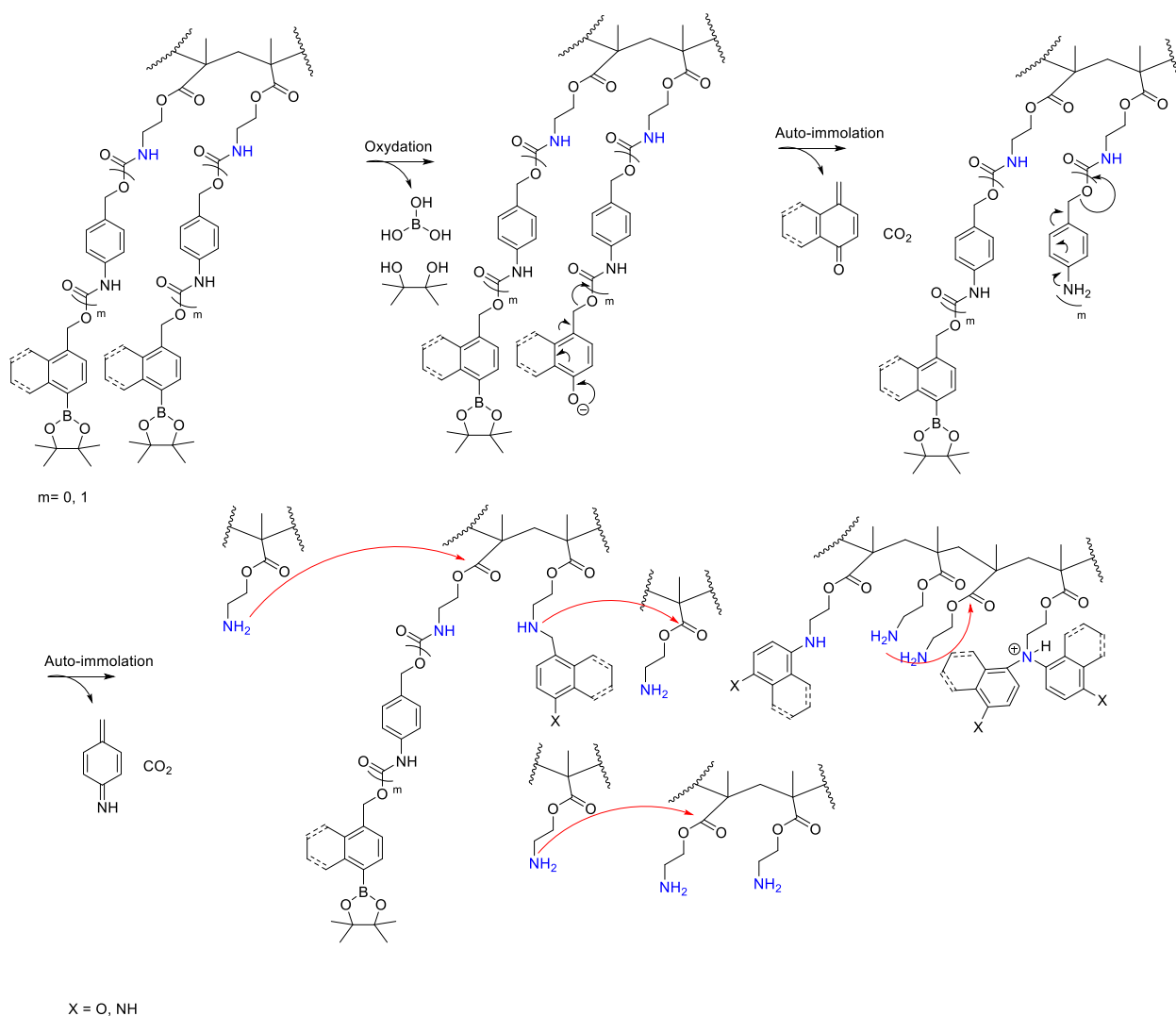


Figure 70 : Mécanisme de désassemblage des nanoparticules proposé par Deng *et al.*

Sur le même principe de fonctionnement des nanovéhicules, ces auteurs ont, par la suite, synthétisé des nanoréacteurs auto-déclenchés par le peroxyde d'hydrogène. Des analyses ont été effectuées pour confirmer la stabilité des nanoréacteurs et leur fonctionnement. Plusieurs nanoréacteurs tests ont été produits par les auteurs dont les substrats d'intérêt sont soit la 7-hydroxycoumarine, soit deux colorants le DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) de faible poids moléculaire et le Texas-Red-Dextran (TR-dextran), ou le Carboxymethyl dextran (CM-dextran). C'est ainsi que les auteurs ont constaté que leurs vésicules H₂O₂-sensibles n'émettent de fluorescence et ne colorent le noyau cellulaire qu'en présence de H₂O₂ ou de stimulateurs d'espèces réactives de l'oxygène. De même c'est seulement après oxydation que les composés soufrés comme le glutathion réduit et la cystéine peuvent pénétrer la vésicule et réduire une double liaison de CM-dextran, ce qui conduit à une émission de fluorescence. Ces résultats forts intéressants obtenus par Deng *et al.* montrent les avantages de l'utilisation des SAI dans les nanosciences.²⁴⁶

- Nanoparticules mésoporeuses de silice

Juarez *et al.* ont aussi synthétisé des nanoparticules comportant à leur surface extérieure des SAI pour une libération contrôlée et ciblée du contenu des nanoparticules.²⁴⁷ Il s'agit de nanoparticules mésoporeuses de silice (Mesoporous Silica Nanoparticles, MSN) comportant une gâchette base-labile avec un SAI qui est un carbamate d'alcool 4-hydroxybenzylique [Figure 71]. En utilisant un colorant emprisonné à l'intérieur des particules, la sulforhodamine B, et en faisant varier le pH, Juarez *et al.* ont constaté que c'est seulement en pH légèrement basique qu'il y a libération effective du contenu des particules. Cette libération se fait grâce à la déprotonation du phénol du SAI. Il se produit alors un désassemblage par un mécanisme de type 1,6-élimination. Les résultats de Juarez *et al.* viennent démontrer une fois de plus l'intérêt des SAI dans la mise au point de nanoparticules permettant la libération contrôlée et ciblée de leur contenu.²⁴⁷

²⁴⁷ Juárez, L. A.; Añón, E.; Giménez, C.; Sancenón, F.; Martínez-Mañez, R.; Costero, A. M.; Gaviña, P.; Parra, M.; Bernardos, A. Chem. - A Eur. J. **2016**, 22, 14126–14130.

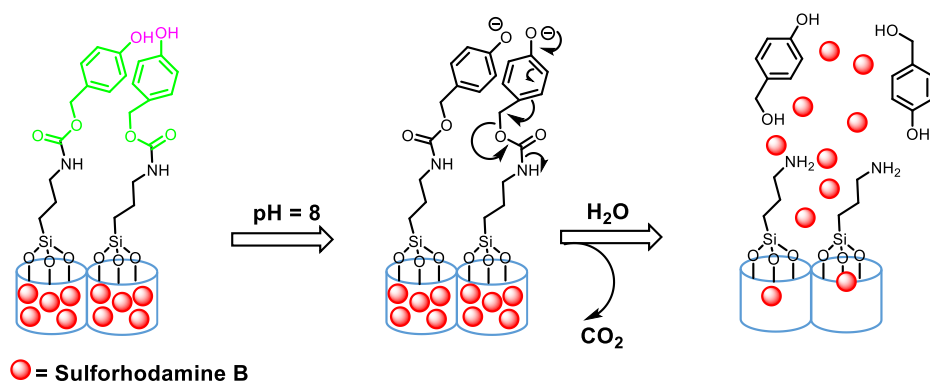


Figure 71 : Nanoparticules mésoporeuses de silice sensible au pH basique, substrat d'intérêt : sulforhodamine B

Partant du même principe que Juarez *et al*, Gisbert-Garzarán *et al*. ont aussi développé des nanoparticules mésoporeuses de silice.²⁴⁸ A la différence des premiers, les seconds ont mis à la surface extérieure de leurs nanoparticules un polymère de carbamate de 4-amino-benzyle comme SAI avec une gâchette acido-labile [Figure 72]. Ils ont ainsi chargé leurs nanoparticules de chlorure de tris-(bipyridine)-ruthénium (II). A pH neutre et à 37 °C, les nanoparticules sont stables et ne libèrent pas leur contenu tandis qu'en milieu acide à la même température, le contenu est rapidement libéré.

Cette libération est possible par décrochage du groupe protecteur, le *tert*-butoxycarbone acido-labile et auto-immolation du polymère autoimmolable. Des analyses de cytométrie en flux et de microscopie à fluorescence sur des cellules tumorales ont permis de visualiser l'internalisation des nanoparticules. Une étude de cytotoxicité a aussi été menée, à l'issue de laquelle les auteurs concluent sur une biocompatibilité des nanoparticules.²⁴⁸

²⁴⁸ Gisbert-Garzarán, M.; Lozano, D.; Vallet-Re, M.; Manzano, M. RSC Adv. **2017**, 7, 132–136.

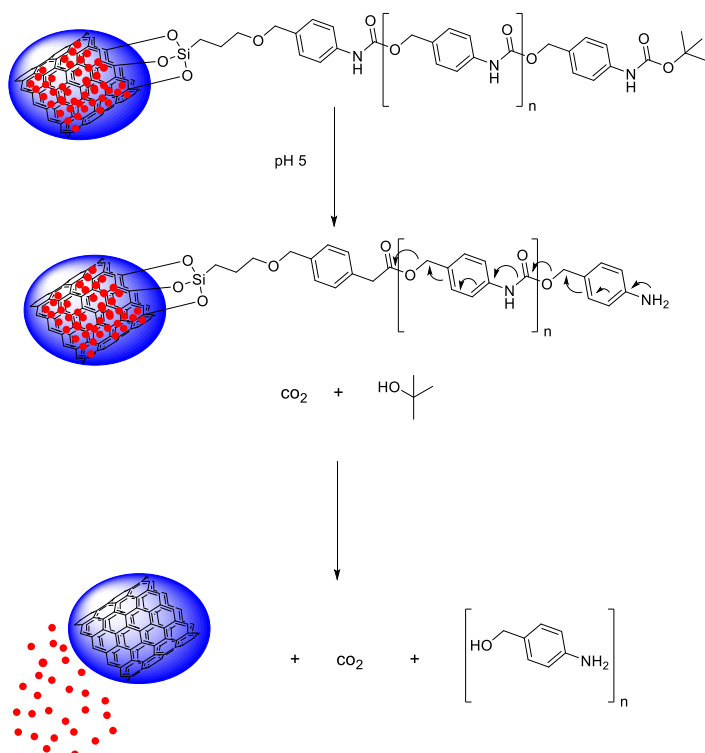


Figure 72 : Mécanisme de désassemblage : Nanoparticules mésoporeuses de silice sensibles au pH faiblement acide, substrat d'intérêt : chlorure de tris (bipyridine) ruthénium (II)

Ces travaux montrent l'avantage que revêt l'utilisation des SAI dans l'ingénierie des nanoparticules qui donne accès à plusieurs applications, tant dans l'administration contrôlée et ciblée de principes actifs ou d'agent de diagnostic, que dans le suivi de diverses pathologies.

- Nanoparticules d'or

Liu *et al.* ont développé une technique d'auto-assemblage et de désassemblage de nanoparticules d'or catalysées, respectivement, par des estérases et une protéase.²⁴⁹ Cette technique utilise un peptide comportant à chacune de ses deux extrémités un SAI connu sous le nom de « trimethyl lock ». La gâchette dans ce peptide est spécifiquement reconnue et hydrolysée par les estérases [Figure 73]. Ainsi l'auto-immolation des SAI se fait par un mécanisme de 1,5-cyclisation libérant une fonction thiol à l'une des extrémités du peptide et une fonction ammonium à l'autre extrémité.

Les agrégats de nanoparticules d'or se forment alors suite à une formation de liaison covalente entre l'or et le soufre de la fonction thiol de l'une des extrémités et une liaison ionique avec l'ammonium de l'autre extrémité. Visuellement, cela se traduit par un changement de

²⁴⁹ Liu, R.; Aw, J.; Teo, W.; Padmanabhan, P.; Xing, B. RSC Adv. **2010**, 34, 594–598.

coloration, passant ainsi du rouge au bleu. L'étape de protéolyse par la thermolysine conduit au désassemblage des nanoparticules entraînant le passage du bleu au rouge. L'avantage de cette technique est qu'elle pourrait être utilisée dans la détection de certaines enzymes ou dans le screening de nouveaux médicaments pour des applications en clinique.

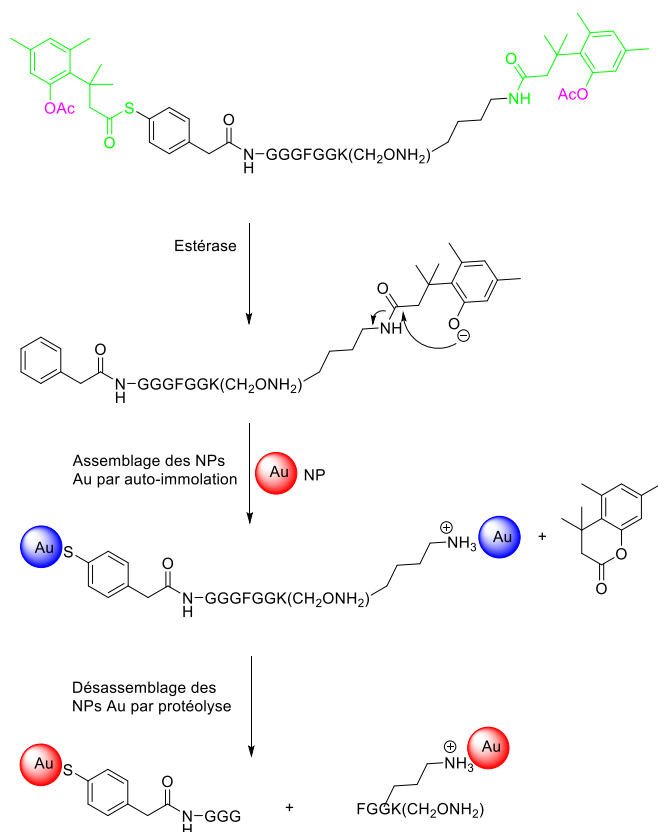


Figure 73 : Nanoparticules d'or auto-assemblage et désassemblage

Dans la conception de nanoparticules d'or pour l'administration et la libération ciblée de principes actifs anticancéreux, Latorre *et al.* ont publié une approche intéressante.²⁵⁰ En effet, ils ont conçu des nanoparticules d'or comportant en surface un agent de ciblage cellulaire l'aptamère AS1411 et chargées d'anticancéreux grâce à des SAI comportant une gâchette sensible au glutathion [Figure 74].

²⁵⁰ Latorre, A.; Posch, C.; Garcimar, Y.; Celli, A.; Sanlorenzo, M.; Vujic, I.; Ma, J.; Zekhtser, M.; Rappersberger, K.; Ortiz-Urda, S.; et al. RSC Adv. **2014**, 6, 7436–7442.

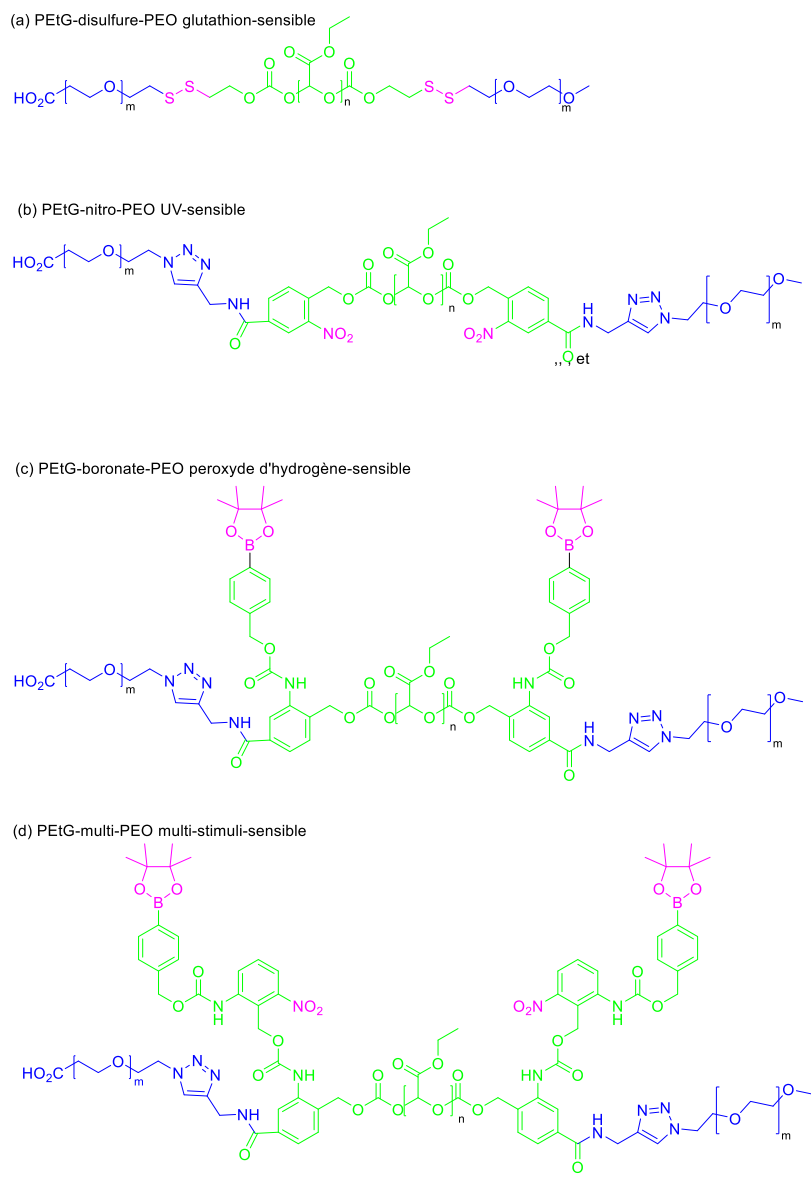


Figure 75 : Copolymères sensibles à diverses gâchettes, (a) PETG-disulfure-PEO glutathion-sensible, (b) PETG-nitro-PEO UV-sensible, (c) PETG-boronate-PEO peroxyde d'hydrogène-sensible, et (d) PETG-multi-PEO multi-stimuli-sensible

La dépolymérisation des nanoparticules a été étudiée en présence et en absence du stimulus spécifique à chaque type de gâchette. Des analyses par diffusion dynamique de lumière (Dynamic light scattering DLS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN), il ressort que la dépolymérisation est dépendante du stimulus et augmente avec sa concentration.

Par la suite, les auteurs ont testé la capacité d'encapsulation des nanoparticules ainsi que leur capacité à libérer leur contenu après activation de l'auto-immolation par le stimulus adéquat. Ainsi en encapsulant un agent de fluorescence, le Rouge Nil, de la doxorubicine et de la curcumine dans des nanoparticules, ils ont constaté que la libération du contenu des

nanoparticules a effectivement été stimulus-dépendant ; ce qui en fait des moyens efficaces pour l'administration ciblée de principes actifs et/ou d'agent de diagnostic ou encore de suivi d'une pathologie. Dans les travaux réalisés par Fan *et al*, les SAI sont, une fois de plus, utilisés pour contrôler la libération du contenu de nanoparticules.

Les SAI constituent des outils décisifs exploités par les nanosciences. Considérant les travaux de recherche déjà menés dans plusieurs domaines dont les résultats sont rapportés plus haut, le constat est que les SAI sont des outils incontournables même dans les nanotechnologies.²⁵³

- **Nanoparticules**

Toujours dans le domaine de conception de nanoparticules comme moyen de ciblage efficace de principes actifs, Jäger *et al*. ont mis au point des nanoparticules sensibles aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) en général et au peroxyde d'hydrogène en particulier.²⁵⁴ Ces nanoparticules sont capables de transporter et libérer, dans le tissu souhaité, le principe actif désiré ou un agent fluorescent à but diagnostique. Ils ont synthétisé un polymère noté P1 comportant un SAI qui est constitué d'une gâchette de type pinacol-boronate sensible au peroxyde d'hydrogène, et un polymère auto-immolable contenant les noyaux *para*-hydroxyméthyl-phénol et *ortho*-hydroxyméthyl-phénol [Figure 76].

Ainsi, en présence de peroxyde d'hydrogène, les auteurs observent effectivement le désassemblage du polymère P1. Jäger *et al*. ont par la suite synthétisé des nanoparticules à partir du polymère P1 et à partir d'un polymère P2 qui est, quant à lui, non sensible au peroxyde d'hydrogène. Les analyses de diffusion dynamique de lumière et de microscopie par transmission électronique des nanoparticules après exposition au peroxyde d'hydrogène montrent que les nanoparticules issues de P1 sont dégradées, preuve de leur sensibilité au peroxyde d'hydrogène.

L'encapsulation de Rouge Nil dans les deux types de nanoparticules a permis de confirmer, en présence de peroxyde d'hydrogène, la dégradation 6 fois plus rapide des nanoparticules P1 que celle des nanoparticules P2. La capacité de libération du contenu des nanoparticules P1 a

²⁵³ Gisbert-Garzarán, M.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. *Chem. Eng. J.* **2018**, 340 (December 2017), 24–31.

²⁵⁴ Jäger, E.; Höcherl, A.; Janoušková, O.; Jäger, A.; Hrubý, M.; Konefał, R.; Netopilik, M.; Pánek, J.; Šlouf, M.; Ulbrich, K.; et al. *RSC Adv.* **2016**, 8, 6958–6963.

été mesurée dans des cellules cancéreuses prostatiques (PC-3) et dans des cellules fibroblastiques saines (HF). Dans les cellules prostatiques cancéreuses, il y a surproduction de peroxyde d'hydrogène. L'étude comparative montre que les nanoparticules P1 se désassemblent plus rapidement dans les cellules prostatiques cancéreuses (PC) que dans les fibroblastes humains (FH) : ceci est une preuve de la libération ciblée de ces nanoparticules P1.

Les auteurs ont, à la suite de cette expérience, encapsulé un anticancéreux, le paclitaxel, dans les deux types de nanoparticules afin d'étudier sa libération. Tout comme le Rouge Nil, la libération du paclitaxel en présence de peroxyde d'hydrogène est plus rapide lorsqu'il s'agit des nanoparticules P1. La cytotoxicité des nanoparticules P1 et P2 contenant du paclitaxel a été étudiée et comparée dans plusieurs types de cellules cancéreuses. Il en ressort que les nanoparticules P1 contenant du paclitaxel ont une toxicité supérieure.²⁵⁴ Cela pourrait s'expliquer non seulement par la libération du paclitaxel après auto-immolation mais aussi par les intermédiaires de l'auto-immolation du SAI. En effet la toxicité de certains sous-produits d'auto-immolation comme la quinone méthylène a été rapportée dans des publications.²²⁸

Les travaux de Jäger *et al*, montrent une fois de plus une utilisation efficace des SAI dans l'ingénierie des nanoparticules. Ces auteurs ont réussi la mise au point de nanoparticules qui sont des candidats potentiels pour l'administration ciblée de médicaments anticancéreux ; ce qui réduirait les effets indésirables et augmenterait l'efficacité de ces médicaments.

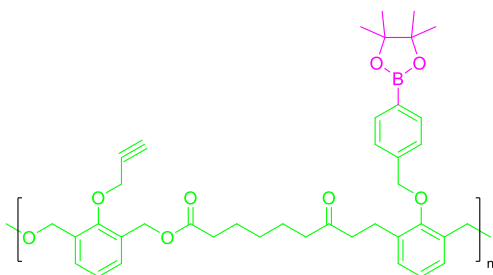


Figure 76 : Polymère P1

De cette étude il résulte que les SAI ont été judicieusement exploités par les nanotechnologies qui, du reste, constituent un domaine moderne, avec un vaste potentiel encore inexploité. A ce titre, plusieurs brevets avec des SAI sont référencés.^{255–258}

4. Conclusion sur les SAI

Dans leur principe de fonctionnement les SAI permettent une libération sans résidu du substrat d'intérêt par deux mécanismes principaux, la cyclisation et l'élimination avec formation de structures thermodynamiquement stables. Ils sont largement utilisés dans les domaines de l'administration ciblée de principes actifs, dans l'ingénierie des sondes pour l'imagerie médicale, dans l'amplification de signal et même dans les nanotechnologies. Les premiers SAI apparus procédaient soit par une seule réaction d'élimination, soit par une seule réaction de cyclisation. Depuis, les chercheurs ont développé des SAI plus complexes dans leurs structures mais plus enrichissants dans leurs applications. Il s'agit des oligomères, des dendrimères et des polymères auto-immolables qui procèdent alors par plusieurs réactions d'élimination et/ou de cyclisation successives pour libérer le ou les substrats d'intérêt. Dans le contexte actuel de l'essor des nanosciences, les polymères auto-immolables constituent une chimie particulièrement intéressante dans la mise au point de nanoparticules capables d'auto-désassemblage pour diverses applications. Avec des domaines d'applications diversifiés, les SAI s'imposent de plus en plus comme des outils incontournables dans les synthèses de prodrogues, de nanoparticules, de sondes de détection pour des applications dans les sciences biomédicales et d'autres domaines comme l'écotoxicologie. L'intérêt croissant des chercheurs pour les SAI se traduit par une augmentation, chaque année, du nombre de publications d'articles scientifiques sur leur exploitation dans divers domaines. Les chercheurs n'ont certainement pas fini d'exploiter le potentiel des SAI.

Dans l'équipe du professeur Frédéric Fabis, au Centre d'Etudes et de Recherche sur le médicament de Normandie, lors de la recherche d'une méthode d'acylation sélective d'ARN,

²⁵⁵ WIDDISON, W. C. **WO2018160539A1, 2018.**

²⁵⁶ Lin, R.-H.; Lin, S.-Y.; Hsieh, Y.-C.; Huang, C.-C. **WO 2014:100762 A9, 2014.**

²⁵⁷ KOLAKOWSKI, Robert, JEFFREY, Scott, BURKE, P. **WO 2015:095755 A1, 2015.**

²⁵⁸ Steinkuhler M Christian, Gallinari M Paola, Osswald Bianca, Sewald Norbert, Ritzefeld Markus, Frese Marcel, Figueras Eduard, P. L. **EP3069734A1, 2016.**

des dérivés isatoïques et azaisatoïques auto-immolables.^{259,260} De ces dérivés découle une triple plateforme de capture, clivage et libération de nucléophile d'intérêt [Figure 77]. L'objectif principal de cette thèse est d'appliquer cette triple plateforme à la détection de VanX.

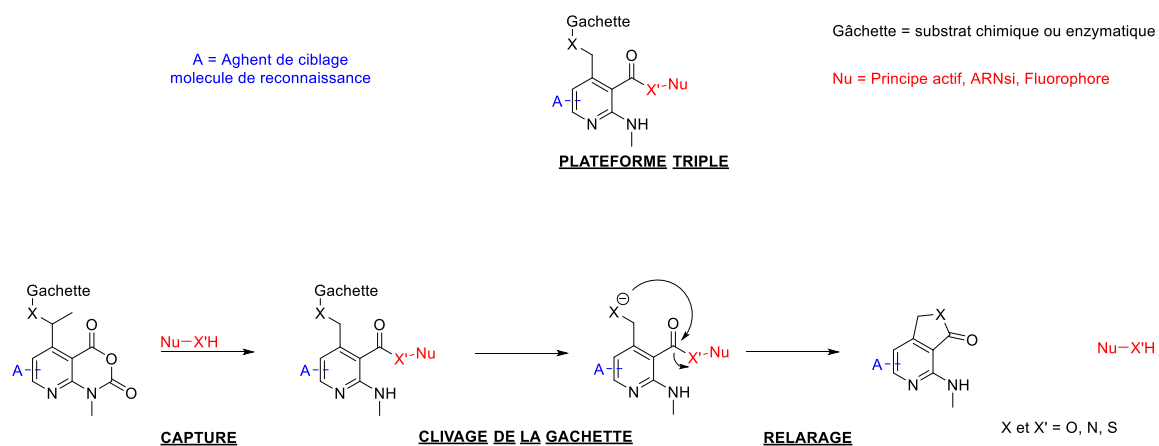


Figure 77 : Plateforme triple pour la capture, clivage et le libération d'un nucléophile d'intérêt (d'après [261])

²⁵⁹ Thomas Cailly, Caen (FR); Frédéric Fabis, Mathieu (FR); Ali Laayoun, La Frette (FR); Alain Laurent, Grenoble (FR); Sylvain Ursuegui, C. (FR). Biological Molecules Thus Treated and Kits, July 26, **2013**.

²⁶⁰ Ursuegui, S.; Yougnia, R.; Moutin, S.; Burr, A.; Fossey, C.; Cailly, T.; Laayoun, A.; Laurent, A.; Fabis, F. Org. Biomol. Chem **2015**, 13, 3625.

Chapitre 3 : Synthèse de dérivés nicotines auto-immolables en vue de la détection de l'activité D-Ala-D-Ala dipeptidase de vanX

Chapitre 3 : Synthèse de dérivés nicotines auto-immolables en vue de la détection de l'activité D-Ala-D-Ala dipeptidase de vanX

1. Objectifs de la thèse

Les travaux de cette thèse se situent à l'interface de la microbiologie et de la chimie ; ce qui explique les objectifs dans ces deux domaines. L'objectif principal de cette thèse est de mettre au point une méthode de détection rapide de la résistance à la vancomycine en particulier et aux glycopeptides en général, par libération d'un chromophore. Un diagnostic rapide de la résistance permet une prise en charge rapide du patient et évite une expansion de l'infection à souche résistante aux glycopeptides. Pour développer cette méthode, nous nous sommes basés sur des travaux antérieurs de l'une des trois thématiques du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN). Il s'agit de la thématique « Outils chimiques pour le diagnostic et l'imagerie ». Ces travaux avaient permis de mettre en lumière une triple plateforme de capture, clivage, libération de nucléophile d'intérêt.²⁶¹ En appliquant cette triple plateforme à la détection de la résistance à vancomycine, le nucléophile d'intérêt sera un chromophore et la « *gâchette* » sera le dipeptide D-Ala-D-Ala substrat naturel de VanX. La détection de la résistance à la vancomycine se fera alors par mise en évidence de l'activité D-Ala-D-Ala dipeptidase de VanX [Figure 78]. La détection de l'activité se fait par la libération d'un chromophore après une réaction d'auto-immolation avec émission de coloration. Nous avons précédemment expliqué que VanX joue un rôle crucial dans la manifestation de la résistance à la vancomycine, et que ce phénotype existe dans tous les opérons *van*, ce qui fait de la protéine VanX une bonne cible pour la détection de la résistance aux glycopeptides. Les manipulations en microbiologie sont de l'ordre du génie génétique et ont pour but de cloner et d'exprimer cette protéine VanX. Les manipulations en chimie visent, dans un premier temps, à apporter la preuve du concept proposé et dans un second temps à synthétiser des prochromophores auto-immolables dans lesquelles la « *gâchette* » sera le substrat naturel de VanX, le dipeptide D-Ala-D-Ala.

²⁶¹ Ursuegui, S. Université de Caen Basse-Normandie, 2013.

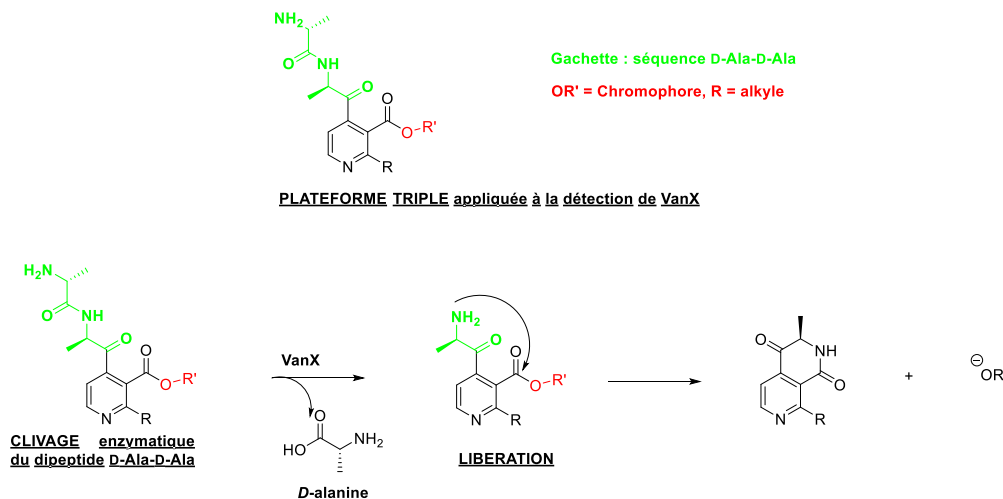


Figure 78 : Plateforme triple appliquée à la détection rapide de VanX

2. Clonage, surexpression et évaluation enzymatique de la protéine recombinante d'intérêt

Le clonage du gène *vanX* a été effectué dans deux vecteurs différents. Le clonage dans le vecteur pQE30 conduit à l'expression d'une protéine VanX avec un tag de 6 Histidines, cette protéine sera notée 6xHis-VanX. Le clonage dans le vecteur pETSUMO conduit à une protéine VanX native après SUMO-protéolyse et cette protéine recombinante sera notée VanX.

2.1. Clonage, expression, évaluation enzymatique de 6His-VanX

Amplification du gène vanX

Pour obtenir la protéine recombinante VanX, nous avons amplifié le gène *vanX* à partir de l'ADN de deux entérocoques (*E. faecium vanA+*, *E. faecium vanB+*) provenant du CNR entérocoque France. Au préalable, l'extraction de l'ADN de ces bactéries a été effectuée grâce à l'automate NucliSens™ Easy Mag de chez BioMerieux®. Cet automate assure une extraction efficace de l'ADN avec d'excellents rendements. L'amplification du gène *vanX* d'*E. faecium vanA+*, avec les amorces vanX-SacI-F (amorce sens) et vanX-Sall-R (amorce antisens), a permis d'obtenir l'amplicon désiré, contrairement à l'amplification du gène *vanX* d'*E. faecium vanB+*. Les amorces vanX-SacI-F et vanX-Sall-R donnent après amplification un amplicon *vanX* possédant des sites spécifiques pour l'étape de digestion par les enzymes de restrictions SacI-HF et Sall-HF. L'amplicon obtenu a été détecté à un poids moléculaire légèrement au-dessus de 500 pb après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%, ce qui est concordant avec la taille théorique de l'amplicon qui est de 637 pb [Figure 79].

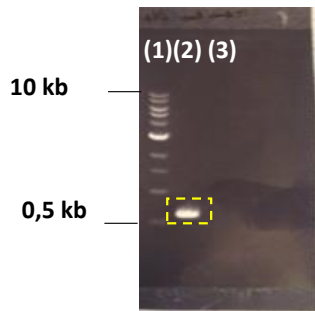


Figure 79 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% : (1) Marqueur de taille 0,5-10 kb, (2) amplicon *vanX* de *E. faecium* *vanA*, (3) absence de produit PCR de l'amplification de *E. faecium* *vanB*

Double digestion, ligation, clonage et séquençage

Pour procéder au clonage du gène d'intérêt, le plasmide pQE30 a été choisi [Figure 80]. Il possède des sites spécifiques reconnus par divers enzymes de restriction et un marqueur de sélection, la résistance à l'ampicilline qui permet une sélection des clones. Ce plasmide pQE30 et le gène *vanX* ont été digérés par des enzymes de restriction HF (High Fidelity) *Sall*-HF et *SacI*-HF. La double digestion de plasmides a deux avantages majeurs qu'il convient de rappeler : le premier c'est qu'elle permet la ligation de l'insert préalablement digéré avec les mêmes enzymes de restrictions selon l'orientation appropriée. Le deuxième avantage est que, la double digestion évite les auto-ligations du fait que les deux extrémités ne soient pas compatibles. L'étape de double digestion de pQE30 et *vanX* est suivie des étapes de ligation et d'électroporation dans les *E. coli* DH10B. Les souches d'*E. coli* DH10B ont été inoculées à 1% dans un milieu de culture LB avec de l'ampicilline 100 µg/mL, incubées à 37 °C, sous agitation pendant 4h30. La sélection de clones a été effectuée sur gélose LB avec l'ampicilline 100 µg/mL à 37 °C. Après 24 à 48 h d'incubation, plusieurs colonies contenant la construction pQE30Ω*vanX* sont isolées et confirmées par une PCR sur colonies avec les amorces pQE30-F et pQE30-R. L'amplicon d'une taille de 989 pb est détecté vers 1000 pb après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% [Figure 81].

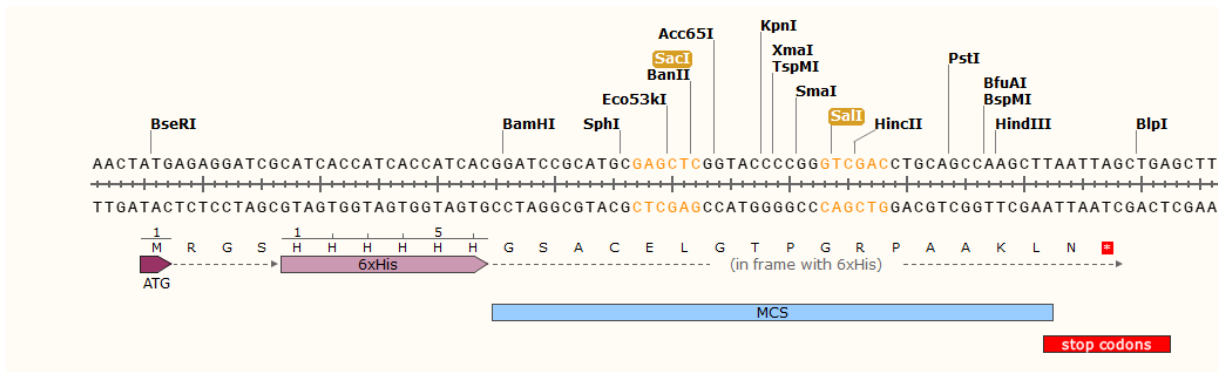
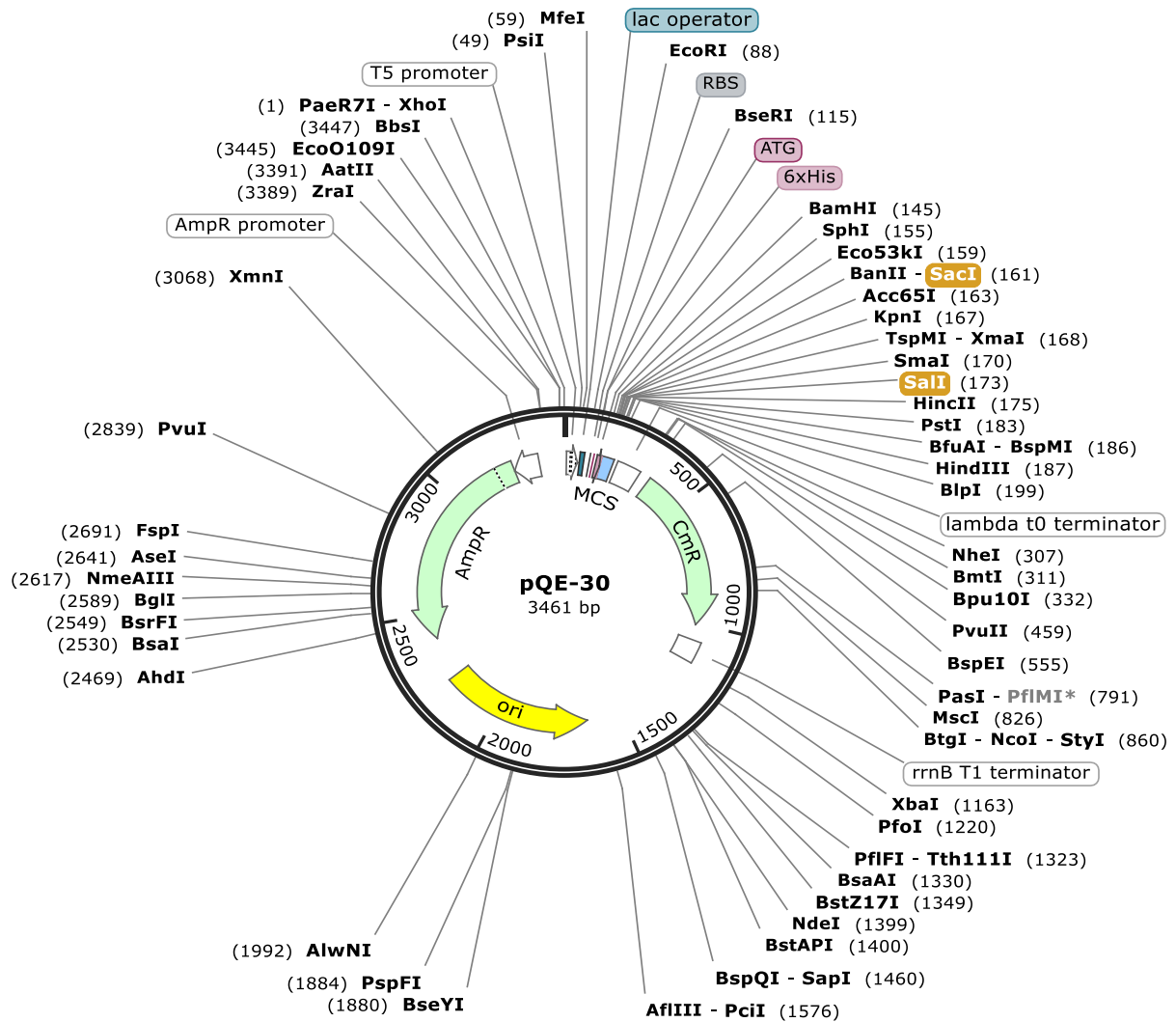


Figure 80 : Carte du vecteur pQE30 et site de clonage multiple (sites de restriction enzymatique utilisés, mis en évidence en orange) [<https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/>]

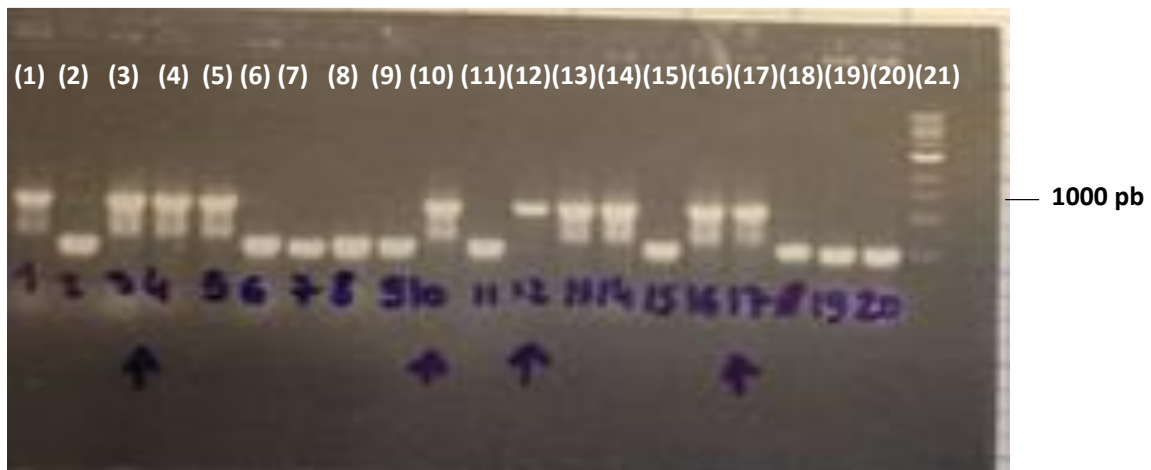


Figure 81 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% : (21) Marqueur de taille 0,5-10 kb PCR sur colonies positives dans les puits 1, 3, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 16,17, PCR sur colonies négatives dans les puits 2, 6, 7, 8, 9, 11, 15, 18-20

Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été extrait et une étape d'électroporation dans des cellules compétentes M15 pREP4 a été effectuée. Ces souches contiennent le plasmide pREP4 qui possède le gène *lacI* dont l'expression protéique donne un répresseur qui régule la transcription du plasmide pQE30 par fixation sur les sites opérateurs *lacO* de celui-ci [Figure 82]. Le plasmide pREP4 possède aussi un marqueur de sélection, à savoir une résistance à la kanamycine. Ainsi, après l'électroporation, une dizaine de colonies contenant le plasmide recombinant ont été isolées sur un milieu sélectif LB avec de l'ampicilline (100 µg/mL) et de la kanamycine (25 µg/mL) [Figure 83].

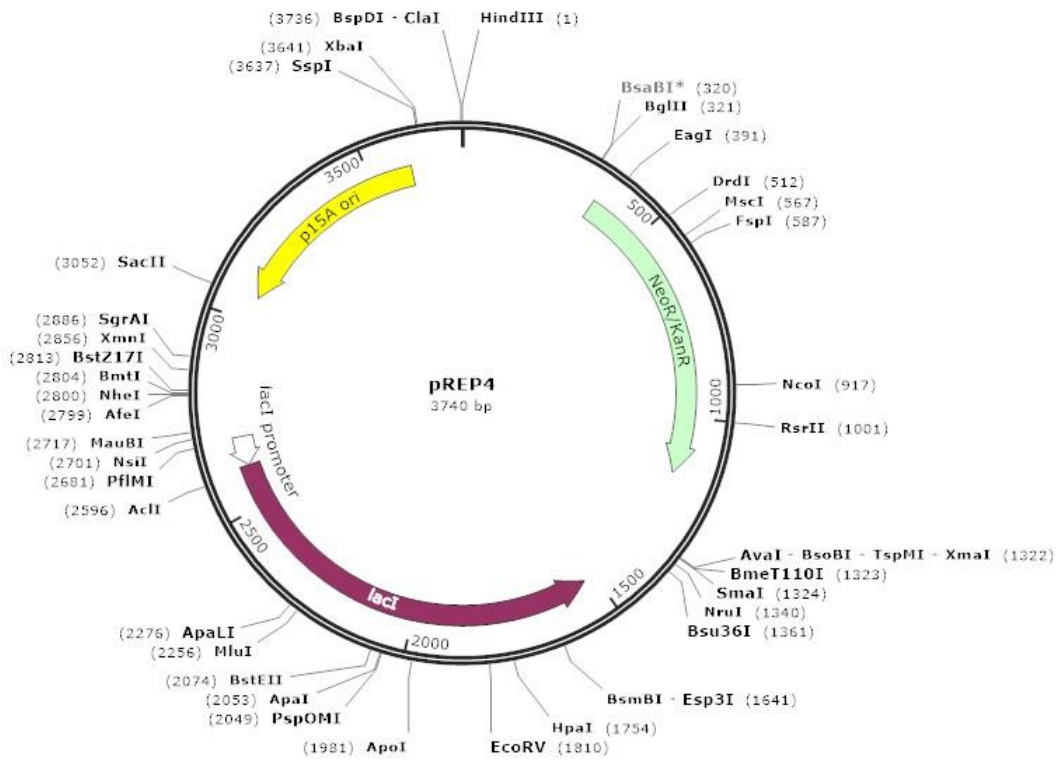


Figure 82 : Carte du plasmide pREP4 avec les gènes *lacI* et de résistance à la kanamycine <https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/>

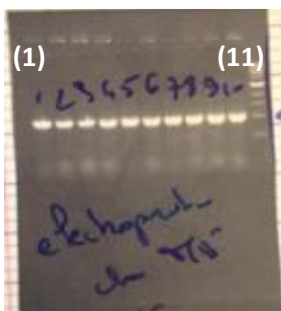


Figure 83 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% : (11) Marqueur de taille 0,5-10 kb, PCR sur plasmides issues de colonies positives dans les puits 1-10

Avant toute étape de surexpression protéique, un séquençage de l'amplicon issu de la PCR à partir de colonies positives M15 pREP4 avec les amorces pQE30-F et pQE30-R a été effectué. Les résultats de ce séquençage indiquent qu'aucune mutation n'est apparue lors des étapes de clonage, et la séquence obtenue est identique à la séquence du gène *vanX* [Figure 84] présent au sein du transposon Tn1546 d'*E. faecium* [Figure 85].

>Contig_sequence-obtenue

GGCGTATCAGGAGGGCCCTTTCGTCTTCACCTCGAGAAATCATAAAAATTTATTTGCTT
TGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACATGAGAGG
ATCGCATCACCATCACCATCAGGATCCGCATGCAGCTCATGGAAATAGGATTTACTTT
TTTAGATGAAATAGTACACGGTGTTCGTGGGACGCTAAATATGCCACTTGGGATAATTT
CACCGAAAACCGGTTGACGGTTATGAAGTAAATCGCATTGTAGGGACATACGAGTTGGC
TGAATCGCTTTTGAAGGCAAAAGAACTGGCTGCTACCCAAGGGTACGGATTGCTTCTATG
GGACGGTTACCGTCCTAAGCGTGCTGTAAACTGTTTTATGCAATGGGCTGCACAGCCGGA
AAATAACCTGACAAAGGAAAGTTATTATCCCAATATTGACCGAACTGAGATGATTTCAA
AGGATACGTGGCTTCAAAATCAAGCCATAGCCGCGGCAGTGCCATTGATCTTACGCTTTA
TCGATTAGACACGGGTGAGCTTGTACCAATGGGGAGCCGATTTGATTTTATGGATGAACG
CTCTCATCATGCGGCAAAATGGAATATCATGCAATGAAGCGCAAAATCGCAGACGTTTGGC
CTCCATCATGGAAAACAGTGGGTTTGAAGCATATAGCCTCGAATGGTGGCACTATGTATT
AAGAGACGAACCATAACCCAATAGCTATTTGATTTCCCCGTTAAATAACGTCGACTG
CAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGA
ACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAA
TCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAATGGAGAAAAAATCA
CTGGATATACCACGGTTGATATATCCCAA

Légende :

ATG : codon start

CATCAC : Séquence
codant 6-His

GAGCTC : Séquence
codant sites de
restriction enzymatique

TAAGCG : Séquence
codant VanX

Séquence théorique de vanX

ATGGAAATAGGATTTACTTTTTTAGATGAAATAGTACACGGTGTTCGTGGGACGCTAAATATGCCACTT
GGGATAATTTACCGGAAAACCGGTTGACGGTTATGAAGTAAATCGCATTGTAGGGACATACGAGTTGGC
TGAATCGCTTTTGAAGGCAAAAGAACTGGCTGCTACCCAAGGGTACGGATTGCTTCTATGGGACGGTTAC
CGTCTAAGCGTGCTGTAAACTGTTTTATGCAATGGGCTGCACAGCCGAAAATAACCTGACAAAGGAAA
GTTATTATCCCAATATTGACCGAACTGAGATGATTTCAAAGGATACGTGGCTTCAAAATCAAGCCATAG
CCGCGGCAGTGCCATTGATCTTACGCTTTATCGATTAGACACGGGTGAGCTTGTACCAATGGGGAGCCGA
TTTGTATTTATGGATGAACGCTCTCATCATGCGGCAAAATGGAATATCATGCAATGAAGCGCAAAATCGCA
GACGTTTGCCTCCATCATGGAAAACAGTGGGTTTGAAGCATATAGCCTCGAATGGTGGCACTATGTATT
AAGAGACGAACCATAACCCAATAGCTATTTGATTTCCCCGTTAAATAA

Figure 84 : Séquence obtenue et séquence théorique de vanX

Enterococcus faecium strain V346 transposon Tn1546, partial sequence

Sequence ID: KX530812.1 Length: 11331 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1131 bits(612)	0.0	612/612 (100%)	0/612 (0%)	Plus/Plus
Query 160	CATGGAAATAGGATTTACTTTTTTAGATGAAATAGTACACGGTGTTCGTTGGGACGCTAA			219
Sbjct 8716	CATGGAAATAGGATTTACTTTTTTAGATGAAATAGTACACGGTGTTCGTTGGGACGCTAA			8775
Query 220	ATATGCCACTTGGGATAATTTACCCGAAAACCGGTTGACGGTTATGAAGTAAATCGCAT			279
Sbjct 8776	ATATGCCACTTGGGATAATTTACCCGAAAACCGGTTGACGGTTATGAAGTAAATCGCAT			8835
Query 280	TGTAGGGACATACGAGTTGGCTGAATCGCTTTTGAAGGCAAAGAAGTGGCTGCTACCCA			339
Sbjct 8836	TGTAGGGACATACGAGTTGGCTGAATCGCTTTTGAAGGCAAAGAAGTGGCTGCTACCCA			8895
Query 340	AGGGTACGGATTGCTTCTATGGGACGGTTACCGTCTAAGCGTGCTGTAAACTGTTTTAT			399
Sbjct 8896	AGGGTACGGATTGCTTCTATGGGACGGTTACCGTCTAAGCGTGCTGTAAACTGTTTTAT			8955
Query 400	GCAATGGGCTGCACAGCCGAAAATAACCTGACAAAGGAAAGTTATTATCCCAATATTGA			459
Sbjct 8956	GCAATGGGCTGCACAGCCGAAAATAACCTGACAAAGGAAAGTTATTATCCCAATATTGA			9015
Query 460	CCGAACTGAGATGATTTCAAAGGATACGTGGCTTCAAATCAAGCCATAGCCGCGGCAG			519
Sbjct 9016	CCGAACTGAGATGATTTCAAAGGATACGTGGCTTCAAATCAAGCCATAGCCGCGGCAG			9075
Query 520	TGCCATTGATCTTACGCTTTATCGATTAGACACGGGTGAGCTTGTACCAATGGGGAGCCG			579
Sbjct 9076	TGCCATTGATCTTACGCTTTATCGATTAGACACGGGTGAGCTTGTACCAATGGGGAGCCG			9135
Query 580	ATTTGATTTTATGGATGAACGCTCTCATCATGCGGCAAATGGAATATCATGCAATGAAGC			639
Sbjct 9136	ATTTGATTTTATGGATGAACGCTCTCATCATGCGGCAAATGGAATATCATGCAATGAAGC			9195
Query 640	GCAAAATCGCAGACGTTTGCCTCCATCATGGAAAACAGTGGGTTTGAAGCATATAGCCT			699
Sbjct 9196	GCAAAATCGCAGACGTTTGCCTCCATCATGGAAAACAGTGGGTTTGAAGCATATAGCCT			9255
Query 700	CGAATGGTGGCACTATGTATTAAGAGACGAACCATACCCCAATAGCTATTTTGATTTCCC			759
Sbjct 9256	CGAATGGTGGCACTATGTATTAAGAGACGAACCATACCCCAATAGCTATTTTGATTTCCC			9315
Query 760	CGTTAAATAAAC 771			
Sbjct 9316	CGTTAAATAAAC 9327			

Figure 85 : Résultat du séquençage des souches M15 pREP4 transformées : Alignement de séquence sur <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Surexpression protéique évaluation enzymatique

Pour la surexpression de la protéine recombinante, une culture bactérienne a été réalisée en milieu liquide BHI (Brain Heart Infusion) supplémenté avec de l'ampicilline (100 µg/mL) et de la kanamycine (25 µg/mL), en conditions d'aérobies, sous agitation (200 rpm) à 37°C. Une fois que la densité optique de la culture bactérienne à 600nm (DO₆₀₀) se situe entre 0.5 et 0.8, de l'IPTG (1 mM) (isopropyl-β-D-thiogalactoside) a été ajouté pour induire

l'expression du gène codant la protéine recombinante VanX. En absence d'allolactose qui est un métabolite du lactose, le gène régulateur *lacI* code le répresseur LacI qui se lie spécifiquement aux sites *lacO* du pQE30, empêchant ainsi l'initiation de la transcription. L'IPTG est un analogue de l'allolactose et permet de lever cette inhibition. Après 4 h d'induction, la culture a ensuite été récupérée dans des tubes de 50 mL, centrifugée à 4000 x *g* pendant 15 minutes à 4°C et congelée à -20°C pour la purification de la protéine. Une fraction de 10µL est échantillonnée avant et après l'induction par IPTG pour une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE).

Le vecteur pQE30 contient une séquence codante pour le motif 6-Histidine et assure ainsi l'expression de protéines recombinantes possédant ce motif 6xHis. La purification de la protéine recombinante est ainsi facilitée, puisqu'elle passe par une colonne de résine Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic). La protéine recombinante 6xHis-VanX se fixe spécifiquement à la résine Ni-NTA, tandis que le reste du protéome bactérien est élué par des lavages avec des tampons. Un tampon d'éluion en condition native du kit Ni-NTA Fast Start (QIAGEN) permet l'éluion de la protéine recombinante 6xHis-VanX. Afin d'éliminer d'éventuels sels ou contaminants protéiques une étape d'ultrafiltration sur microcon® 10K a été réalisée. Le filtre microcon® 10K permet la rétention de plus de 95% de protéine de taille comprise entre 12400 Da et 25000 Da. Le poids moléculaire théorique de VanX étant de 23400 Da, elle est donc efficacement retenue par le filtre. La quantité de protéine a été déterminée par la méthode de dosage de Bradford [Tableau 3].²⁶² Cette méthode est un dosage colorimétrique par spectrophotométrie avec le réactif de Bradford (Bleu de Coomassie + éthanol + acide phosphorique). Le bleu de Coomassie sous sa forme anionique se complexe aux noyaux des acides aminés aromatiques et aux acides aminés basiques, aboutissant à une coloration bleue. Le pic d'absorbance de la forme anionique est à une longueur d'onde de 595 nm. Une fois la quantité de protéine connue, la protéine a ensuite été lyophilisée puis congelée à -80 °C pour les étapes d'évaluation d'activité enzymatique. Un échantillonnage des différentes étapes de purification et d'ultrafiltration a été effectué. Après dilution au demi de chaque échantillon avec un tampon de dépôt pour SDS-PAGE, ces échantillons ont été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE à 12 %. La protéine 6xHis-VanX de poids moléculaire théorique 25179 Da, est détectée entre 17 et 28kDa avec une haute pureté; la bande étant unique

²⁶² Bradford, M. M. Anal. Biochem. **1976**, 72 (1–2), 248–254.

[Figure 86]. L'électrophorèse révèle une possible polymérisation de la protéine recombinante après l'étape de concentration sur microcon 10K, par la présence de deux autres bandes supplémentaires respectivement aux environ de 50 kDa, et de 98 kDa [Figure 86]. Ces dernières bandes semblent correspondre respectivement à des dimères et à des tétramères de 6xHis-VanX. En effet VanX peut se polymériser lorsque sa concentration est élevée.²⁶³

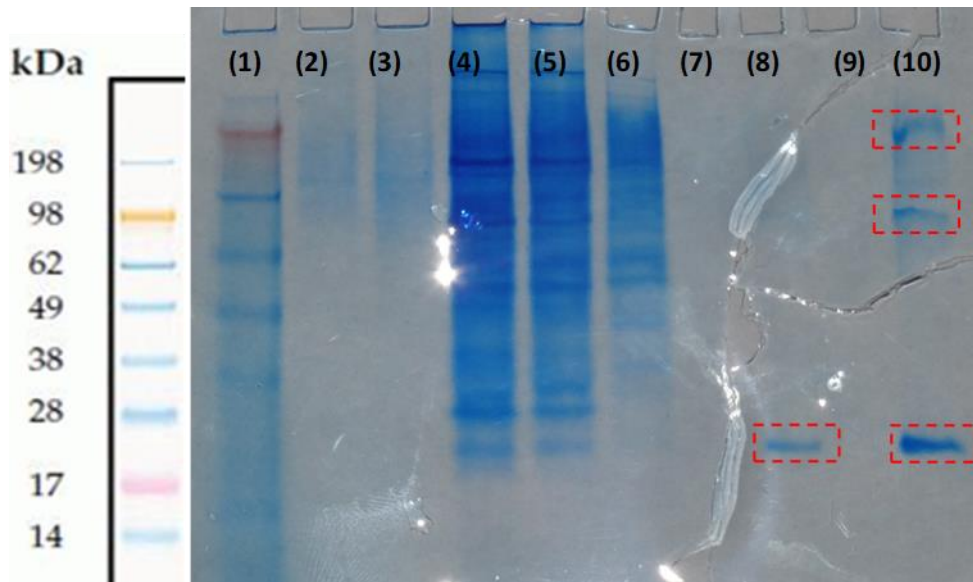


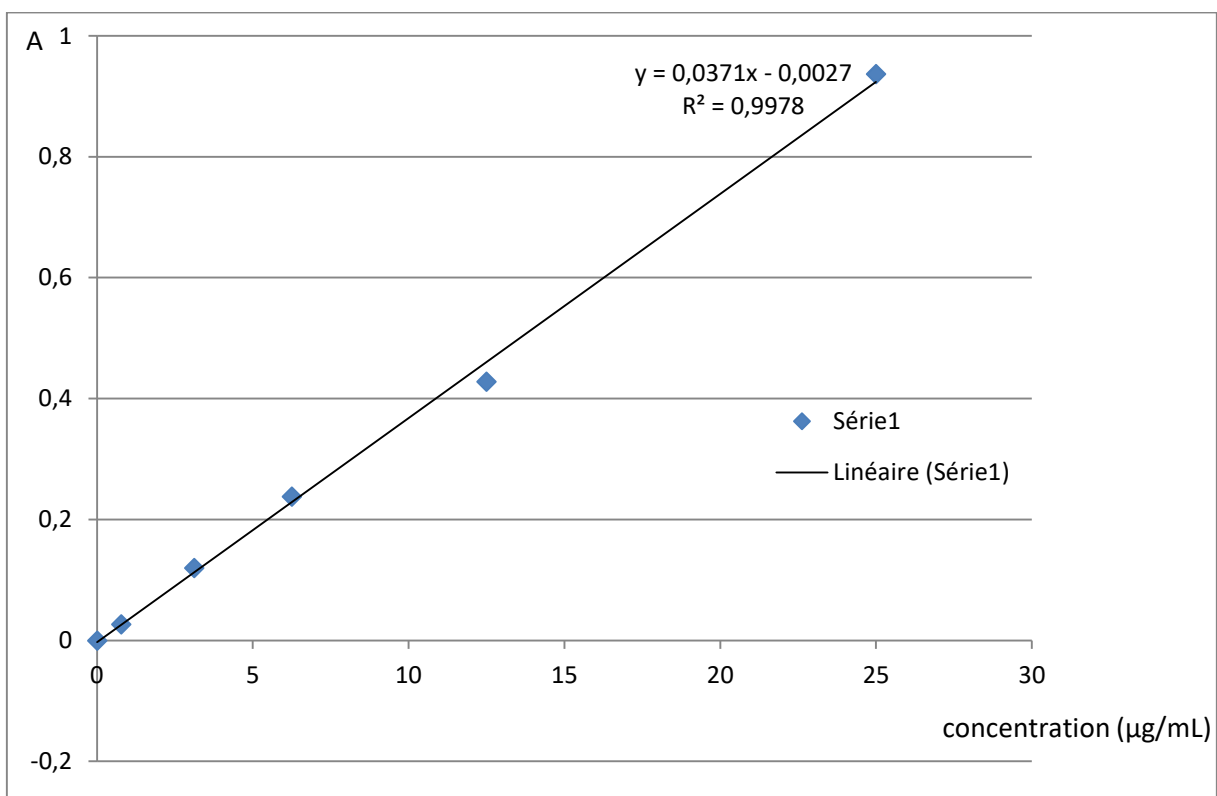
Figure 86 : (1) marqueur de poids moléculaire, (2) avant induction, (3) après induction, (4) surnageant, (5) première élution après dépôt du surnageant, (6) premier lavage, (7) second lavage, (8) première élution de 6xHis-VanX, (9) seconde élution de 6xHis-VanX, (10) après ultrafiltration sur microcon

²⁶³ Breece, R. M. Miami University, 2004.

Afin de disposer de suffisamment de protéine recombinante 6xHis-VanX pour l'évaluation de son activité enzymatique plusieurs surexpressions protéiques ont été effectuées selon le même protocole [Tableau 3].

Tableau 3 : Dosage protéique par la méthode de Bradford

Gamme	1	2	3	4	5	6	6xHis-VanX (µg/mL)			
BSA 100µg/mL (µL)	0	6,25	25	50	100	200	0			
Réactif de Bradford (µL)	200						200			
H ₂ O stérile distillée (µL)	qsp 800						760			
Absorbance	0	0,027	0,12	0,238	0,428	0,937	0,38			
Concentrations (µg/mL)	0	0,78	3,12	6,25	12,5	25	10,31	4,6	6,04	5,14



Droite 1 : Droite d'étalonnage du dosage protéique par la méthode de Bradford (A = Absorbance)

Evaluation de l'activité enzymatique

VanX est une D-Ala-D-Ala dipeptidase zinc-dépendant. En considérant sa structure cristalline publiée par Bussière et *al.* (1998),²⁶⁴ le site actif de VanX contient un cation Zn^{2+} . Le cation Zn^{2+} de représentation tétraédrique développe deux liaisons avec deux histidines (His-116 et His-184), une liaison avec un acide aspartique (Asp-123) et une liaison avec une molécule d'eau.²⁶⁴ Afin de mettre le cation Zn^{2+} dans le site actif de la protéine recombinante 6xHis-VanX, nous avons utilisé les conditions proposées par Wu et *al.*²⁶⁵ La protéine recombinante a été mise en solution dans un tampon phosphate à pH 7,4 avec $ZnCl_2$ 7,5 mM. Pour évaluer l'activité enzymatique de VanX vis-à-vis de son substrat naturel, nous avons procédé à la mesure des spectres RMN du 1H (400 MHz, D_2O). Il a été question de s'assurer de la disparition du dipeptide D-Ala-D-Ala avec l'apparition de l'acide aminé D-Ala dans le tube contenant l'enzyme en considérant les pics des doublets des groupes méthyles. L'analyse expérimentale des spectres RMN réalisées montre les méthyles du dipeptide respectivement à 1,53 ppm et 1,33 ppm, et le méthyle de la D-Alanine à 1,45 ppm.

Afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'hydrolyse spontanée, un tube témoin négatif sans enzyme a été préparé. Plusieurs essais ont été réalisés selon le protocole de Hsieh et *al.*²⁶⁶ mais les premiers essais n'ont montré aucune activité enzymatique de la protéine recombinante vis-à-vis du dipeptide D-Ala-D-Ala à raison de 5 μM de VanX pour 1 mM de dipeptide. Nous avons donc procédé à des étapes d'ultrafiltrations puis de lyophilisation et nous avons ensuite évalué l'activité enzymatique de 6xHis-VanX à une concentration de 20 μM . L'étape d'ultrafiltration avec le tampon phosphate 25 mM, pH 7,4 a été cruciale pour restaurer l'activité enzymatique de la protéine recombinante. Elle a permis d'éliminer des traces de sels et/ou d'imidazole qui inhiberaient l'activité de 6xHis-VanX. L'excès d'imidazole vient du tampon d'élution de la protéine recombinante qui contient de l'imidazole à 250 mM. L'imidazole sert à déplacer l'histidine de la protéine recombinante 6xHis-VanX, et en permettre l'élution. Dans ces nouvelles conditions, une hydrolyse du dipeptide a été observée, mais elle n'a pas été totale au bout de 24 h, variant de 7 à 40 % [Tableau 4]. Dans le tube témoin négatif, aucune hydrolyse spontanée n'a été constatée.

²⁶⁴ Bussiere, D. E.; Pratt, S. D.; Katz, L.; Severin, J. M.; Holzman, T.; Park, C. H. *Mol. Cell* **1998**, 2 (1), 75–84.

²⁶⁵ Bussiere, D. E.; Pratt, S. D.; Katz, L.; Severin, J. M.; Holzman, T.; Park, C. H. *Mol. Cell* **1998**, 2 (1), 75–84.

²⁶⁶ Hsieh, M. L.; Tseng, M. J.; Tseng, M. C.; Chu, Y. H. *Anal. Biochem.* **2006**, 354 (1), 104–110.

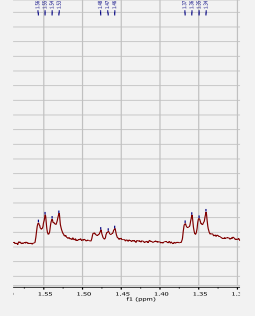
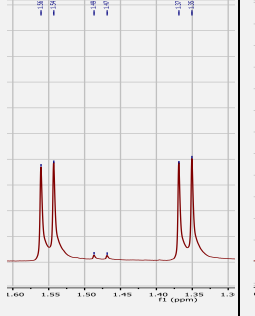
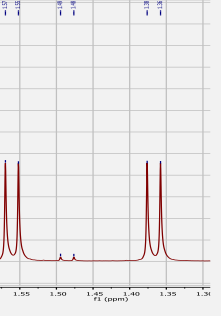
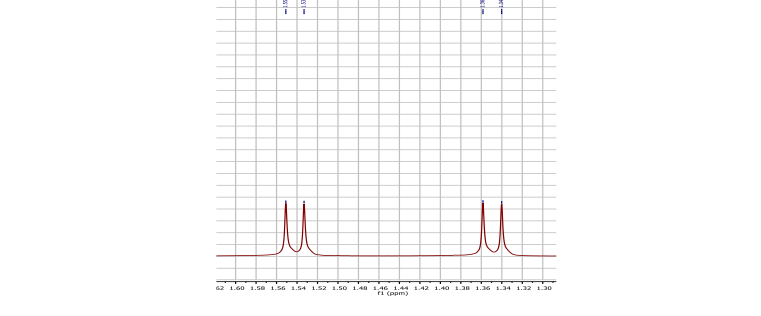
Si, malgré l'ultrafiltration, l'activité de 6His-VanX n'a pas été totalement restaurée au bout de 24 h, nous pensons que la queue 6xHis pourrait entraver l'activité de VanX. Certains auteurs de par le passé avaient conclu qu'une queue 6xHis, du fait de sa petite taille, n'entrave ni les caractéristiques biochimiques, ni l'activité enzymatique des protéines recombinantes auxquelles elles sont liées.^{267,268} Toutefois W. Booth et *al.* (2018) ont récemment publié des études expérimentales qui montrent que la queue histidine est capable d'influencer la stabilité de certaines protéines recombinantes.²⁶⁹ Dans la plupart des His-protéines analysées par W. Booth et *al.* (2018), la queue Histidine entraîne une baisse de la stabilité thermique qui pourtant est un critère important dans l'étude des propriétés biochimiques des protéines. Nous en avons donc conclu que la queue 6xHis influence négativement l'activité D-Ala-D-Ala dipeptidase de VanX.

²⁶⁷ Uhlén, M.; Forsberg, G.; Moks, T.; Hartmanis, M.; Nilsson, B. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, 3 (4), 363–369.

²⁶⁸ Gräslund, S.; Nordlund, P.; Weigelt, J.; Martin Hallberg, B.; Bray, J.; Gileadi, O.; Knapp, S.; Oppermann, U.; Arrowsmith, C.; Hui, R.; et al. Shigeyuki Yokoyama **2008**, 18 (2), 135–146.

²⁶⁹ Booth, W. T.; Schlachter, C. R.; Pote, S.; Ussin, N.; Mank, N. J.; Klapper, V.; Offermann, L. R.; Tang, C.; Hurlburt, B. K.; Chruszcz, M. *ACS Omega* **2018**, 3 (1), 760–768.

Tableau 4 : Evaluation qualitative de l'activité enzymatique de 6xHis-VanX après 24 h

6His-VanX (µg)	5,16	2,3	2,07
ZnCl₂ 16 mM (µL)	200	200	200
D-Ala-D-Ala 62 mM (µL)	7.26	100	100
Spectres RMN du ¹H			
Spectre RMN du ¹H Témoin négatif			
% d'hydrolyse	40 %	9 %	9 %

Nous avons alors décidé de produire une protéine recombinante VanX native sans queue histidine. Pour la surexpression et la purification de cette protéine nous avons utilisé le vecteur pETSUMO (SUMO : Small Ubiquitin like Modifier). Ce choix s'explique par deux raisons : la première est que ce vecteur permet un clonage dit « TA-cloning », avec une simplification considérable des étapes de clonages. En effet, il n'est plus utile de mettre sur le produit PCR des sites de restrictions pour les enzymes de restrictions, supprimant ainsi l'étape de digestion avant ligation. La seconde raison est que ce vecteur permet d'obtenir une protéine VanX native après SUMO-protéolyse.

2.2. Clonage, surexpression protéine et évaluation enzymatique de VanX native

Amplification du gène d'intérêt *vanX*

A partir de l'ADN d'*E. faecium* précédemment extrait, l'amplification du gène *vanX* a été réalisée en utilisant les amorces *vanX-F* (amorce sens) et *vanX-R* (amorce antisens) et l'enzyme GoTaq® G2 flexi DNA polymerase, qui possède une activité 5'→3' exonucléasique. L'activité exonucléase 5'→3' laisse un surplomb aux extrémités 3' du produit PCR qui permettra un clonage direct. De plus, à ces extrémités 3', la taq polymerase ajoute le plus souvent une adénosine (A) qui est nécessaire pour l'étape de « TA cloning » dans le vecteur pETSUMO. L'amplification a été vérifiée à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. L'amplicon de taille d'environ 600 pb, correspondant à la taille théorique de *vanX* (603 pb) a été détecté légèrement au-dessus de 500 pb [Figure 87].

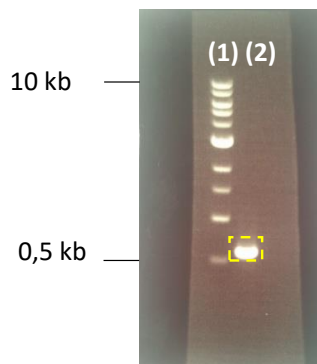


Figure 87 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% : (1) Marqueur de taille 0,5-10 kb, (2) amplicon *vanX* de *E. faecium vanA*

Clonage TA ou « TA cloning », séquençage

Le vecteur pET SUMO [Figure 88] a été conçu afin de faciliter le clonage des produits PCR pour la surexpression protéique régulée dans *E. coli*. Le produit PCR a été purifié avec le kit « QIAquick PCR Purification (QIAGEN) » et la concentration mesurée à l'aide de l'appareil « NanoDrop One ». La ligation du plasmide « pET SUMO 5'-T libre » et de l'insert « *vanX* 3'-A libre » a été ensuite réalisée dans un rapport 1/1 [Figure 89].

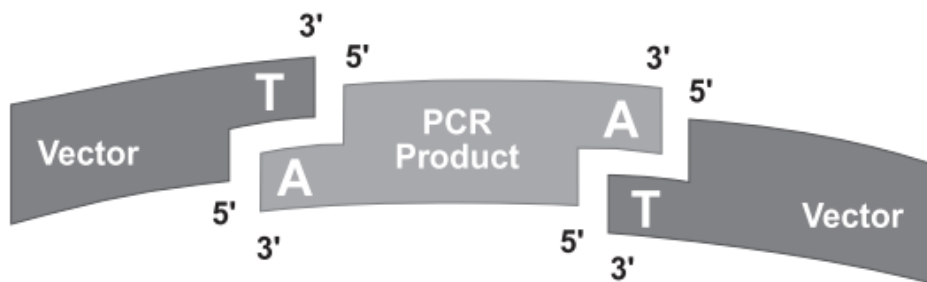


Figure 89 : Représentation schématique du clonage TA ou "TA-cloning"

Le produit de ligation a été utilisé pour la transformation dans des cellules chimiocompétentes One Shot Mach1™ -T1^R, fournies avec le kit de pET SUMO. Ces cellules chimiocompétentes permettent une transformation rapide et efficace. Les transformants ont été mis en culture sur boîtes de gélose LB additionnée de 50µg/mL de kanamycine. Leur analyse a été réalisée par PCR avec les amorces SUMO Forward (amorce sens) et T7 Reverse (amorce antisens) et plusieurs colonies positives ont été identifiées. L'électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% a révélé un amplicon situé légèrement en dessous de 1000 pb, correspondant à la taille (~ 860 pb) de la séquence amplifiée par les 2 amorces SUMO-Forward et T7 Reverse [Figure 90]. Après vérification de la construction pET SUMOQvanX, les plasmides de plusieurs colonies positives ont été extraits avec le kit « GeneJET Plasmid Miniprep ». La concentration des plasmides a ensuite été mesurée à l'aide du « NanoDrop One » [Tableau 5].

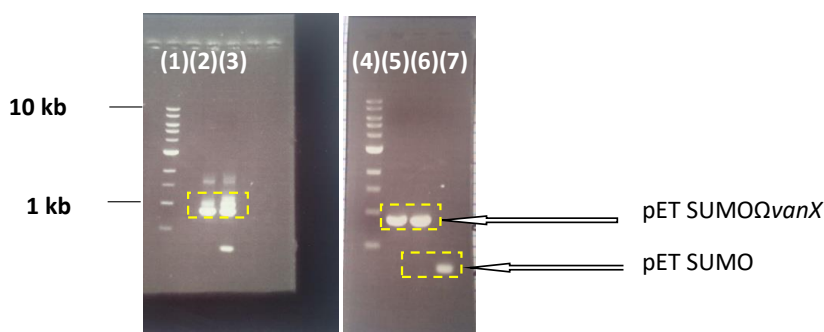


Figure 90 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% : (1) et (4) Marqueur de taille 0,5-10 kb, PCR sur colonies positives dans les puits 2, 3, 5 et 6, colonies négatives avec pETSUMO cyclisé sans le gène d'intérêt dans les puits 3 et 7.

Tableau 5 : Dosage au nanodrop des plasmides extraits des différentes colonies positives

N° de colonies positives	1	2	3	4	5	6	7	8
C (ng/µL)	105,9	110	22,1	65,3	58,8	55	142,5	95,6

Deux constructions ont été retenues pour la suite des manipulations. Il s'agit de celles issues des colonies 6 et 8. La surexpression protéique a nécessité d'autres types de cellules compétentes. La transformation des constructions pET SUMO Ω vanX a donc été effectuée dans les bactéries *E. coli* BL21 (DE3). Ces bactéries chimiocompétentes sont déficientes en protéases OmpT (mutation) et lon (absence totale), ce qui améliore la stabilité des protéines surexprimées dans celles-ci. De plus, ces bactéries sont spécifiques pour l'expression de gènes régulés par le promoteur T7. La croissance bactérienne observée sur milieu sélectif de gélose LB à 50 μ g/mL de kanamycine témoigne de la transformation des souches BL21. Une PCR de confirmation de la présence des constructions pET SUMO Ω vanX a été réalisée avec les amorces SUMO Forward et T7 Reverse [Figure 91].

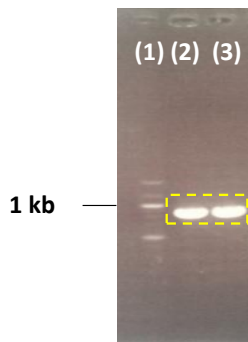


Figure 91 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% : (1) Marqueur de taille 0,5-10 kb, PCR à partir de colonies *E. coli* positives dans les puits 2 et 3.

Afin de s'assurer de l'adéquate insertion de vanX et de l'absence de mutation dans le gène, les produits PCR ont été envoyés pour séquençage. Les résultats ont montré une séquence correcte de vanX dans le plasmide et une absence de mutations. L'alignement de gènes montre que la séquence du gène vanX est identique à celle du gène vanX localisé dans le transposon Tn1546 d'*E. faecium* [Figure 92].

Enterococcus faecium strain V346 transposon Tn1546, partial sequence
 Sequence ID: KX530812.1 Length: 11331 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Str
1127 bits (610)	0.0	610/610 (100%)	0/610 (0%)	Plu
Query 95	ATGGAAATAGGATTTACTTTTTTAGATGAAATAGTACACGGTGTTCGTTGGGACGCTAAA			154
Sbjct 8717	ATGGAAATAGGATTTACTTTTTTAGATGAAATAGTACACGGTGTTCGTTGGGACGCTAAA			8776
Query 155	TATGCCACTTGGGATAATTTACCCGAAAACCGGTTGACGGTTATGAAGTAAATCGCATT			214
Sbjct 8777	TATGCCACTTGGGATAATTTACCCGAAAACCGGTTGACGGTTATGAAGTAAATCGCATT			8836
Query 215	GTAGGGACATACGAGTTGGCTGAATCGCTTTTGAAGGCAAAGAAGCTGGCTGCTACCCAA			274
Sbjct 8837	GTAGGGACATACGAGTTGGCTGAATCGCTTTTGAAGGCAAAGAAGCTGGCTGCTACCCAA			8896
Query 275	GGGTACGGATTGCTTCTATGGGACGGTTACCGTCCTAAGCGTGCTGTAAACTGTTTTATG			334
Sbjct 8897	GGGTACGGATTGCTTCTATGGGACGGTTACCGTCCTAAGCGTGCTGTAAACTGTTTTATG			8956
Query 335	CAATGGGCTGCACAGCCGAAAATAACCTGACAAAGGAAAGTTATTATCCCAATATTGAC			394
Sbjct 8957	CAATGGGCTGCACAGCCGAAAATAACCTGACAAAGGAAAGTTATTATCCCAATATTGAC			9016
Query 395	CGAAGTGAAGTATGATTTCAAAAGGATACGTGGCTTCAAATCAAGCCATAGCCGCGGAGT			454
Sbjct 9017	CGAAGTGAAGTATGATTTCAAAAGGATACGTGGCTTCAAATCAAGCCATAGCCGCGGAGT			9076
Query 455	GCCATTGATCTTACGCTTTATCGATTAGACACGGGTGAGCTTGTACCAATGGGGAGCCGA			514
Sbjct 9077	GCCATTGATCTTACGCTTTATCGATTAGACACGGGTGAGCTTGTACCAATGGGGAGCCGA			9136
Query 515	TTTGATTTTATGGATGAACGCTCTCATCATGCGGCAAATGGAATATCATGCAATGAAGCG			574
Sbjct 9137	TTTGATTTTATGGATGAACGCTCTCATCATGCGGCAAATGGAATATCATGCAATGAAGCG			9196
Query 575	CAAAATCGCAGACGTTTGCCTCCATCATGAAAACAGTGGGTTTGAAGCATATAGCCTC			634
Sbjct 9197	CAAAATCGCAGACGTTTGCCTCCATCATGAAAACAGTGGGTTTGAAGCATATAGCCTC			9256
Query 635	GAATGGTGGCACTATGTATTAAGAGACGAACCATAACCCCAATAGCTATTTTGATTTCCC			694
Sbjct 9257	GAATGGTGGCACTATGTATTAAGAGACGAACCATAACCCCAATAGCTATTTTGATTTCCC			9316
Query 695	GTAAATAAAA 704			
Sbjct 9317	GTAAATAAAA 9326			

Figure 92 : Résultats du séquençage des *E. coli* BL21 (DE3) transformées : Alignement de séquence sur <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Surexpression protéique, SUMOprotéolyse, purification de VanX native

L'expression de la protéine dans le système pET SUMO nécessite une induction avec de l'IPTG. Le temps optimal d'induction par IPTG a été préalablement estimé à 4 heures. Lorsque la culture d'*E. coli* BL21 (DE3) clone 8, en milieu liquide LB avec 50 µg/mL de kanamycine, a atteint une DO située entre 0,4 et 0,6, l'IPTG a été ajouté pour une concentration finale de 1 mM. Après incubation sous agitation (200 rpm) à 37 °C durant 4h, la culture bactérienne a ensuite été centrifugée à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et congelée à -80°C pour réaliser la purification de la protéine. La protéine recombinante possède en N-terminal un motif de six histidines consécutives grâce auquel sa purification

avec le kit Ni-NTA a été effectuée. Elle possède aussi en aval de la séquence 6-histidine, une protéine SUMO. La structure tertiaire de cette protéine est reconnue par la SUMO protéase et clivée de façon spécifique. Après la purification sur colonne Ni-NTA, une étape de concentration de la protéine recombinante sur microcon 30K a été réalisée. Une étape d'échange de tampon a été effectuée à la suite de l'étape de concentration afin de récupérer la protéine dans le tampon adéquat qui permet l'étape de protéolyse par la SUMO-protéase. Des fractions de chaque étape ont été échantillonnées pour l'analyse SDS-PAGE. Plusieurs expériences de surexpression de la protéine recombinante 6xHis-SUMOVanX ont été effectuées et les concentrations des protéines ont été mesurées à l'aide du « NanoDrop One » [Tableau 6].

Tableau 6 : Dosage des protéines recombinantes 6xHis-SUMOVanX au "NanoDrop One"

N° des essais	1	2	3	4	5	6	7
C(µg/µL)	0,14	0,222	0,444	1	0,286	0,209	0,44

La SUMO-protéolyse a été difficile à mettre en œuvre. En effet elle était incomplète même après 18 h à 30 °C. C'est en opérant à 30 °C pendant 72 h que la SUMO-protéolyse a été totale. L'étape de purification de VanX native par colonne Ni-NTA a ensuite été réalisée. Cependant cette étape de purification par la colonne Ni-NTA n'a pas permis d'obtenir la protéine VanX native. En effet, la bande spécifique de VanX native n'a pas été détectée après analyse de toutes les fractions d'élution. VanX se serait dégradé sur la colonne. Nous avons donc opté pour une purification de VanX par des ultrafiltrations successives sur microcon 10K, permettant la sélection de la protéine VanX native. Cette façon d'opérer a permis d'obtenir la protéine VanX native, visible sur l'analyse SDS-PAGE aux environ de 23 kDa, correspondant au poids moléculaire théorique de VanX. Quant à la partie 6xHis SUMO, elle a été détectée aux environs de 13 KDA, en adéquation avec la taille de ce fragment [Figure 93].

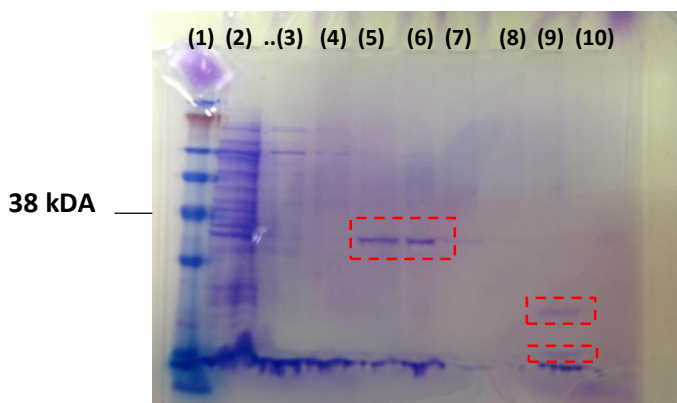


Figure 93 : (1) marqueur de poids moléculaire, (5) 6xHis-SUMO-VanX, (6) 6xHis-SUMO-VanX, (9) VanX et 6xHis-SUMO

Les bandes de 6xHis-SUMOVanx, 6xHis-SUMO, et VanX native ont été analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les résultats confirment la masse et la séquence en acides aminés de chaque bande [Tableau 7]. Un échange de tampon et une concentration de la protéine VanX native ont été effectuées sur microcon 10K afin de la récupérer dans le tampon idéal pour l'évaluation de son activité enzymatique.

Tableau 7 : Masses théoriques/Masses expérimentales MALDI-TOF

	6xHis-SUMOVanX	VanX native	6xHis-SUMO
MM théorique (Da)	36200-36400	23200- 23400 ^{270,271}	13000 ²⁷²
MM expérimentale MS/MS (Da)	36754,98	23365,35	13407

Evaluation de l'activité enzymatique de VanX native

La protéine VanX native est une D-Ala-D-Ala dipeptidase. L'objectif de l'étude enzymatique a été de vérifier que la protéine produite possède bien cette activité enzymatique comme précédemment. La mesure des spectres RMN du ¹H (400 MHz, D₂O) a été réalisée pour s'assurer de la disparition du dipeptide D-Ala-D-Ala avec l'apparition de l'acide aminé D-Ala dans le tube contenant l'enzyme. Il s'est agi également de s'assurer qu'il n'y a pas d'hydrolyse spontanée dans le tube témoin. Le spectre RMN du ¹H réalisé a permis

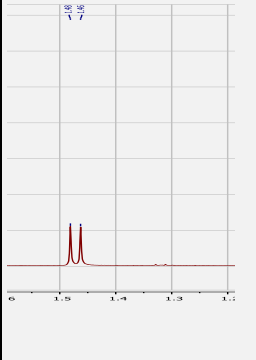
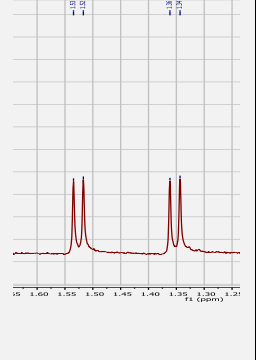
²⁷⁰ Crowder, M. W. Infect. Disord. Drug Targets **2006**, 6 (2), 147–158.

²⁷¹ Golich, F. C.; Sigdel, T.; Breece, R. M.; Detar, L.; Herron, L. R.; Crowder, M. W. Anal. Biochem. 2004, 331 (2), 398–400.

²⁷² invitrogen. Champion TM PET SUMO **2010**.

d'observer la formation de l'acide aminé D-Ala dont le groupe méthyle a été identifié à 1,47 ppm. L'hydrolyse par l'enzyme VanX native a été totale au bout de 16 h en utilisant pratiquement les mêmes quantités utilisées avec 6xHis-VanX, à savoir 20 µM d'enzyme pour 20 mM de dipeptide [Tableau 8].

Tableau 8: Evaluation qualitative de l'activité de VanX native

VanX native (µg)	ZnCl ₂ 16 mM (µL)	D-Ala-D-Ala 100 mM (µL)	Spectre RMN	Spectre RMN témoin négatif	Pourcentage d'hydrolyse
2,62	20	10			100 %

3. Synthèse d'un dérivé nicotinate auto-immolable

L'application de la triple plateforme extraite des dérivés azaisatoïques auto-immolables à la détection de la résistance à la vancomycine se traduit par la synthèse de molécules prochromophores auto-immolables dont la « *gâchette* » est un dipeptide D-Ala-D-Ala. Le principe de l'auto-immolation s'appuie sur la reconnaissance et l'hydrolyse de la « *gâchette* » par l'enzyme de résistance VanX, entraînant la libération d'un atome d'azote nucléophile capable d'attaquer la fonction carbonyle de l'ester à proximité. Il s'ensuit alors une cyclisation du système autoimmolable avec libération du chromophore [Figure 94].

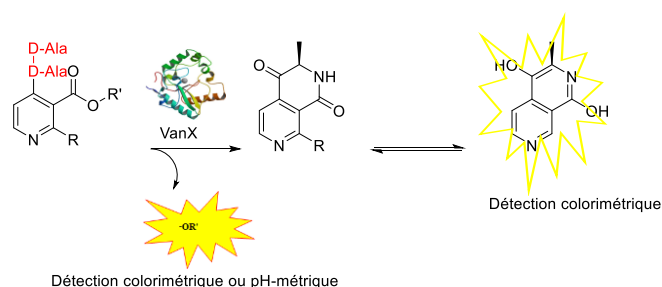


Figure 94 : Concept

Pour apporter la preuve de ce concept, nous nous sommes fixé comme objectif la synthèse d'un dérivé nicotinate substitué en position 4 par une D-alanine protégée sur sa fonction amine. Ce dérivé sera ensuite déprotégé pour vérifier la cyclisation intramoléculaire donc l'auto-immolation du système [Figure 95]. Pour la synthèse de ce dérivé nous avons eu recours à plusieurs stratégies.

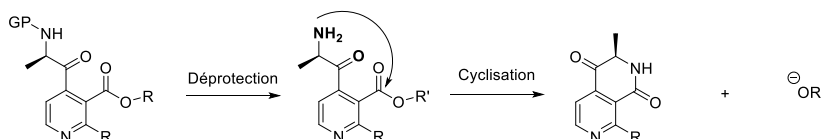


Figure 95 : Preuve de concept envisagée

Afin d'avoir un dérivé qui nous permette d'apporter la preuve de concept avancé dans cette thèse, nous nous sommes donné comme objectif la synthèse du dérivé **1** à partir du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** par une réaction d'ortho-méallation [Figure 96].

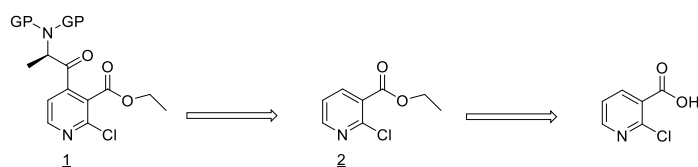


Figure 96 : Retrosynthèse du dérivé **1**

Le choix de la base

Pour apporter la preuve de concept, nous avons envisagé la fonctionnalisation du 2-chloronicotinate d'éthyle par ortho-méallation. L'ortho-méallation est une réaction régiosélective de fonctionnalisation de noyaux aromatiques et hétéroaromatiques.²⁷³ C'est une réaction de déprotonation en ortho d'un groupe directeur (GD) par une base forte. Le groupe-directeur doit contenir un hétéroatome dont la capacité à développer des liaisons de coordination avec le Lithium de l'alkyllithium et/ou l'effet inductif du GD orientent la méallation en ortho du GD [Figure 97]. La déprotonation qui a lieu est la conséquence d'un phénomène appelé « Complex Induce Proximity Effect » (CIPE).^{274,275}

²⁷³ Snieckus, V. VICTOR S NIECKUS; **1990**; Vol. 90.

²⁷⁴ Beak, P.; Meyers, A. I. Acc. Chem. Res. **1986**, 19 (11), 356–363.

²⁷⁵ Whisler, M. C.; MacNeil, S.; Snieckus, V.; Beak, P. Angew. Chem. Int. Ed. April 19, **2004**, pp 2206–2225.

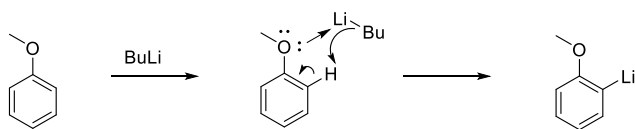


Figure 97 : Mécanisme d'ortho-métallation (d'après [276])²⁷⁶

A l'origine ce sont les bases alkyllithiées (*n*-BuLi, *t*-BuLi, *s*-BuLi) qui ont été utilisées pour l'ortho-métallation. Elle sont d'ailleurs encore utilisées pour l'ortho-métallation mais du fait de leur forte nucléophilie, des investigations ont été menées et ont permis de développer d'autres bases fortes qui tolèrent la présence de groupes sensibles lors des réactions d'ortho-métallation. Ce sont, entre autres, les amidures de lithium comme le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridure de lithium (LiTMP), le diisopropylamidure de lithium (LDA). Les amidures de lithium doivent être utilisés à très basse température (le plus souvent -78 °C) et sont le plus fréquemment utilisés sous atmosphère inerte comme les alkyllithiens.^{277,278} L'ère des organomagnésiens en tant que bases servant à l'ortho-métallation a été ouverte par Eaton et *al.* en 1989.²⁷⁹ En 2006, Knochel et *al.* ont mis au point une base encombrée pour la fonctionnalisation régiosélective de composés aromatiques et hétéroaromatiques, le TMPMgCl.LiCl encore appelée base de Knochel-Hauser. Cette base est efficace à des températures douces variant entre -50 °C et 25 °C, à raison de 1 à 2 équivalents de base seulement [Figure 98].^{280,281} Le TMPMgCl.LiCl présente d'autres avantages : elle est soluble dans le THF, stable dans le temps et à température ambiante, et capable d'ortho-magnésiation sur des hétérocycles aromatiques comme la pyridine. Au regard de ces avantages, nous avons donc choisi d'utiliser cette base pour l'ortho-métallation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2**.

²⁷⁶ Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. ORGANIC CHEMISTRY, Second.; Oxford University Press, 2001.

²⁷⁷ Plé, N.; Turck, A.; Couture, K.; Quéguiner, G. J. Org. Chem. **1995**, 60 (12), 3781–3786.

²⁷⁸ POONI, Parminder, K.; MERCHANT, Kevin, J.; KERR, Catrina, M. **WO2011083316**, **2011**.

²⁷⁹ Eaton, P. E.; Lee, C. H.; Xiong, Y. J. Am. Chem. Soc. **1989**, 111 (20), 8016–8018.

²⁸⁰ Krasovskiy, A.; Krasovskaya, V.; Knochel, P. Angew. Chem. Int. Ed. **2006**, 45 (18), 2958–2961.

²⁸¹ Knochel, P.; Schade, M. A.; Bernhardt, S.; Manolikakes, G.; Metzger, A.; Piller, F. M.; Rohbogner, C. J.; Mosrin, M. J. Org. Chem **2011**, 7, 1261–1277.

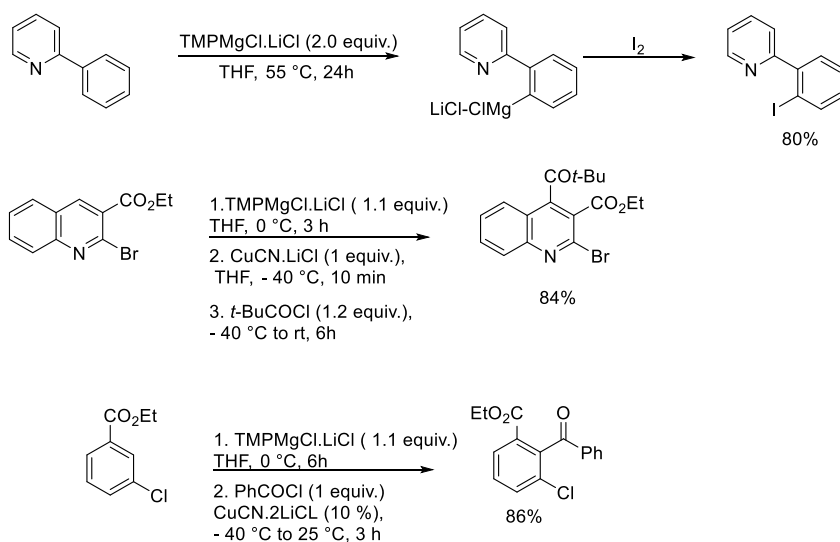


Figure 98 : fonctionnalisation de cycles aromatiques et hétéroaromatiques : exemples d'ortho-magnésiation (d'après [280,282,283])

Le choix de l'électrophile

Les dérivés d'acides carboxyliques tels que les chlorures d'acyles, les esters, les amides de Weinreb, les nitriles permettent d'obtenir des cétones par réaction avec des organométalliques.^{284,285} Au cours de la formation de cétones, la réaction parasite la plus fréquente est la formation de l'alcool tertiaire par addition de l'organométallique sur la cétone. La formation de la cétone peut être privilégiée en utilisant des organométalliques moins réactifs comme les organocuprates, les organozinciques, les organocadmiums. L'encombrement stérique de l'organométallique et du dérivé d'acide carboxylique jouent également un rôle en faveur de la formation de la cétone [Figure 99]. En tenant compte de ces informations, nous avons choisi de procéder à la fonctionnalisation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** en utilisant comme électrophiles des chlorures d'acyles, des esters de méthyle et des amides de Weinreb de la D-alanine mono ou di-protégée.

²⁸² Boudet, N.; Lachs, J. R.; Knochel, P. *Org. Lett.* **2007**, 9 (26), 5525–5528.

²⁸³ Wunderlich, S. H.; Rohbogner, C. J.; Unsinn, A.; Knochel, P. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, 14 (2).

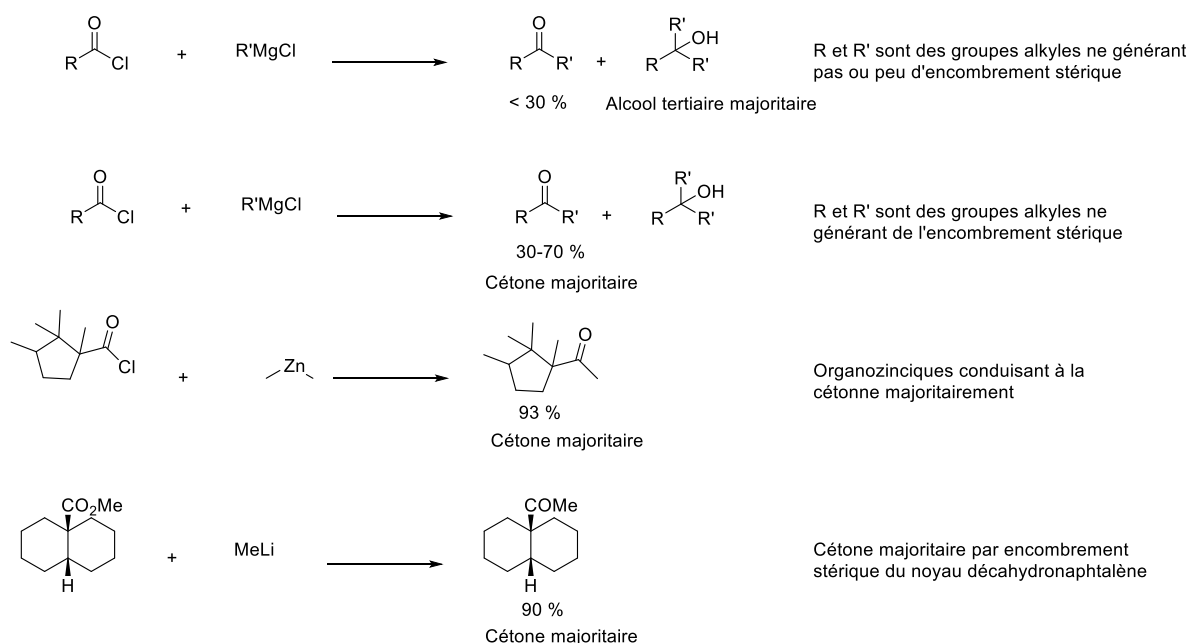


Figure 99: Formation de cétones à partir d'organométalliques (d'après [284,285])

3.1. Ortho-méallation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2**

Afin de synthétiser le dérivé nicotinate auto-immolable, qui permettra ensuite de démontrer le concept, nous avons choisi d'utiliser le $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$. Cette base est utilisée afin d'introduire en position 4 du 2-chloronicotinate d'éthyle **2**, la D-Alanine protégée. Tout d'abord, l'estérification de l'acide 2-chloronicotinique commercial dans l'éthanol a permis d'obtenir l'ester **2** avec un rendement de 84 % après purification sur colonne [Figure 100].

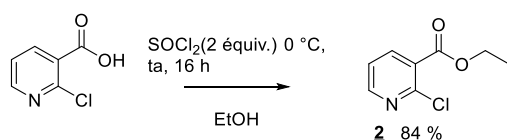


Figure 100: Estérification de l'acide 2-chloronicotinique dans l'éthanol

Afin que la D-alanine devienne un électrophile, nous avons synthétisé son chlorure d'acyle. Une protection totale de la fonction amine de la D-alanine est essentielle car, ses protons en présence de la base $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ peuvent entraîner des réactions acide-base et altérer l'efficacité de la réaction d'ortho-méallation. C'est ainsi que nous avons choisi de protéger la fonction amine de la D-alanine par un groupement phthalimide. Le choix d'un chlorure d'acyle comme électrophile pour la réaction d'ortho-méallation conduit

²⁸⁴ Shirley, D. A. In Organic Reactions; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **1954**; pp 28–58.

²⁸⁵ Jorgenson, M. J. In Organic Reactions; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **1980**; pp 1–98.

nécessairement à faire une étape de transmétallation afin de minimiser la formation de l'alcool tertiaire. Pour l'étape de transmétallation, le sel de cuivre (I) (CuCN.2LiCl) a été utilisé afin de former l'organocuprate moins réactif que l'organomagnésien.

Afin de tester l'ortho-métallation ainsi que l'efficacité de la base TMPMgCl.LiCl et du réactif de transmétallation CuCN.2LiCl, nous avons réalisé une première réaction d'ortho-métallation avec le 2-chloronicotinate d'éthyle **2** et le chlorure de pivaloyle. Nous nous sommes inspiré du protocole d'ortho-zincation de S. Wunderlich et *al.* [Figure 101].^{283,286} En utilisant moins de 2 équivalents de base, la métallation est incomplète même au bout de 4 h à -40 °C. Nous avons donc réalisé l'ortho-métallation avec 2 équivalents de base pendant 2 h à -40 °C, suivie d'une transmétallation au cuivre pendant 25 min. L'ajout du chlorure de pivaloyle aboutit au dérivé substitué en position 4 par le chlorure de pivaloyle. L'analyse RMN révèle un taux de conversion de plus de 90 % [Figure 102]. Conforté par ce résultat nous avons appliqué les mêmes conditions d'ortho-métallation en utilisant le chlorure d'acyle **4** de la *N*-phtaloyl-D-alanine, afin d'obtenir le dérivé substitué en 4 par la D-alanine protégée.

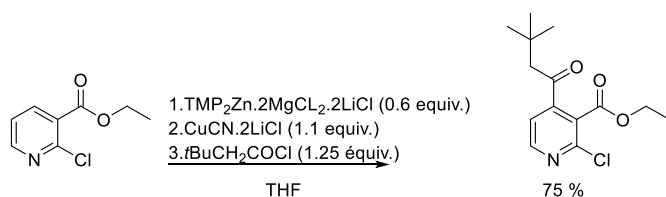


Figure 101 : Ortho-zincation d'après S. Wunderlich²⁸⁶

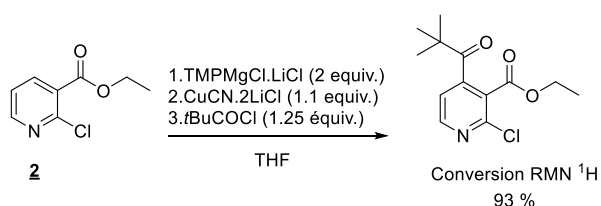


Figure 102 : Essai d'ortho-magnésiation avec le chlorure de pivaloyle comme électrophile

Afin de synthétiser le chlorure d'acyle de la *N*-phtaloyl-D-alanine qui servira d'électrophile, l'anhydride phtalique purifié a été généré à partir de l'anhydride phtalique commercial. En effet l'anhydride phtalique commercial contient parfois des traces d'acide phtalique. Cet acide est insoluble dans le dichlorométhane contrairement à l'anhydride

²⁸⁶ Wunderlich, S. Fakultät Für Chemie Und Pharmazie Der Ludwig-Maximilians-Universität, Munich., 2010.

phtalique. Ainsi, après la solubilisation de l'anhydride phtalique commercial dans le dichlorométhane, puis la filtration, l'évaporation du filtrat a permis d'obtenir l'anhydride phtalique sans traces d'acide. Cet anhydride phtalique fraîchement obtenu a été mis dans du toluène avec la D-alanine et quelques gouttes de triéthylamine. La *N*-phtaloyl-D-alanine **3** a été obtenue avec un rendement de 92 % [Figure 103].

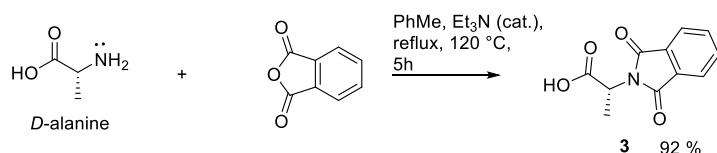


Figure 103 : Synthèse de *N*-Phtaloyl-*D*-alanine

La quantité catalytique de triéthylamine accélère la réaction par formation d'un intermédiaire d'amide quaternaire. La triéthylamine ouvre donc en premier l'anhydride phtalique, puis l'azote de la *D*-alanine attaque l'amide quaternaire formé [Figure 104].

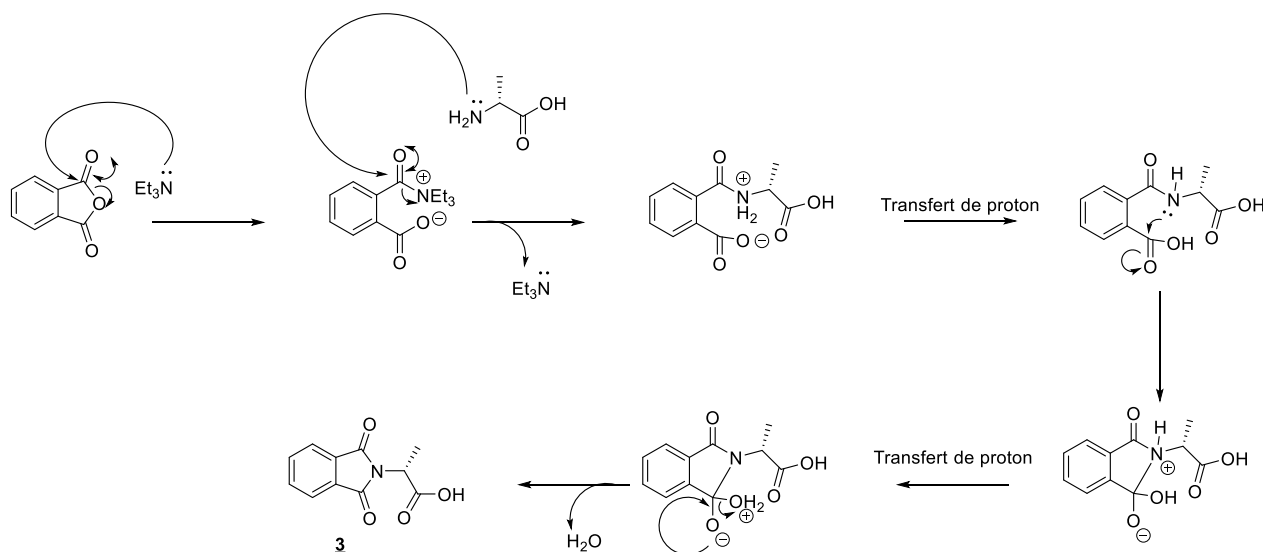


Figure 104 : Mécanisme de formation de la *N*-phtaloyl-*D*-alanine **3**

La fonction acide de la *N*-phtaloyl-*D*-alanine **3** a ensuite été convertie en chlorure d'acyle en présence de chlorure d'oxalyle et de quelques gouttes de diméthylformamide (DMF) comme catalyseur de la réaction de formation du chlorure d'acyle. Après formation du chlorure d'acyle, le solvant et l'excès de chlorure d'oxalyle ont été évaporés. Les éventuelles traces de chlorure d'oxalyle ont été éliminées sous pression réduite [Figure 105].

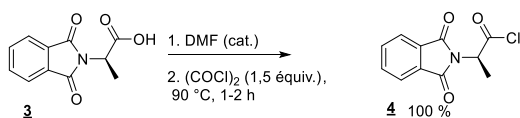


Figure 105 : Synthèse du chlorure de N-phthaloyl-D-alanyle **4**

3.1.1. Ortho-métallation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** avec le chlorure de N-phthaloyl-D-alanyle **4**

Dans cette section, nous avons tenté d'ortho-métaller le 2-chloronicotinate d'éthyle **2** afin d'obtenir l'intermédiaire **5**, substitué en position 4 par le N-phthaloyl-D-alanyle [Figure 106].

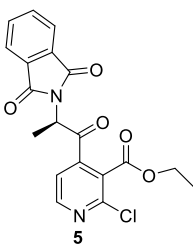


Figure 106 : Dérivé nicotinate auto-immolable **5**

Pour cette ortho-métallation, nous avons utilisé les mêmes conditions qu'avec le chlorure de pivaloyle. L'ortho-métallation de l'ester éthylique a été suivi d'une transmétallation au cuivre. Le chlorure d'acyle du N-phthaloyl-D-alanyle **4** a été ensuite ajouté. Malgré plusieurs essais, cette manipulation n'a pas permis d'obtenir le composé escompté [Figure 107]. Nous avons obtenu un mélange de plusieurs composés. L'analyse LC-MS montre la présence majoritairement de matière première et le produit d'homocouplage du 2-chloronicotinate d'éthyle **2**. La formation de ce dimère pourrait s'expliquer par la réaction parasite de Wurtz. Cette réaction est d'autant favorisée qu'il y a un sel de cuivre (I) dans le milieu réactionnel. Pour remédier à ce problème, nous avons choisi d'utiliser un autre électrophile, l'ester méthylique **6** de la N-phthaloyl-D-alanine. L'ester étant moins réactif que le chlorure d'acyle, il n'y aura pas lieu de procéder à une transmétallation avec le sel de cuivre (I).

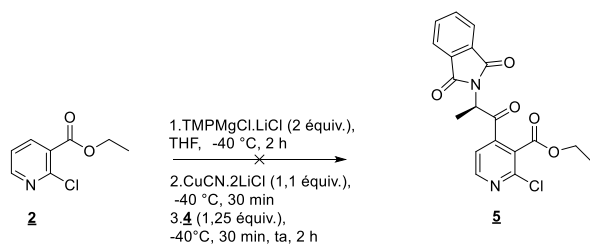


Figure 107 : Ortho-magnésiation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2**, avec le chlorure *N*-phtaloyl-D-alanyl **4** comme électrophile

L'estérification de la *N*-phtaloyl-D-alanine **3** dans le méthanol, en présence de 1,5 équivalents de chlorure d'oxalyle et de DMF en catalytique, a permis d'obtenir l'ester **6** au bout de 16 h, avec un rendement de 53 % après purification par chromatographie [Figure 108].

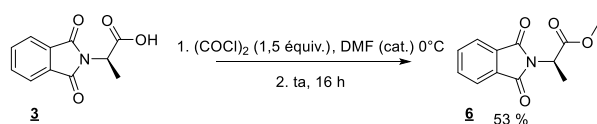


Figure 108 : Estérification de la *N*-phtaloyl-D-alanine **3**

Avec cet ester méthylique comme électrophile, la fonctionnalisation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** a été envisagée sans succès, selon les mêmes modalités expérimentales que précédemment [Figure 109]. En effet, nous aboutissons majoritairement aux réactifs de départ. Cela peut être expliqué par une non-réactivité de l'organomagnésien obtenu vis-à-vis de l'ester méthylique de la *N*-phtaloyl-D-alanine. La faible réactivité de l'ester n'est pas un avantage dans notre cas. En constatant la non-réactivité de l'organomagnésien vis-à-vis de l'ester méthylique de la *N*-phtaloyl-D-alanine, nous avons trouvé non pertinent de tenter la fonctionnalisation avec l'amide de Weinreb de la *N*-phtaloyl-D-alanine.

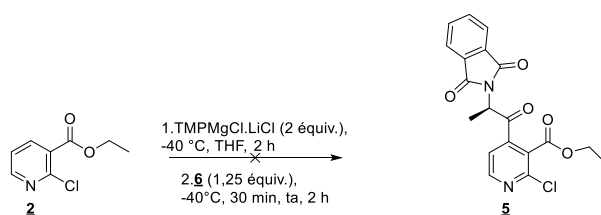


Figure 109 : Ortho-magnésiation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** avec l'ester méthylique **6** comme électrophile

Nous avons alors envisagé l'utilisation d'électrophiles dérivés de la *N*-Boc-D-alanine. Pour remédier aux problèmes que pourraient induire les protons de l'amine de la D-alanine lors de la métallation. Deux voies sont envisageables, à savoir une double protection par le groupe

Boc (*t*-butoxycarbonyl) ou une déprotonation préalable du proton échangeable du dérivé mono-protégé par un groupe Boc.

3.1.2. Ortho-méallation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** avec l'acide aminé Boc-Boc-D-alanine

Nous, nous sommes donc intéressés dans cette section à la synthèse du dérivé **7** [Figure 110].

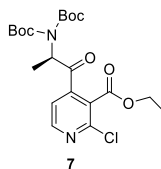


Figure 110 : 2-chloronicotinate d'éthyle substitué en position 4 par Boc-Boc-D-alanine **11**

A partir de l'acide-aminé D-Ala commercial nous avons réalisé une estérification dans du méthanol, puis une mono-protection de l'amine. Ensuite, en utilisant du LiHMDS pour une déprotonation à basse température de la D-Ala mono-protégée, nous avons pu obtenir le produit di-protégé avec un rendement quasi-quantitatif. Malheureusement, celui-ci se déprotège instantanément. Nous avons tenté de le conserver sous azote et à froid. Malgré ces conditions, le composé di-protégé redonne le dérivé mono-protégé. Cette déprotection instantanée peut s'expliquer par la gêne stérique générée par les deux groupements Boc [Figure 111].

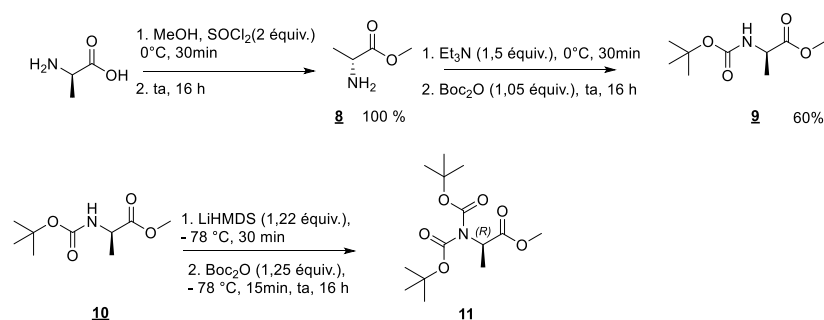


Figure 111 : Synthèse de di-Boc-D-Alanine **11**

Nous avons néanmoins tenté l'ortho-méallation avec le mélange d'électrophiles mono- et di-protégés mais cela n'a pas permis d'obtenir le composé **7** [Figure 112]. La réaction de déprotection spontanée du groupement Boc pourrait être source de réactions qui génèrent des protons et/ou d'autres composés capables de réagir avec l'organomagnésien ; ce qui explique l'obtention majoritaire du réactif de départ, le 2-chloronicotinate d'éthyle **2**.

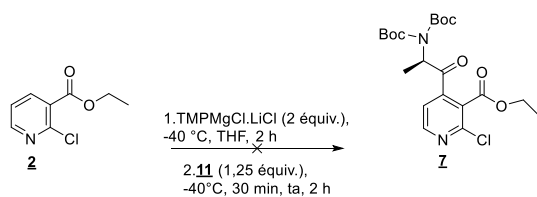


Figure 112 : Ortho-magnésiation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** substitué en position 4 par di-Boc-D-alanine **11**

3.1.3. Ortho-métallation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** avec l'acide aminé mono-protégé par un Boc

Abandonnant l'électrophile di-Boc-D-alanine, nous avons opté pour une ortho-métallation de l'ester 2-chloronicotinate d'éthyle **2** avec la N-Boc-D-alanine mono-protégé afin d'obtenir le dérivé **12** [Figure 113].

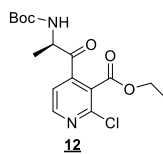


Figure 113 : 2-chloronicotinate d'éthyle substitué en position 4 par N-Boc-D-alanine

Certains auteurs proposent une pré-déprotonation de tout proton d'une fonction amine susceptible de perturber la métallation, la réaction acide-base étant cinétiquement plus rapide que la réaction d'addition.²⁸⁷ Une pré-déprotonation de l'électrophile mono-protégé s'avère essentielle. En nous inspirant de leurs travaux, nous avons opté pour une ortho-métallation en utilisant comme électrophile l'ester méthylique **9** en prenant le soin de réaliser une déprotonation préalable du proton du NH. Ce protocole s'est révélé plus efficace que les précédents

Ortho-métallation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2 avec l'ester méthylique **9** de la D-alanine mono-protégée par un Boc**

A partir de la N-Boc-D-alanine, d'iodométhane dans le DMF en présence de 2 équivalents de K₂CO₃, l'ester méthylique de la D-alanine-N-Boc a été synthétisé par une réaction de type S_N2. La purification par chromatographie a donné une huile incolore avec un rendement de 80 % [Figure 114].

²⁸⁷ Liu, J.; Ikemoto, N.; Petrillo, D.; Armstrong, J. D. Tetrahedron Lett. **2002**, 43 (46), 8223–8226.

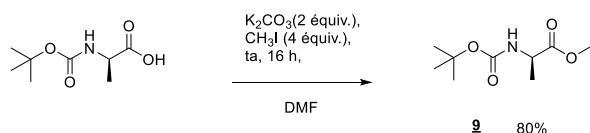


Figure 114 : Synthèse de l'ester méthylique de *N*-Boc-D-alanine **9**

Après ortho-méallation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2**, l'ester méthylique **9** de la *N*-Boc-D-alanine-*N*-Boc préalablement déprotoné pendant 15 min à -10°C avec 1 équivalent de chlorure d'isopropylmagnésium (*i*PrMgCl), a été additionné. Plusieurs composés ont été formés dont le plus abondant (**14**) a été isolé avec un rendement de 17 % [Figure 115].

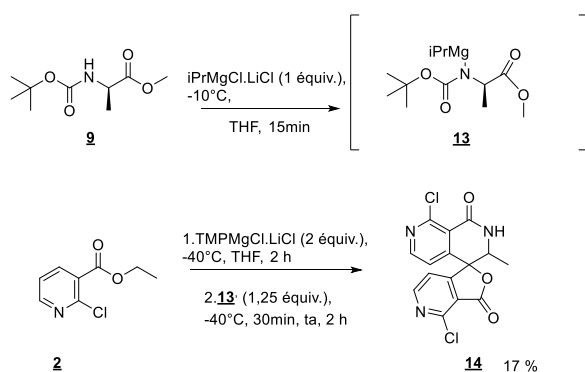


Figure 115 : Ortho-magnésiation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** avec l'ester méthylique de *N*-Boc-D-alanine **9**

Ce composé **14** ainsi obtenu est le résultat d'une addition nucléophile de l'organomagnésien sur l'ester méthylique **9**, suivie d'une addition de l'organomagnésien sur la cétone formé et d'une cyclisation avec déprotection du groupe Boc [Figure 116]. Une fonctionnalisation en 4 du noyau pyridine est donc possible. La double addition s'explique par une forte réactivité de l'organomagnésien. En effet, lors de la réaction de formation de cétone à partir de dérivés d'acides carboxyliques et d'organomagnésiens, l'alcool tertiaire se forme majoritairement.

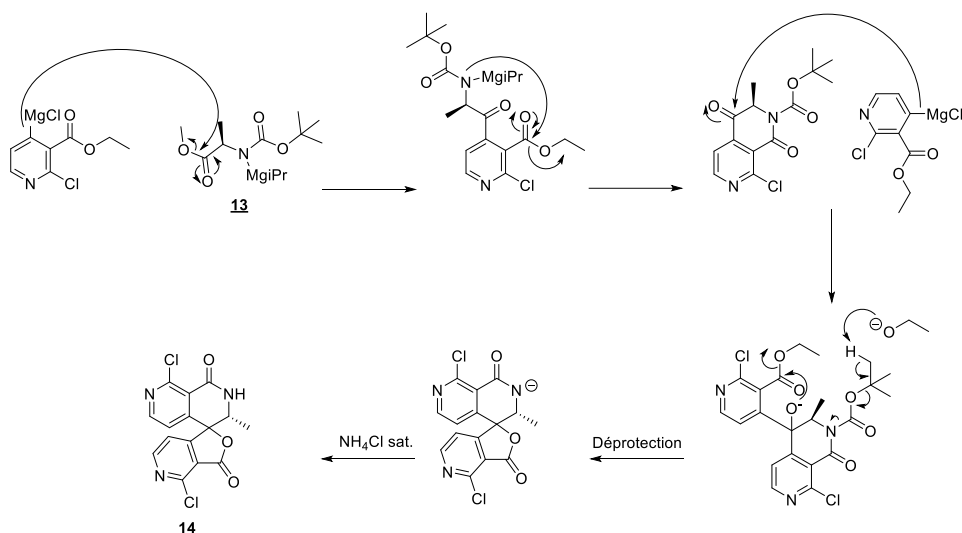


Figure 116 : Mécanisme de formation du dérivé **14**

En recourant à une étape de pré-déprotonation du proton de l'amine, la réactivité de l'organomagnésien vis-à-vis d'un ester est restaurée. Certes plusieurs autres produits formés n'ont pas pu être identifiés, mais l'identification du composé le plus abondant fait transparaître ici le comportement habituel des organomagnésiens vis-à-vis des esters. Il est donc possible d'envisager une ortho-métallation en utilisant un amide de Weinreb comme électrophile pour obtenir la cétone correspondante.

Ortho-métallation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2 avec l'amide de Weinreb **15** de la D-alanine mono-protégée par un Boc**

A partir de la *N*-Boc-D-alanine, de *N*-méthylmorpholine (1 équiv), de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (1 équiv) et de chlorhydrate de *N,O*-diméthylhydroxylamine (1 équiv), l'amide de Weinreb **15** de la D-alanine-*N*-Boc a été synthétisé, purifié par chromatographie et obtenu avec un rendement de 80 % [Figure 117].

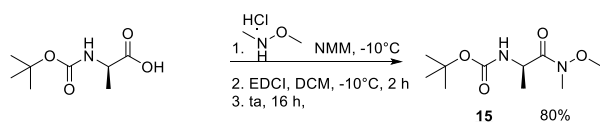


Figure 117 : Synthèse d'amide de Weinreb de *N*-Boc-D-alanine **15**

Une déprotonation préalable de l'amide de Weinreb a été effectuée en 15 min à -10 °C, avec du chlorure d'isopropylmagnésium (*i*PrMgCl), puis ce mélange réactionnel a été additionné au produit de l'ortho-métallation. Plusieurs produits ont été formés à l'issue de cette réaction.

Nous avons tenté d'isoler les plus abondants afin de les caractériser, mais seul le dérivé **18** a été isolé par chromatographie avec un rendement de 10 % [Figure 118].

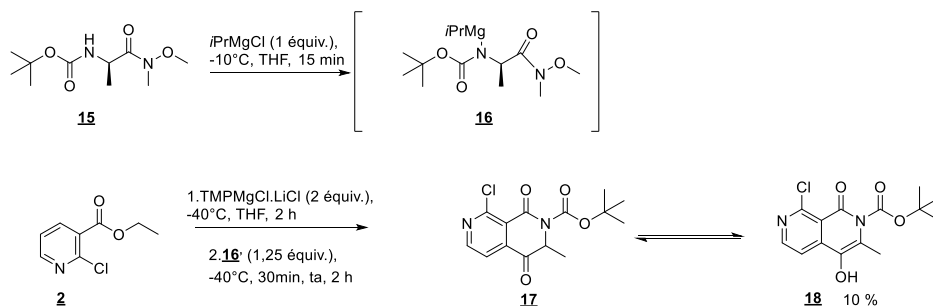


Figure 118 : Ortho-magnésiation du 2-chloronicotinate d'éthyle **2**, avec l'amide de Weinreb de *N*-Boc-*D*-alanine **15**

Ce composé majoritaire isolé, confirme la réactivité des organomagnésiens vis-à-vis des amides de Weinreb. En effet le passage par un intermédiaire tétraédrique stabilisé empêche la double addition de l'organomagnésien. Mais une réaction de cyclisation intramoléculaire a lieu tout de suite après la réaction d'addition. Cette cyclisation intramoléculaire pourrait s'expliquer par une augmentation de la nucléophilie de l'azote déprotoné se trouvant engagé dans une liaison avec le magnésium. Ainsi, par une réaction d'addition-élimination, l'azote a attaqué le carbonyle de l'ester éthylique [Figure 119].

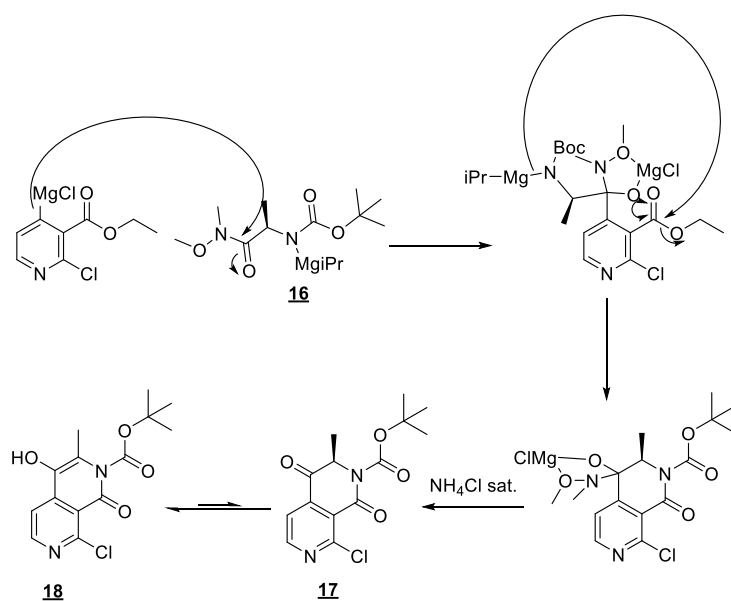


Figure 119 : Mécanisme de formation du dérivé **18**

En utilisant la base de Knochel-Hauser comme agent d'ortho-méallation et des électrophiles dérivés de la *N*-phthaloyl-*D*-alanine, aucun résultat intéressant n'a été obtenu. C'est en utilisant les électrophiles de la *N*-Boc-*D*-alanine, et en procédant à une déprotonation préalablement,

que la position 4 du 2-chloronicotinate d'éthyle **2** a pu être fonctionnalisée par ortho-magnésiation. La molécule majoritaire à savoir le dérivé **18** isolée lorsque l'amide de Weinreb **15** de la *N*-Boc-D-alanine a été utilisé comme électrophile est particulièrement intéressante. La formation de ce composé fait intervenir une réaction de cyclisation intramoléculaire. Cette cyclisation intramoléculaire s'explique d'une part par la nucléophilie de l'azote, d'autre part par le fait que l'ester éthylique est un bon électrophile et l'éthanolate un bon groupe partant. Bien que cette cyclisation ne soit pas souhaitable, elle pourrait être considérée comme un point positif pour la preuve du concept avancé dans cette thèse. En effet cette cyclisation est la preuve que l'azote, même si nous avons un amidure ici, est potentiellement capable d'attaquer l'ester en position 3 de la pyridine, aboutissant à la formation d'un cycle à 6 chaînons.

Dans un premier temps, il est souhaitable d'éviter cette cyclisation intramoléculaire afin d'obtenir le dérivé nicotinate auto-immolable qui assure la démonstration, sans ambiguïté, du concept. Pour cette raison, il convient d'utiliser en position 3 du noyau pyridine un ester suffisamment stable pour éviter les réactions de cyclisation intramoléculaire et suffisamment labile pour permettre une auto-immolation après déprotection de l'azote ; ce qui permettrait d'apporter la preuve du concept. Nous avons donc envisagé d'utiliser le 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21** en considérant que, l'encombrement généré par le groupe *t*-butyle empêchera la cyclisation intramoléculaire.

Au regard des médiocres rendements des ortho-magnésiations, nous avons choisi d'abandonner la base de Knochel-Hauser pour le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridure de lithium (LiTMP). En effet contrairement à ce que les auteurs avancent,^{280,288} la base de Knochel-Hauser que nous avons synthétisée est stable pendant 3 semaines maximum, avec une baisse progressive du titre de la base au fil du temps. Nous avons donc décidé d'utiliser une autre base, le LiTMP, qui est préparée extemporanément pour l'ortho-métallation. Cette base est également connue pour être utilisée dans les réactions d'ortho-métallation.

²⁸⁸ Krasovskiy, A.; Knochel, P. **2006**, No. 5, 890–891.

3.2. Ortho-lithiation du 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21**

Nous avons évalué dans cette section la synthèse du dérivé **19** [Figure 120].

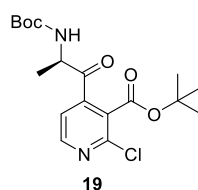


Figure 120 : 2-chloronicotinate de *t*-butyle substitué en position 4 par *N*-Boc-*D*-alanine

Pour l'ortho-métallation avec le LiTMP, nous nous sommes inspiré du protocole de Pooni et *al.* [Figure 121]²⁷⁸ qui suggèrent l'ortho-fonctionnalisation de l'acide 6-chloronicotinique à partir d'une préparation extemporanée de LiTMP comme agent d'ortho-lithiation et l'amide de Weinreb *N*-méthoxy-*N*-méthylacétamide **15** comme électrophile.

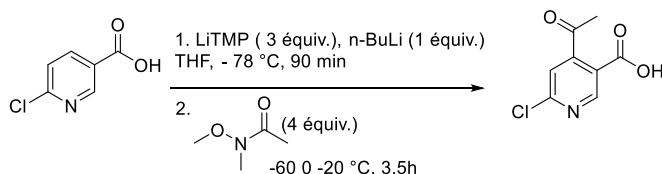


Figure 121 : Ortho-lithiation d'après [278]

L'acylation de l'acide 2-chloronicotinique a été effectuée avec 2 équivalents de chlorure d'oxalyle en présence de DMF en catalytique. Le 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21** a été synthétisé à partir du chlorure de 2-chloronicotinoyle **20** et de *t*-butanolate de potassium. Après purification sur colonne, il a été obtenu avec un rendement quasi quantitatif [Figure 122].

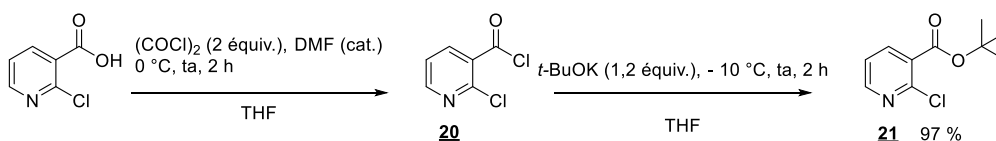


Figure 122 : Synthèse de 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21**

Pour la fonctionnalisation du 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21**, nous avons dans un premier temps appliqué le protocole de Pooni et *al.* Nous obtenons un mélange de plusieurs produits que nous n'avons pas pu identifier. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'il y a un large excès de lithien pouvant être la source de plusieurs réactions parasites. Nous avons alors décidé de diminuer la quantité de LiTMP à 2,1 équivalents. En réalisant l'ortho-lithiation avec

2,1 équivalents de LiTMP à -78 °C pendant 1 h, le piégeage avec du D₂O révèle une conversion de 100 % en analyse RMN [Figure 123].

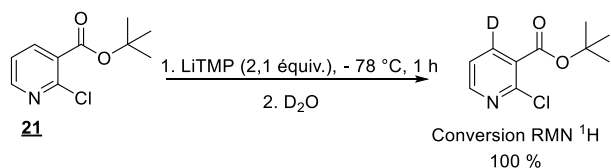


Figure 123 : Essai d'ortho-lithiation de 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21**

Au regard de ce résultat satisfaisant, nous avons procédé à la fonctionnalisation du 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21** en utilisant ces nouvelles conditions. Ainsi après ortho-lithiation, l'amide de Weinreb **15** de la *N*-Boc-D-alanine préalablement déprotoné a été ajouté. La molécule obtenue n'est pas la cétone attendue mais une lactone [Figure 124].

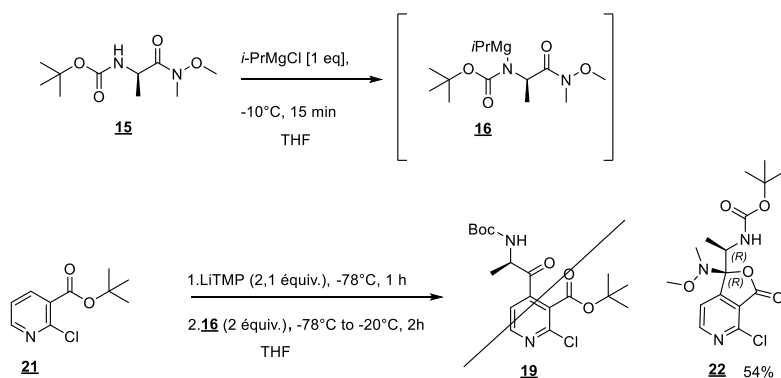


Figure 124 : Ortho-lithiation du 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21** avec l'amide Weinreb de *N*-Boc-D-alanine **15**

L'hypothèse mise en avant pour expliquer la formation de cette lactone, est la possibilité d'une réaction intramoléculaire de l'intermédiaire tétraédrique généré au cours de l'ortho-lithiation. L'atome d'oxygène chélaté par le lithium se serait additionner sur le carbonyle de l'ester *t*-butylique [Figure 125].

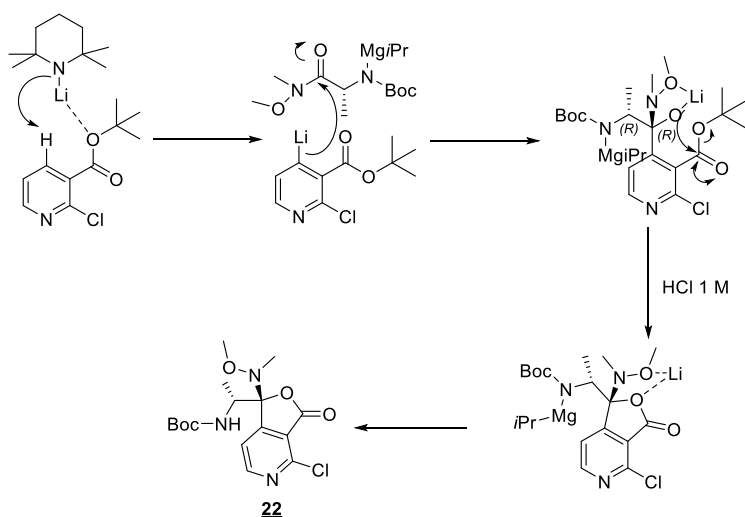


Figure 125 : Mécanisme de formation du dérivé lactone **22**

Les analyses RMN indiquent la présence d'un seul diastéréoisomère. L'obtention de cristaux et l'analyse cristallographique ont permis de confirmer qu'il s'agit du diastéréomère *RR*. Nous avons tenté de comprendre la formation de cet unique diastéréomère. En effet parmi les conformères de l'amide de Weinreb **15**, seules deux d'entre eux sont dits privilégiés c'est-à-dire présentant les énergies de conformation les plus basses. Dans ces conformères, le substituant le plus volumineux du carbone asymétrique en α du carbonyle, est perpendiculaire au carbonyle. En considérant ces deux conformères et la règle de Burgi-Dunitz, selon laquelle l'attaque nucléophile d'un carbonyle se fait dans un angle d'environ 107° avec le carbonyle, 4 trajectoires de l'attaque nucléophile sont possibles [Figure 126].



$\text{Nu} = \text{RLi}$

Figure 126 : Représentation des différentes trajectoires d'addition nucléophile sur **15**

En appliquant le modèle de Felkin-Ahn, selon lequel le nucléophile attaque préférentiellement du côté du substituant le moins volumineux, une seule trajectoire privilégiée de l'attaque nucléophile se dégage, à savoir la trajectoire représentée en vert [Figure 127]. Toutefois, en présence d'un chélateur de doublet libre, comme le magnésium, l'attaque nucléophile est alors gouvernée par la chélation. Cette chélation a comme conséquence la redéfinition d'un nouveau plan d'attaque du nucléophile, de telle sorte que le groupe le plus volumineux n'est

plus positionné de façon perpendiculaire au carbonyle, mais il est positionné le plus près possible de l'oxygène du carbonyle [Figure 127]. De plus, la chélation conduit à une haute diastéréosélectivité. C'est donc le mécanisme induit par la présence du chélateur qui explique la formation du diastéréoisomère *RR*.

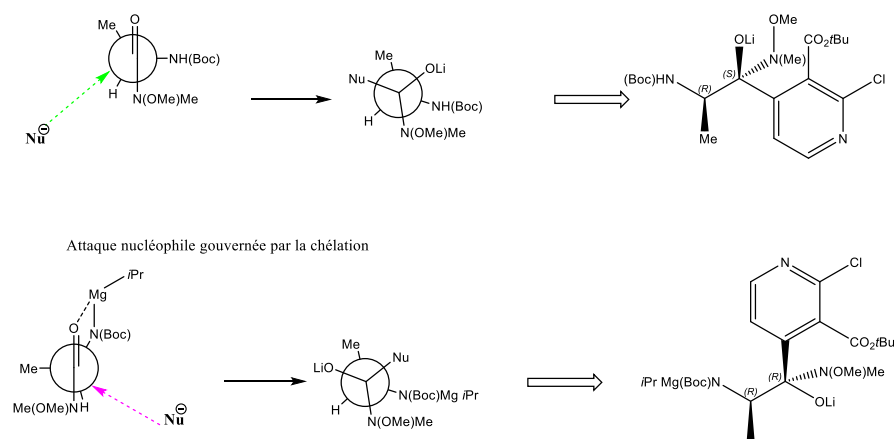


Figure 127 : Attaque nucléophile selon le modèle de Felkin-Ahn (en vert), Attaque nucléophile gouvernée par la chélation (en rose)

4. Preuve de concept de l'auto-immolation et substitution nucléophile sur le dérivé lactonique 22

4.1. Preuve de concept de l'auto-immolation du système lactonique obtenu

Le dérivé lactonique obtenu n'est pas la molécule que nous espérons obtenir lors de la fonctionnalisation du 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21**. Toutefois, ce dérivé nous a semblé intéressant comme molécule pouvant servir à apporter la preuve de concept avancée dans cette thèse. Nous avons donc procédé à des traitements acide et basique du dérivé lactonique afin de démontrer le concept d'auto-immolation par cyclisation intramoléculaire. En effet en milieu acide, l'amine est déprotégée et devient alors capable de s'engager dans une attaque du carbonyle avec cyclisation du système par un mécanisme d'addition-élimination [Figure 128].

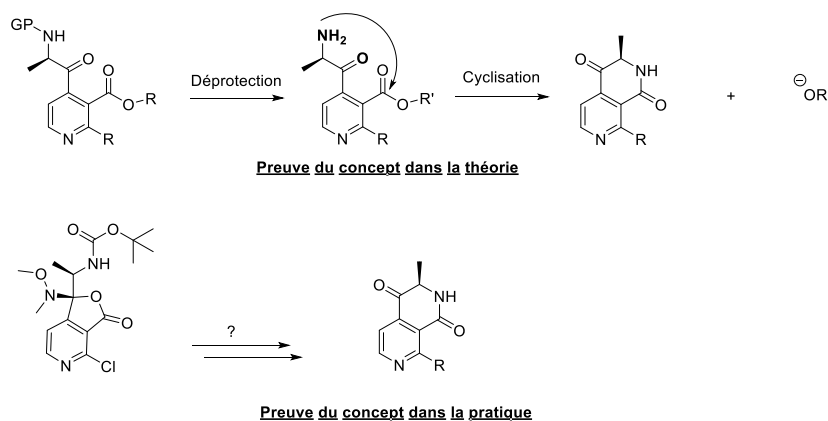


Figure 128 : Preuve de concept

Nous avons donc traité le dérivé lactonique **22** avec du HCl 6 M aqueux, deux composés se sont formés. Nous avons tenté plusieurs fois de les isoler, sans y parvenir. Nous avons donc procédé autrement, à savoir une déprotection de l'amine en présence de TFA (acide trifluoroacétique) dans le dichlorométhane. Cette façon de procéder a permis d'obtenir le sel de TFA du dérivé lactonique **23** déprotégé avec un rendement quantitatif [Figure 129].

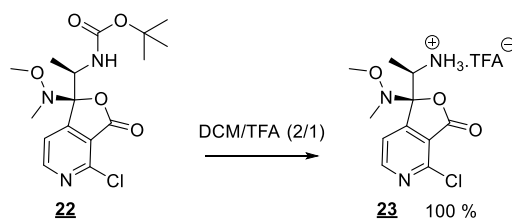


Figure 129 : Deprotection du dérivé lactonique **22** par le TFA

Nous avons ensuite procédé à des traitements basiques de ce sel de TFA. En présence d'une base forte comme la soude, le sel se dégrade totalement. En présence de base faible comme la triéthylamine, le sel est stable et aucune réaction ne se produit. En présence de base inorganique comme le carbonate de potassium (K_2CO_3) nous avons réussi à isoler un produit cyclisé (**24**) après une étape de neutralisation et d'extraction [Figure 130].

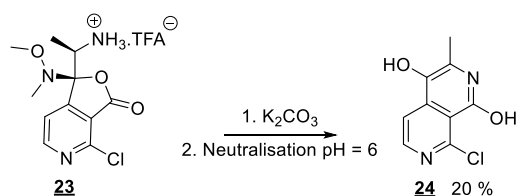


Figure 130 : Traitement du sel de TFA lactonique par une base inorganique

Ce produit cyclisé est le résultat de l'attaque nucléophile de l'azote sur la lactone. Cette cyclisation est la preuve de concept d'auto-immolation du système pyridinique proposé dans

cette thèse [Figure 131]. Malheureusement des problèmes de reproductibilité de cette cyclisation ont été rencontrés, de telle sorte que nous n'avons pas réussi à caractériser de façon complète le produit de cyclisation. L'analyse RMN du proton a néanmoins permis de confirmer la formation de l'énol **24**. En effet après formation de la cétone, la forme énol est privilégiée du fait de l'aromaticité.

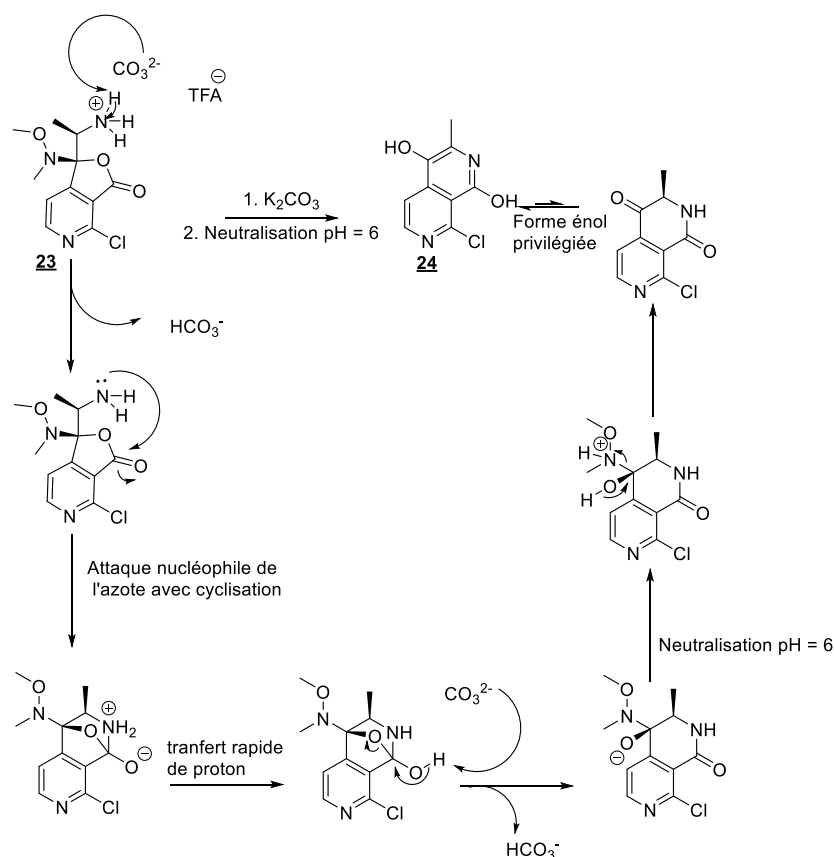


Figure 131 : Proposition de mécanisme conduisant au produit de cyclisation **24**

Nous avons ensuite tenté un traitement basique du dérivé lactonique avec de la soude 5 M. Le dérivé se dégradait lorsque le traitement basique durait plus de 5 h. Un traitement basique d'environ 15 min, suivi d'une étape d'acidification avec du HCl 1M a permis d'isoler un dérivé lactol **25** [Figure 132]

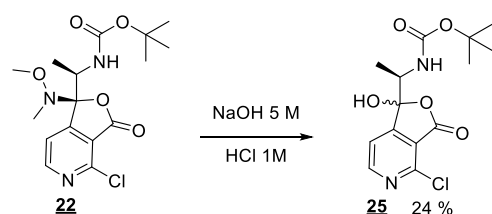


Figure 132 : Traitement du dérivé lactonique **22** par du NaOH 5 M

La formation de ce dérivé lactol **25** pourrait s'expliquer par deux hypothèses. Tout d'abord, elle pourrait s'expliquer par la formation de l'acide en position 3 du noyau pyridinique lors de l'étape d'acidification. Cet acide réagirait ensuite avec la cétone en position 4 du noyau pyridinique et conduirait ainsi au dérivé lactol **25**. Le résultat de cette addition serait la formation des deux diastéréomères *SR* et *RR* [Figure 133].

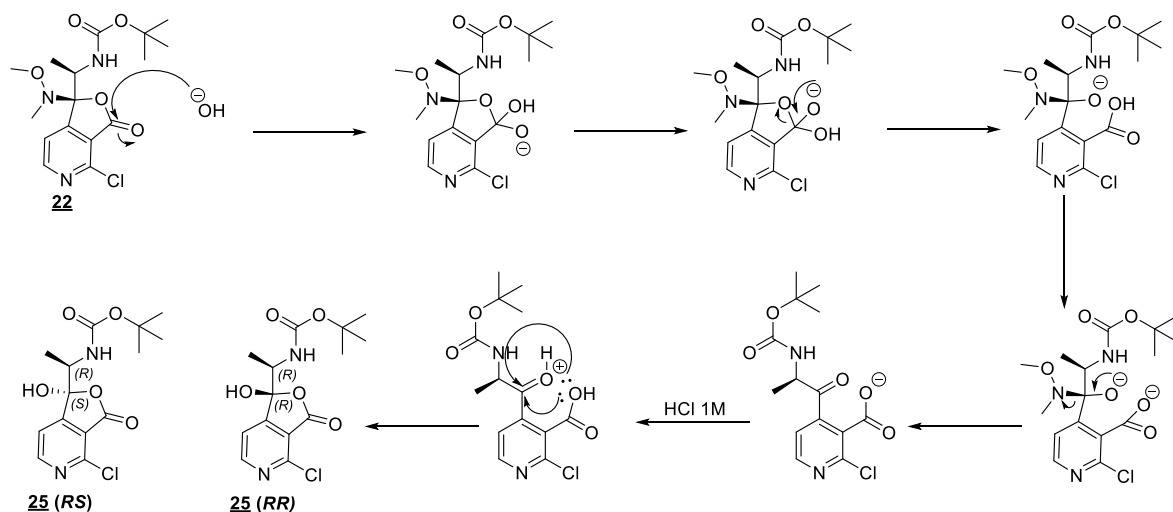


Figure 133 : Première hypothèse de la formation du dérivé lactol **25**

La formation du lactol **25** pourrait également s'expliquer par une substitution nucléophile de type S_N2 en milieu basique. Lors d'une S_N2 sur un carbone asymétrique, il y a inversion de configuration. Dans le cas du dérivé lactonique **22**, la présence d'un second carbone asymétrique fait que le résultat de la S_N2 aboutit à la formation de l'unique diastéréomère *SR* [Figure 134]. Cette dernière hypothèse concorde avec les analyses RMN qui révèlent la présence d'un seul diastéréomère.

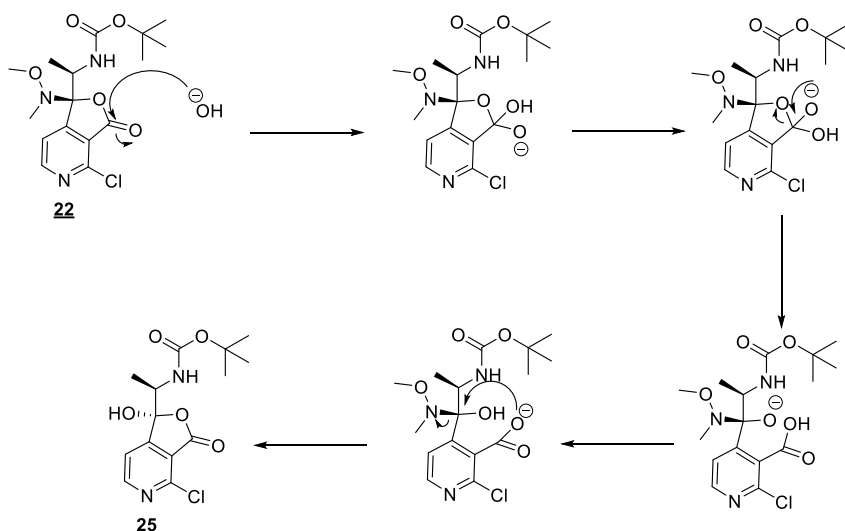


Figure 134 : Seconde hypothèse de formation du dérivé lactol 25

4.2. Substitutions nucléophiles sur le dérivé lactonique **22**

Nous avons également tenté de faire des substitutions nucléophiles sur le dérivé lactonique **22**. Ces substitutions nucléophiles, si elles fonctionnent, pourraient constituer un moyen d'ouvrir et de fonctionnaliser le dérivé lactonique avec un chromophore [Figure 135]. Si cette fonctionnalisation par des S_N est possible, cela sera intéressant lorsqu'il sera question de synthétiser des prochromophores auto-immolables pour la détection de VanX.

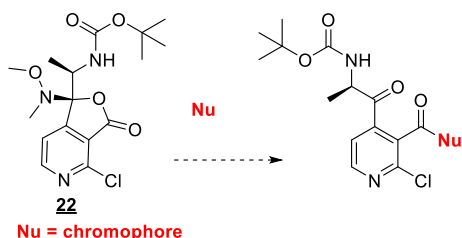


Figure 135 : Ouverture du dérivé lactonique **22** par des nucléophiles

Attaque nucléophile par un alcoolate

Dans un premier temps, nous avons tenté d'obtenir l'ester méthylique correspondant en faisant réagir le dérivé lactonique **22** avec du méthanolate de sodium [Figure 136]. Pour ce faire, le méthanolate de sodium a été préparé pour utilisation extemporanée. Plusieurs produits ont été formés au cours de cette réaction ; mais leur séparation par chromatographie, afin de les caractériser, n'a pas été possible.

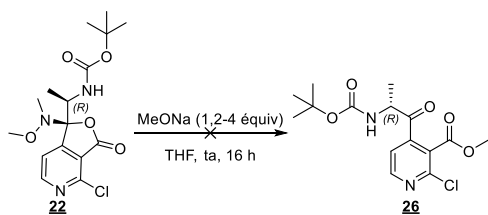


Figure 136 : Substitution nucléophile de **22** par le méthanolate de sodium

Nous avons alors choisi d'utiliser un alcool benzylique préalablement déprotoné avec du *n*-BuLi pour former l'alcoolate de lithium [Figure 137]. Cela n'a pas permis non plus d'isoler le dérivé **27** escompté. Nous avons alors décidé d'utiliser des nucléophiles azotés pour l'attaque du dérivé lactonique **22**.

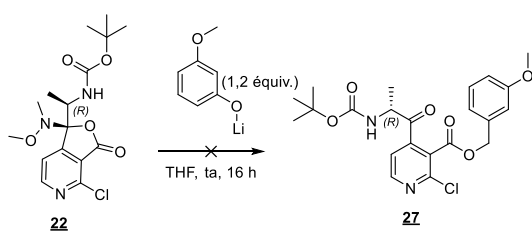


Figure 137 : Substitution nucléophile par le 3-methoxyphénolate de lithium

Attaque nucléophile par un nucléophile azoté

Deux nucléophiles azotés, à savoir l'isobutylamine et l'ammoniaque, ont été choisis pour l'addition nucléophile.

Ainsi, nous avons fait réagir 1 équivalent de dérivé lactonique **22** avec 2 équivalents d'isobutylamine pendant 3 h à 50 °C. La purification par chromatographie a permis d'obtenir l'amide **28** avec un rendement de 40 % [Figure 138].

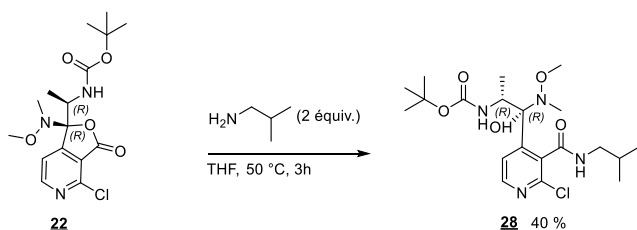


Figure 138 : Substitution nucléophile par l'isobutylamine

La formation de cet amide s'explique par un mécanisme d'addition élimination sur le carbonyle de la lactone. La configuration des carbones reste inchangée [Figure 139].

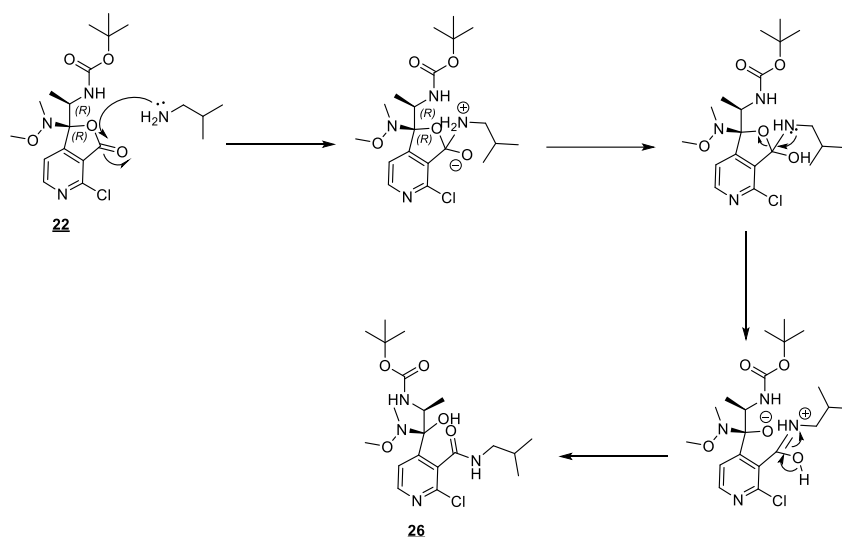
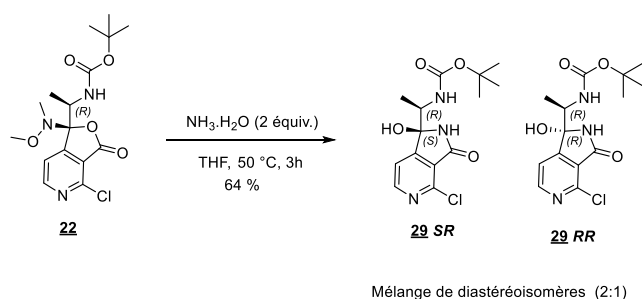


Figure 139 : Proposition de mécanisme de la substitution nucléophile par l'isobutylamine

Nous avons ensuite procédé à une addition de solution aqueuse d'ammoniaque sur le dérivé lactonique. Cette réaction a permis d'obtenir un lactame en mélange diastéréoisomérique dans un rapport 2/1 [Figure 140].



Mélange de diastéréoisomères (2:1)

Figure 140 : Substitution nucléophile par l'ammoniaque

La formation des deux diastéréoisomères pourrait s'expliquer par un mécanisme d'addition élimination sur le carbonyle de la lactone. L'élimination se traduit par la formation d'un carbonyle sur le carbone en β du NH(Boc). La proximité de ce carbonyle avec l'azote de l'amide formé occasionnerait ainsi une réaction d'addition nucléophile sur le carbonyle. Cette addition nucléophile sur le carbonyle peut se faire de deux manières, de telle sorte que les carbones sp^3 issus de ces attaques sont de configuration *S* et *R*. Ceci pourrait expliquer le mélange diastéréoisomérique obtenu [Figure 141].

Suivant le même protocole d'ortho-lithiation, nous avons procédé à la fonctionnalisation du 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21** avec l'amide de Weinreb **32** du dipeptide *N*-Boc-D-Ala-D-Ala. Pour cela l'amide de Weinreb **32** du dipeptide *N*-Boc-D-Ala-D-Ala a été synthétisé. Ainsi, à partir de l'amide de Weinreb **15** de la *N*-Boc-D-Ala que nous avons précédemment synthétisé, nous avons procédé à la déprotection de cet amide de Weinreb **15** dans un mélange dichlorométhane/TFA (2/1). Puis après évaporation sans étape de purification, le sel de TFA de l'amide de Weinreb **31** a été neutralisé avec de la *N*-méthylmorpholine (1 équivalent). Un couplage peptidique a été effectué à partir de cet amide de Weinreb déprotégé (1 équivalent) et de la *N*-Boc-D-Ala (1 équivalent) en présence de *N*-méthylmorpholine (1 équivalent), 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (1 équivalent). L'amide de Weinreb **32** du dipeptide *N*-Boc-D-Ala-D-Ala a été obtenu après purification par chromatographie avec un rendement d'environ 70 % [Figure 143].

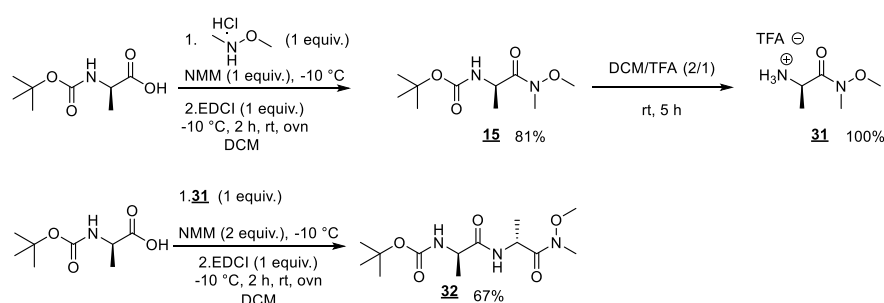


Figure 143 : Synthèse de l'amide de Weinreb **32** du dipeptide *N*-Boc-D-Ala-D-Ala

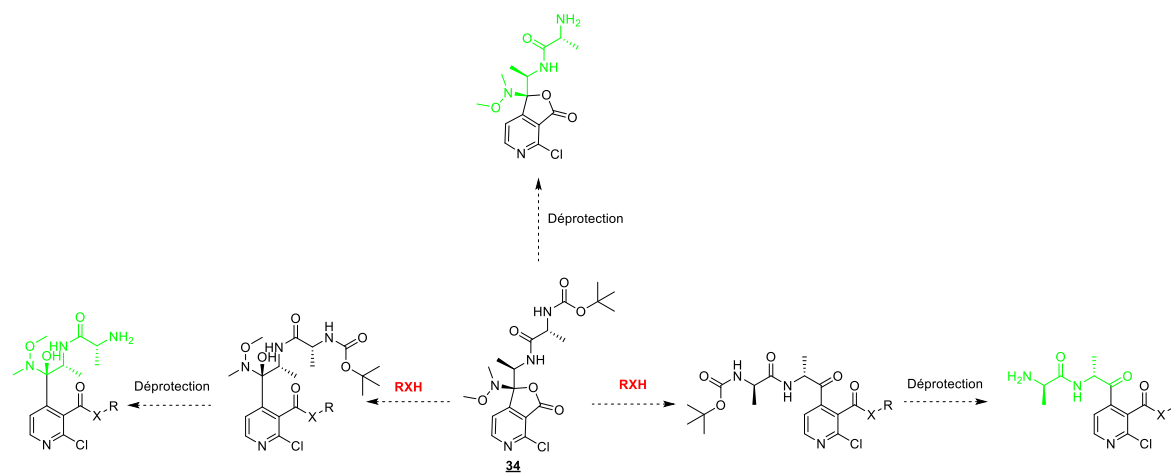
Nous avons ensuite procédé à l'ortho-lithiation du 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21** dans les mêmes conditions que précédemment. L'amide de Weinreb **32** a été préalablement déprotoné avec le chlorure d'isopropylmagnésium avant l'ajout de l'organolithien [Figure 144]. Le dérivé lactonique a été obtenu avec un rendement de 30 % après purification par chromatographie. Nous avons tenté d'améliorer le rendement de cette réaction en augmentant le nombre d'équivalents de l'électrophile jusqu'à 4 équivalents, malheureusement sans amélioration observable de la conversion. Lors de la réaction de déprotonation de l'électrophile, il se forme un gel difficile à agiter convenablement par l'agitateur magnétique. Le faible rendement de cette manipulation pourrait s'expliquer par la gélification du milieu réactionnel.

Conclusion et perspectives

Les travaux de cette thèse se situent à l'interface de la microbiologie et de la chimie. Les travaux en microbiologie ont consisté en des manipulations de génétique. Ces travaux nous ont permis de cloner et surexprimer la protéine recombinante VanX. Le clonage a été effectué dans deux types de vecteurs donnant respectivement une protéine recombinante 6xHis-VanX et une protéine recombinante VanX native qui possèdent toutes-deux une activité D-Ala-D-Ala dipeptidase. La protéine recombinante VanX native semble avoir une activité supérieure à celle de la protéine recombinante 6xHis-VanX. La détermination des constantes enzymatiques, à savoir la constante de Michaelis (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}), est la meilleure façon de comparer ces deux protéines recombinantes afin de choisir la meilleure protéine à utiliser pour la suite de l'étude. Ces constantes caractérisent le couple enzyme-substrat. Lorsque les molécules prochromophores auto-immolables auront été synthétisées, la détermination des constantes enzymatiques pour chaque molécule permettra de les classer et d'identifier celles qui auront les limites de détection les plus faibles de l'activité de VanX.

Quant aux travaux en chimie, il a été question d'apporter la preuve du concept selon lequel un dérivé de type 2-chloronicotinate d'alkyle, fonctionnalisé en position 4 par une D-alanine protégée, est capable après déprotection de se cycliser. Ainsi deux esters, le 2-chloronicotinate d'éthyle **2** et le 2-chloronicotinate de *t*-butyle **21** ont été fonctionnalisés en position 4 avec une D-alanine protégée. Cette fonctionnalisation s'est avérée complexe en raison de la tendance à la cyclisation du système nicotinate. Cette tendance à la cyclisation présente une ambivalence : elle prouve d'une certaine façon l'efficacité de l'auto-immolation du système par cyclisation mais elle augmente les difficultés d'accès aux intermédiaires permettant d'apporter la preuve du concept. Ainsi nous avons rencontré beaucoup de difficultés dans la reproductibilité de la démonstration du concept. Toutefois nous avons poursuivi les manipulations pour synthétiser des molécules auto-immolables comportant la séquence D-Ala-D-Ala. Nous avons ainsi obtenu un premier dérivé lactonique pouvant servir, au cours des prochaines études, de point de départ pour la synthèse de molécules auto-immolables prochromophores par des réactions de substitutions nucléophiles sur le carbonyle du dérivé lactonique **34** [Figure 145]. Avant l'investigation de ces substitutions nucléophiles, le

dérivé lactonique **34** obtenu, une fois déprotégé peut servir de première molécule test pour la détection de l'activité VanX.



RXH = Chromophore, X=N,S,O
D-Ala-D-Ala

Figure 145 : Différentes voies d'accès de prochromophores auto-immolables comportant la séquence D-Ala-D-Ala

Le noyau pyridine est un noyau pauvre en électrons comparativement au benzène, du fait de l'atome d'azote qui joue un rôle désactivant par son effet inductif attracteur. Dans les dérivés nicotiniques fonctionnalisés en position 4, la charge partielle électrophile sur le carbonyle de cette position 4 est potentialisée. Ce qui peut expliquer entre autre la difficulté de former une cétone dans cette position. Le noyau pyridine pourrait être remplacé par le benzène. Avec ce remplacement, deux séries de prochromophores [Figure 146] auto-immolables pourraient être proposées :

- une nouvelle famille de dérivés en série benzénique (1), strictement identique d'un point de vue analogique à l'exception de l'atome d'azote de la pyridine à la série précédente, permettant ainsi de réduire l'électrophilie de la cétone en position 4.
- une autre série (2), cette fois ci basée sur une famille de composés différents, portant une gachette D-Ala-D-Ala relié à un système auto-immolable bien connu le carbamate d'alcool para-aminobenzyle lui-même relié à un chromophore.

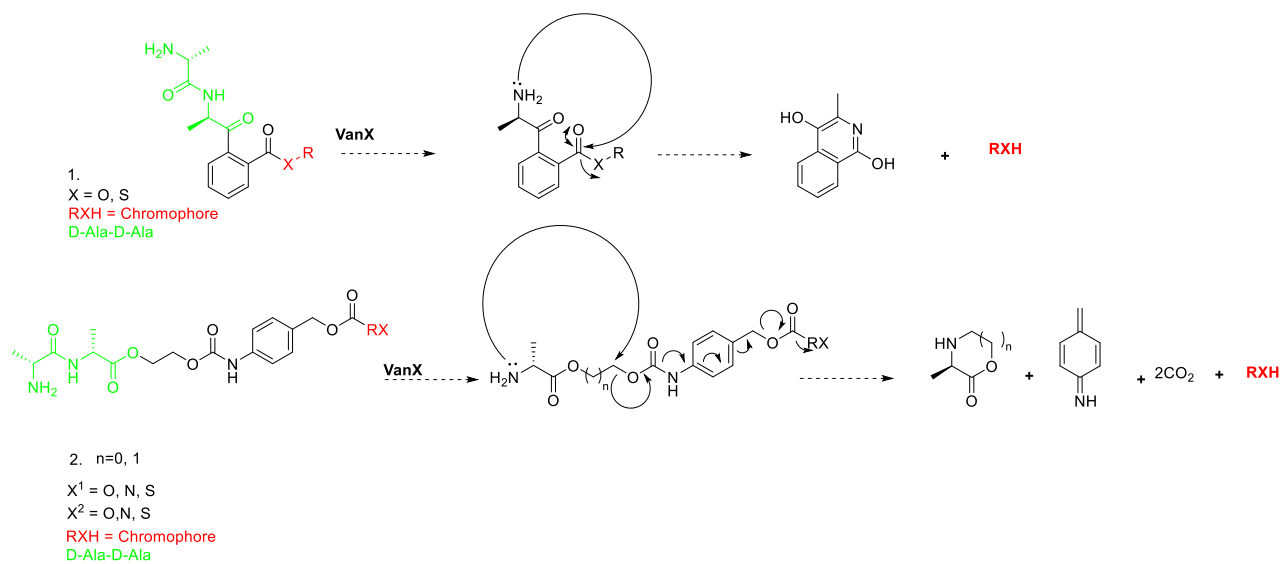


Figure 146 : Systèmes auto-immolables en série benzénique

Experimental section, Materials and equipment

Experimental section, Materials and equipment

1. Microbiology

Appendix 1: Bacterial strains and growth conditions

In this study the following strains have been used.

Tableau 9 Bacterial strains and growth conditions

Strains	Using
<i>Enterococcus faecium</i> van A (+) CNR 15-086 (CNR entérocoque France)	source of DNA
<i>E. coli</i> DH10B (QIAGEN):	Used for the amplification of the plasmid pQE30 with the <i>vanX</i> insert and was prepared as followed: 1. Inoculum 1 %: 3 mL bacteria in 300 mL of LB medium 2. Incubation at 37 °C for 4 h 30, OD = 0.5 3. Successive washing at 2,200 x g for 10 min: twice with sterile distilled water and twice with 10 % glycerol 4. Freezing at -80 °C 100 µL tubes.
<i>Escherichia coli</i> M15 pREP4 (QIAGEN)	Used for the over-expression of the VanX protein tagged 6-Histidines and was prepared as followed: 1. Inoculum 1 %: 1.5 mL bacteria in 150 mL of LB medium 2. Incubation at 37 °C for 3 h, OD = 0.57 3. Successive washing at 2,200 x g for 10 min: twice with SDW and twice with 10 % glycerol 4. Freezing at -80 °C 100 µL tubes.
<i>Escherichia coli</i> One Shot Mach1™ -T1 ^R chemo-competent cells (Invitrogen)	Used for the amplification of pET SUMO with the <i>vanX</i> insert.
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) One Shot (Invitrogen)	Used for over-expression and cleavage of VanX native.

Bacterial growth was monitored at 37 °C with shaking, during a certain time depending on the type of manipulation, transforming or over-expression.

Appendix 2: Different bacterial culture mediums were used:

LB medium: Tryptone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L, NaCl 5 g/L.

BHI medium: beef heart (infusion from 250g), 5 g/L ; calf brains (infusion from 200 g), 12.5 g/L ; disodium hydrogen phosphate, 2.5 g/L ; D(+)-glucose, 2 g/L ; peptone, 10 g/L

S.O.C medium: 2 % Tryptone ; 0.5 % Yeast Extract ; 10 mM NaCl ; 2.5 mM KCl ; 10 mM MgCl₂ ; 10 mM MgSO₄ ; 20 mM glucose.

Appendix 3: Solutions prepared and buffers

All buffers used are from associated kit used and were supplied by the seller

Phosphate buffer are prepared with Sigma Aldrich Phosphate buffered saline tablet.

D-Ala-D-Ala 62 Mm : 1029 mg of D-Ala-D-Ala (Sigma-Aldrich) in 10.29 mL D₂O

ZnCl₂ 16 mM : 86 mg of ZnCl₂ in 4 mL D₂O, then 1/10 dilution in D₂O was done

Annexe 4: Used oligonucleotides

All primers were synthesized by Sigma-Aldrich, France

Tableau 10 : Primers used

Primers	Sequences (5' 3')	Melting temperature	Using
vanX-sacI-F	GGGGTGGAGCTCATGGAAATAGGATTTACTTTTTAG	74.3	Amplification of vanX for cloning into pQE30 vector
vanX-salI-R	CAACGGGTCGACGTTTATTTAACGGGGAAATCAAATAG	78.3	
pQE30-F	TGCCACCTGACGTCTAAGAA	63.5	Verification of insertion and ligation into pQE30 vector
pQE30-R	CCAGCTGAACGGTCTGG	65.1	
vanX-F	ATGGAAATAGGATTTACTTTTTAG	56.8	Amplification of vanX for cloning into pET SUMO vector
vanX-R	TTATTTAACGGGGAAATCAAATAG	61.8	
SUMO-F	AGATTCTTGACGACGGTATTAG	58	Verification of insertion and ligation into pET SUMO vector
T7-R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	62.7	

Appendix 5 : PCR programs and sequencing

All the PCR programs were performed by using a programmable thermal cycler Bio Rad 96 and checked by gel electrophoresis (agarose 1.5 g for 150 mL of TAE 1X buffer, 100 V, 200 mA, 50 min or 100V, 300 mA, 1 h 30). DNA amplification was performed in 50 µL reaction volume

containing 10 μL of 5X buffer, 4 μL of 25 mM MgCl_2 , 2 μL of dNTP mix (5 mM each), 1 μL of Primer Forward (20 μM), 1 μL of Primer Reverse (20 μM), 0.2 μL of *Taq polymerase*, 2 μL of DNA (1-10 ng) and 29.8 μL of sterile distilled water. The nucleotide sequences were analyzed with Nucleotide BLAST programs available on the website of National Center for Biotechnology Information: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

PCR 1

Initial denaturation, 98 °C, 3 min	}	30 cycles
Denaturation 98 °C, 20 sec		
Annealing 54 °C, 20 sec		
Extension 72 °C, 40 sec		
Final extension 72 °C, 5min		

PCR 2

Initial denaturation, 94 °C, 5 min	}	30 cycles
Denaturation 94 °C, 30 sec		
Annealing 54 °C, 30 sec		
Extension 72 °C, 1 min		
Final extension 72 °C, 5 min		

PCR 3

Initial denaturation, 98 °C, 3 min	}	34 cycles
Denaturation 98 °C, 20 sec		
Annealing 52 °C, 20 sec		
Extension 72 °C, 40 sec		
Final extension 72 °C, 5min		

PCR 4

Initial denaturation, 94 °C, 10 min	}	30 cycles
Denaturation 94 °C, 30 sec		
Annealing 52 °C, 30 sec		
Extension 72 °C, 1 min		
Final extension 72 °C, 5min		

Appendix 6: Used plasmid vectors

pQE30 vector²⁸⁹

The pQE30 vector belongs to the pDS family of plasmids. This vector permits high-level expression of 6xHis-tagged proteins in *E. coli* based on the T5 promoter transcription–translation and has the following features in common with the other pQE vectors:

Tableau 11 : pQE30

Feature	Benefit
Optimized promoter–operator element T5 promoter and two <i>lac</i> operator sequences	T5 promoter recognized by the <i>E. coli</i> RNA polymerase. <i>lac</i> operator increase <i>lac</i> repressor binding and ensure efficient repression of the powerful T5 promoter.
RBSII Synthetic ribosomal binding site	Allows high translation rates.
6xHis-tag	Coding sequence either 5' or 3' to the cloning region, and allowing purification of recombinant fusion protein on metal-chelating resin.
Multiple cloning site and translational stop codons in all reading frames	Allow convenient preparation of expression constructs
Two strong transcriptional terminators: t_0 from phage <i>lambda</i> , and T1 from the <i>rrnB</i> operon of <i>E. coli</i> ,	Prevent read-through transcription and ensure stability of the expression construct.
Ampicillin resistance gene or β -lactamase gene (<i>bla</i>)	Allows selection of plasmid in <i>E. coli</i> .
ColE1	Origin of replication.

pREP4 plasmid²⁸⁹

The pREP4 plasmid is derived from pACYC and contains the p15A replicon; it constitutively expresses the *lac* repressor protein encoded by the *lacI* gene and confers kanamycin resistance. pREP4 present in the host cells ensures the production of high levels of the *lac* repressor protein which binds to the operator sequences and tightly regulates recombinant protein expression. The pREP4 plasmid is compatible with all plasmids carrying the ColE1 origin of replication, and is maintained in *E. coli* in the presence of kanamycin at a concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$.

pET SUMO vector²⁷²

The pET SUMO vector uses a small ubiquitin-like modifier (SUMO) to allow expression, purification, and generation of native proteins in *E. coli*. SUMO fusions may increase the expression of recombinant proteins and enhance the solubility of partially insoluble proteins. In addition, the tertiary structure of the SUMO protein is specifically recognized and cleaved by a SUMO Protease for the production of native protein. The linearized pET SUMO vector has single 3' deoxythymidine (T) residues which allow PCR inserts to ligate efficiently into the vector. The pET SUMO vector is designed to facilitate cloning of PCR products for regulated expression in *E. coli* and has the following features:

Tableau 12 : pETSUMO

Feature	Benefit
T7 promoter	Allows high-level, IPTG-inducible expression of the recombinant protein in <i>E. coli</i> strains expressing the T7 RNA polymerase.
<i>lac</i> operator (<i>lacO</i>)	Binding site for <i>lac</i> repressor that serves to reduce basal expression of your recombinant protein.
Ribosome binding site	Optimally spaced from the TA Cloning® site for efficient translation of PCR product.
N-terminal 6xHis tag	Allows purification of recombinant fusion protein on metal-chelating resin (i.e. ProBond™ or Ni-NTA). In addition, allows detection of recombinant protein with the Anti-HisG Antibodies.
SUMO ORF	Enhances recombinant protein expression and solubility and allows cleavage by SUMO Protease to produce native protein.
SUMO Forward priming site	Allows sequencing of the insert
TA Cloning® site (5' T-overhangs)	Allows ligase-mediated cloning of <i>Taq</i> -amplified PCR products.
T7 Reverse priming site	Allows sequencing of the insert.
T7 transcription termination region	Sequence from bacteriophage T7 which allows efficient transcription termination.
Kanamycin resistance gene	Allows selection of the plasmid in <i>E. coli</i> .
pBR322 origin of replication (<i>ori</i>)	Allows replication and maintenance in <i>E. coli</i> .
<i>ROP</i> ORF	Interacts with the pBR322 origin to facilitate low-copy replication in <i>E. coli</i> .
<i>lacI</i> ORF	Encodes <i>lac</i> repressor that binds to the T7 <i>lac</i> promoter to block basal transcription of the gene of interest and to the <i>lacUV5</i> promoter in the host chromosome to repress transcription of T7 RNA polymerase.

Appendix 7: SDS-PAGE analysis

Samples were analyzed with 12% SDS-PAGE electrophoresis (Novex® 12 % Tris-Glycine Gel, 10 wells of 1mm) for 2 h at an intensity of 20 mA and a voltage of 90 V. Samples were half diluted in the following deposition buffer (2X): 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8; 20 % Glycerin; 4 % β -mercaptoethanol; 2 g/L of bromophenol blue; 40 g/L of SDS. The migration buffer that has been used is Tris-Glycine 1X (Novex® Running Buffer Tris-Glycine). The gel was incubated in Coomassie staining solution (2.75 g Coomassie dye, 250 mL ethanol, 50 mL acetic acid, 250 mL H₂O) for 30 min to 2 h with gentle shaking. Then, the gel was agitated gently in destaining solution (400 mL ethanol, 100 mL acetic acid, 500 mL H₂O) until the background became clear (30 min-2 h).

Appendix 8 : Cloning, over-expression and purification of VanX-6His-tag from pQE30 over-expression system

The DNA of *E. faecium vanA(+)* CNR 15-086 (CNR enterocoque, France) was extracted using the NucliSens™ Easy Mag from BioMerieux® (France). From this DNA, the PCR amplification of *vanX*, the gene of interest, was carried out using *vanX-sacI*-F and *vanX-salI*-R primers harboring restriction enzymes sites and Q5 High-Fidelity DNA Polymerase as polymerase. The **PCR 1** program was used.

Then the PCR product was purified with « QIAquick gel extraction » kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The pQE30 vector was extracted by using the « QIAgen QIAprep spin miniprep » kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Both PCR product and pQE30 vector were digested by *sacI* and *SalI*, restriction enzymes (New England Biolabs, Evry, France) at 37 °C during 30 min in CutSmart buffer (New England Biolabs® Inc.), then the restriction enzymes were inactivated at 65 °C during 20 min. The digested products were purified using a commercially available kit of purification « QIAgen minElute Reaction cleanup » kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), prior to ligation. The ligation was carried out with T4 DNA ligase (Roche®) as followed: Plasmid/PCR product (1/10), 16 °C, 30 min; 65 °C, 15 min. The ligation was checked by **PCR 2** program with pQE30-F and pQE30-R as primers. Electrocompetent *E. coli* DH10B were transformed with the ligation mix. After transformation, the electrocompetent cells were immediately taken up in LB medium and cultured at 37 °C with shaking for 1 h. Cells were then plated on LB agars with antibiotics (ampicillin 100 μ g/mL) and incubated at 37 °C for 24 to 48 h. Clones were then

isolated, to verify the presence of the pQE30Ω*vanX* construct by **PCR 2** program with pQE30-F and pQE30-R primers. Then the pQE30Ω*vanX* construct was extracted and electroporation, cloning steps were performed with competent M15 pREP4 cells on LB plates containing ampicillin 100 µg/mL and kanamycin 25 µg/mL. The positives clones were checked by **PCR 2** program with pQE30-F and pQE30-R primers. The PCR product was sent to GATC Biotech society (Constance, Germany) for DNA sequencing. The M15 pREP4 pQE30Ω*vanX* cells were grown in liquid BHI (ampicillin 100 µg/mL and kanamycin 25 µg/m) to OD₆₀₀ = 0.5-0.8, and expression of *vanX* gene was induced by addition of IPTG (1 mM). After 4 h of growth at 37 °C, cells were collected by centrifugation at 5,000 x g, 4 °C, for 15 min. Purification of VanX-6xHis tag was carried out with the « Ni-NTA Fast Start (Qiagen S.A, France) » kit. The recombinant VanX-6xHis tag binds with high selectivity and affinity to the Ni-NTA, thanks to the 6xHis tag. Pure VanX-6xHis tag protein was concentrated on microcon[®] Device 10K by centrifugation with a 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) (once at 14,000 x g, 15 min, 4 °C; once at 1,000 x g, 3 min, 4 °C). Then the protein concentration was determined by using Bradford protein assay or by measuring with « NanoDrop One » apparatus. Then the recombinant VanX-6xHis was lyophilized (University of Caen, France) and frozen at -80 °C for enzymatic studies. From over-expression steps to purification steps, aliquots were frozen at -20 °C for SDS-PAGE analysis. Enzymatic activity of VanX-6xHis tag was carried out as followed: 2-5 µg of lyophilized VanX was brought into contact with 200 µl of 16 mM ZnCl₂ previously dissolved in D₂O, 100 µl of phosphate buffer 25 mM for 5 min at 37 °C; then 7.26-100 µL of 62 mM D-Ala-D-Ala were added and incubated for 18-24 h at the same temperature. An NMR spectrum of ¹H (400MHz, D₂O) was performed to ensure the disappearance of the dipeptide D-Ala-D-Ala with the appearance of the amino acid D-Ala.²⁶⁶

The recombinant VanX-6xHis did not allow complete hydrolysis of the dipeptide. After having identified the probable cause of this partial activity, we decided to synthesize a recombinant protein VanX without the 6xHis tag

Appendix 9: Cloning, over-expression and purification from pET SUMO Protein Expression System

DNA of *E. faecium vanA(+)* CNR 15-086 was amplified **PCR 3** program using vanX-F, vanX-R primers and « GoTaq[®] G2 flexi DNA polymerase » (Promega) enzyme which is a full-length form of Taq DNA polymerase and possesses 5'→3' exonuclease activity. The purification of the

PCR product was carried out by a « QIAquick PCR Purification (Qiagen) » kit (Quiagen, Courtaboeuf, France). To set up ligation a 1/1 ratio of pET SUMO (Invitrogen)/ *vanX* was used as followed: 2 μ l of PCR product (28 ng / μ l), 1 μ l ligation buffer 10X (60 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mg/ml bovine serum albumin, 70 mM β -mercaptoethanol, 1 mM ATP, 20 mM dithiothreitol, 10 mM spermidine), 2 μ l pET SUMO vector (25 ng / μ l), 4 μ l sterile water, 1 μ l T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units), Incubation overnight at 15 °C. The ligation mix was transformed in One Shot Mach1™ -T1^R competent cells following the procedure of the Champion™ pET SUMO Protein Expression System manuel.²⁷² The resulting clones were analyzed by **PCR 4** program with SUMO-F and T7-R primers. The positive clones were used for the extraction of the pET SUMO Ω *vanX* construct by using the « GeneJET Plasmid Miniprep » kit. The pET SUMO Ω *vanX* construct was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells.²⁷² Before any step of over-expression of the recombinant protein, **PCR 4** program was carried out on the *E. coli* BL21 (DE3) clones. The PCR product was sent to GATC Biotech society for DNA sequencing. Gene coding the recombinant protein expression needs to be induced by IPTG (1 mM) at OD₆₀₀ [0.4-0.6]. The SUMO-VanX-6xHis tag was purified using the « Ni-NTA Fast Start» kit (Qiagen S.A, France), then concentrated (Thrice at 14,000 g, 4 °C, 15 min) and dialyzed (Once at 14,000 g, 4 °C, 3 min) through microcon® 30K with the adequate buffer for SUMO protease cleavage. The SUMO protein was cleaved by SUMO protease in an adequate buffer (20 mM Tris-HCl; pH 7.6; 150 mM NaCl; 1mM dithiothreitol (freshly added)). The native VanX was recovered after ultrafiltration with microcon® 10K devices (10,000 x g, 10 min, 4 °C) and was concentrated on microcon® 10K by several centrifugations with a 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) (thrice at 10,000 x g, 15 min, 4 °C; once at 1,000 x g, 2 min, 4 °C). The concentration was determined by « NanoDrop One » apparatus and the native VanX was frozen at -80 °C for enzymatic studies. Enzymatic studies were carried out by modifying the procedure of Ming-Lung Hsieh *et al.* for qualitative activity of the native VanX.²⁶⁶ The correct sequence of VanX was identified by protein sequencing (MALDI-TOF MS-MS, University of Caen, France).

2. Chemistry

Reactants and reagents: All commercially available compounds were used as received without further purification.

Water and air sensitive reactions were performed under inert atmosphere, using dry solvents and all glassware were oven-dried and flushed with nitrogen prior to use. Syringes and needles were purged with nitrogen prior to use.

Column chromatography was performed on silica gel (60 Å, 0.063-0.2 mm).

IR spectra were recorded on KBr discs

¹H, ¹³C NMR spectrometer

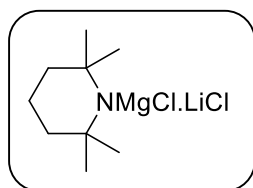
¹H and ¹³C spectra were recorded, respectively, at 400 MHz and 100 MHz with a Joel Lambda 400 NMR spectrometer or Bruker Avance 400 spectrometer. CDCl₃ or CD₃OD or CD₃CN or DMSO-*d*₆ or D₂O were used as solvents. ¹H and ¹³C chemical shifts (δ) are quoted in ppm relative to residual peaks as appropriate. The coupling constant (*J*) are given in Hertz (Hz). The NMR signals were designated as follows: s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), p (pentalet), h (heptuplet), m (multiplet), or a combination of the above.

Melting point were automatically determined with Stuart SMP50 automatic melting point equipement.

High resolution mass spectra were performed at 70 eV by electronic impact (HRMS/EI), or by electrospray on a Bruker maXis mass spectrometer or on a Q-TOF Micro WATERS (HRMS/ESI).

X-ray diffraction experiments were performed with PHOTON II detector–monochromatized Mo Kα radiation on a Bruker-D8 Quest diffractometer at 150K. Program used to solve structure: SHELXS97.[419]. Program used to refine structure: SHELXL97.[420].

Preparation of TMPMgCl.LiCl^{288,290}



A dry and nitrogen flushed 100 mL Schlenk-flask, equipped with a magnetic stirring bar, was charged with a freshly titrated *i*PrMgCl.LiCl (30 mmol, 1 equiv. 1.25 M in THF). 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TMPH) (32.25 mmol, 1.05 equiv.) was added dropwise at 25 °C and stirred at the same temperature for 48h. The TMPMgCl.LiCl solution was titrated by using benzoic acid (61 mg, 0.5 mmol) in dry THF (1 mL) and 4-(phenylmazo)diphenylamine as an indicator (colour change from yellow to purple). A concentration of 1 M in THF was obtained.

Typical procedure for magnesiation and electrophilic trapping of ethyl 2-chloronicotinate

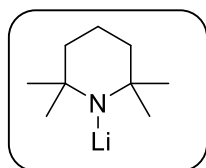
TP1²⁸⁶

A nitrogen-flushed round bottom flask was charged with ethyl 2-chloronicotinate **2** (1 equiv. in THF). The solution was cooled to -40 °C, TMPMgCl.LiCl (2 equiv.) was added dropwise. The mixed was stirred at the same temperature for 2 h and the chosen electrophile pre-deprotonated or not (1.25 equiv.) was slowly added at -40 °C. After stirring for 30 min the reaction was allowed to reach room temperature and was stirred for another 2 h.

Typical procedure for deprotonation of the electrophile TP2²⁸⁷

A nitrogen-flushed round bottom flask, was charged with the chosen electrophile (1 equiv.) in dry THF. The solution was cooled at -10°C and *i*PrMgCl (1 equiv. in THF) was added dropwise. The reaction was stirred at the same temperature for 15 min.

Preparation of LiTMP²⁷⁸



A nitrogen-flushed round bottom flask, was charged with 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (2.2 equiv. in THF). The solution was cooled to -78 °C and *n*-BuLi (2.1 equiv. 2.5 M in THF) was added dropwise. The reaction was allowed to warm up to 0 °C and then recool to -78 °C for the lithiation.

Preparation of CuCN.2LiCl solution²⁹¹

CuCN.2LiCl solution (1.0 M in THF) was prepared by drying CuCN (3.59 g, 40 mmol) and LiCl (3.39 g, 80 mmol) in a Schlenk tube under vacuum at 140 °C for 5 h. After cooling, 40 mL of dry THF was added and stirring was continued until all salts were dissolved.

Typical procedure for lithiation and electrophilic trapping of *tert*-butyl 2-chloronicotinate TP3

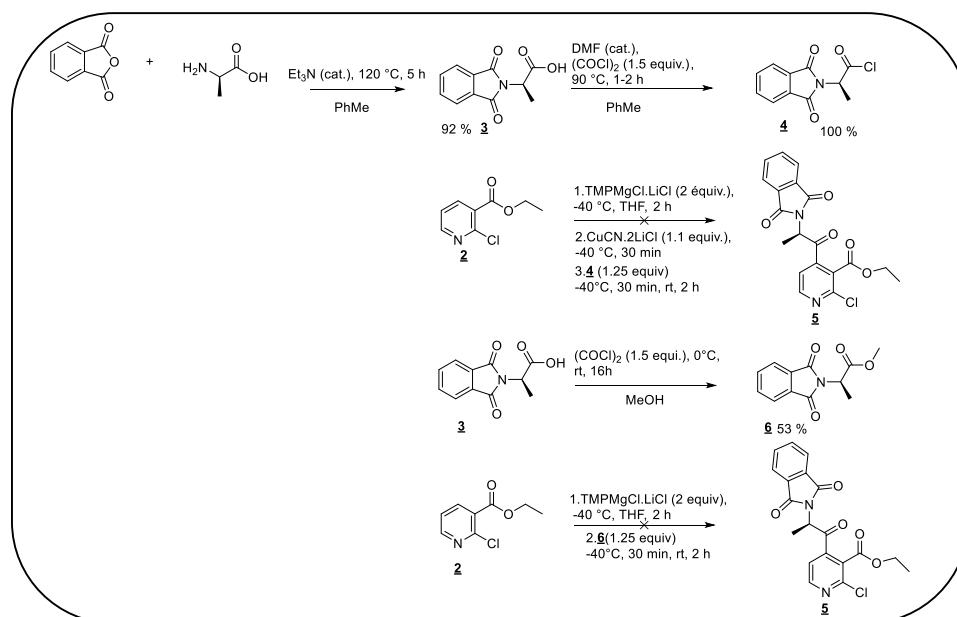
To *tert*-butyl 2-chloronicotinate **21** (2 equiv. in THF), a fresh LiTMP (2.1 equiv in THF) solution was added dropwise at -78 °C and the reaction was left to stir for 1 h. Then the chosen pre-deprotonated electrophile was added dropwise. The reaction was allowed to warm from -78 °C to -20 °C for 2 h. A solution of HCl 1 M was added to the mixture and extracted with ethyl acetate.

Typical procedure for nucleophile additions on 12 TP4

In a sealed tube were introduced **22** (1 equiv.) and the chosen nucleophile (2 equiv.) in THF. The mixture was stirred at 50 °C for 3-5 h.

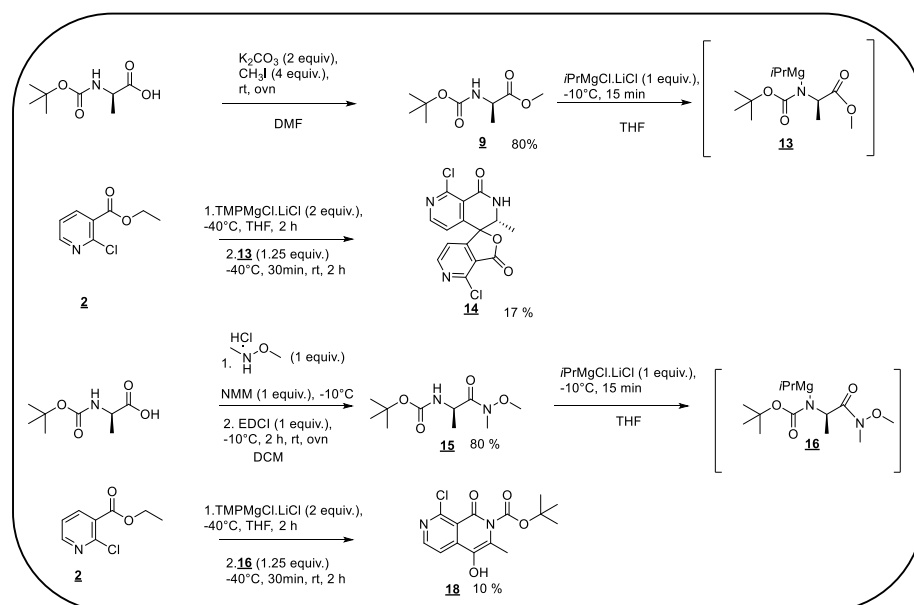
Synthesis of a pyridine derivative substituted in position 4 by protected D-Alanine

N-Phtaloyl D-Alanine

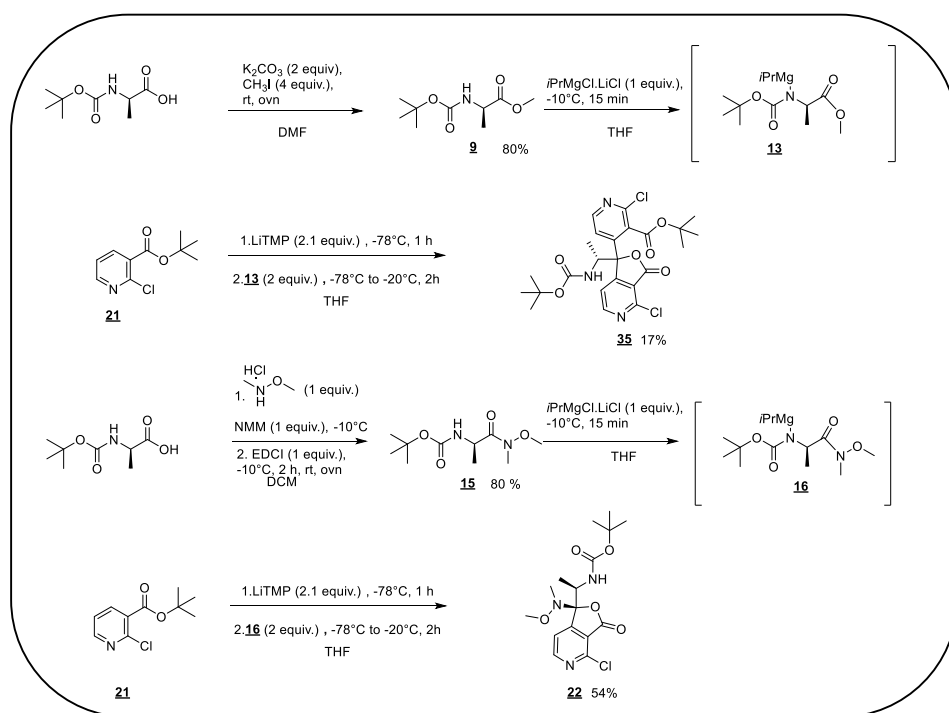


Schema 1 : Ortho-metalation of ethyl 2-chloronicotinate **2** with N-phthaloyl-D-alanine

Boc-D-Alanine

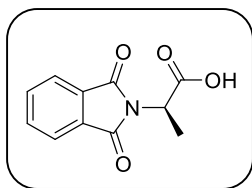


Schema 2: Ortho-metalation of ethyl 2-chloronicotinate **2** with N-Boc-D-alanine



Schema 3 : Ortho-metallation of tert-butyl 2-chloronicotinate **21**

(R)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanoic acid 3



Aspect: White solid

Chemical Formula: C₁₁H₉NO₄

Molecular Weight: 219.20

Yield: 92%

To phthalic anhydride (1.49 g, 10 mmol) in 30.00 mL of toluene, D-alanine (0.90 g, 10 mmol) was added, with 0.10 mL of triethylamine. The solution was refluxed 5 h at 120 °C and evaporated under reduced pressure. Water was added and the mixture was acidified with hydrochloric acid (1M). After filtration, washing with water of the precipitate *N*-phthaloyl-D-alanine 3 (2.02 g, 9.21 mmol) was obtained as a white solid.

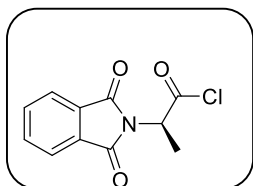
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.95 (s, 1H), 7.84 (dd, *J* = 5.5, 3.1 Hz, 2H), 7.71 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 4.99 (q, *J* = 7.4 Hz, 1H), 1.67 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 174.9, 167.5, 134.2, 131.7, 123.5, 47.4, 15.1.

mp : 144-146 °C

Spectral and analytical data are in agreement with those previously reported.²⁹²

(R)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanoyl chloride 4²⁹³



Aspect: orange oil

Chemical Formula: C₁₁H₈ClNO₃

Molecular Weight: 237.64

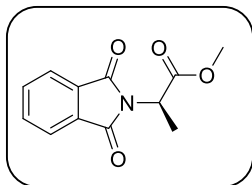
Yield: 100%

To *N*-phthaloyl-D-alanine **3** (1.02 g, 4.66 mmol) in 30 mL of toluene, were added some drops of dimethylformamide and oxalyl chloride (0.89 g, 7 mmol). The mixture was allowed to stir 2 h at 90 °C. the solvent was removed under reduce pressure to afford *N*-phthaloyl-D-alanine chloride **4** (1.19 g, 5.04 mmol) as an orange oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.92 (dd, *J* = 5.5, 3.1 Hz, 2H), 7.79 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 5.16 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.78 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).

Only the ¹H NMR spectrum was determined, just to ensure the difference between the carboxylic acid and the acyl chloride derivative.

Methyl (*R*)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanoate **6**



Aspect: Colourless oil

Chemical Formula: C₁₂H₁₁NO₄

Molecular Weight: 233.22

Yield: 60%

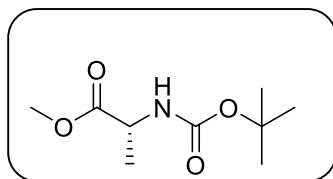
To *N*-phthaloyl-D-alanine **3** (1.00 g, 4.56 mmol) in 30 mL of methanol, oxalyl chloride (2 equiv.) was dropwise added at 0 °C. The mixture was allowed to stir overnight. The solvent was removed under reduce pressure. After purification on silica gel column, methyl (*R*)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanoate **6** was obtained as a colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.82 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H), 7.71 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 4.94 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 1.66 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 170.0, 167.2, 134.1, 131.7, 123.3, 52.6, 47.2, 15.1.

Spectral data are in agreement with those previously reported.²⁹⁴

Methyl (*tert*-butoxycarbonyl)-*D*-alaninate 9²⁹⁵



Aspect: colourless oil

Chemical Formula: C₉H₁₇NO₄

Molecular Weight: 203.24

Yield: 80%

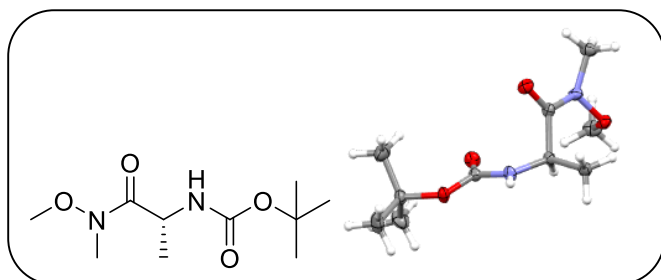
To a solution of Boc-*D*-alanine (5.00 g, 26.00 mmol) in DMF (40 mL), K₂CO₃ (7.33 g, 53.00 mmol) and methyl iodide (6.85 mL, 1.10 mmol) were added. The solution was stirred for 16 h and diluted with EtOAc (20 mL). The organic layer was washed with water (30 mL) and brine (30 mL), dried over MgSO₄ and evaporated in *vacuum*. The residue was purified on silica gel column (CH to CH/EtOAc (9/1)) to afford 9 (4.2 g, 20.67 mmol) as a colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.19 (p, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 1.32 (s, 9H), 1.26 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 173.8, 155.1, 79.6, 52.1, 49.1, 28.2, 18.4.

Spectral data are in agreement with those previously reported.²⁹⁵

***Tert*-butyl (*R*)-(1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate 15**



Aspect: White solid

Chemical Formula: C₁₀H₂₀N₂O₄

Molecular Weight: 232.28

Yield: 80%

N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride (1.03 g, 10.60 mmol) and *N*-methylnmorpholine (2.33 mL, 10.60 mmol) were added to Boc-D-Alanine (2.00 g, 10.60 mmol) in DCM (20 mL) at -10 °C. Then 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDCI) (1.86 mL, 10.60 mmol) was added. After stirring at the same temperature during 2 h, the reaction was allowed to stir at room temperature overnight. Then, the reaction was quenched with cooled HCl 1M (10 mL), extracted with DCM (3X10 mL). The combined organic phases were washed with saturated NaHCO₃ and dried over MgSO₄. After filtration, evaporation of the solvent under reduced pressure and purification on silica gel column (DCM 100%) 15 was obtained (2.00g, 8.61 mmol) as white solid.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.56 (p, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 1.32 (s, 9H), 1.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H).

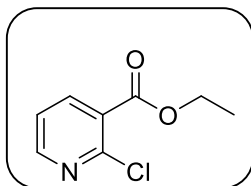
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 173.6, 155.1, 79.3, 61.5, 46.4, 32.0, 28.3, 18.5.

RX (ORTEP) Crystal size: 0.42X0.41X0.18mm, Crystal system monoclinic, space group, P21, a = 9.9190 (6) Å, b = 6.1006 (3) Å, c = 10.8625 (6) Å, β = 105.964 (2)°, V = 613.96 (6) Å³, Z = 4, calculated density = 1.221 g/cm³, μ = 0.094 mm⁻¹, R_{int} = 0.044, R[F₂>2σ(F₂)] = 0.035, wR(F₂) = 0.079, S = 1.06, Flack parameter 0.2 (4) determine using 1295 quotients.

mp: 153-155 °C

Spectral and analytical data are in agreement with literature.²⁹⁶

Ethyl 2-chloronicotinate 2



Aspect: colourless oil

Chemical Formula: C₈H₈ClNO₂

Molecular Weight: 185.61

Yield: 84%

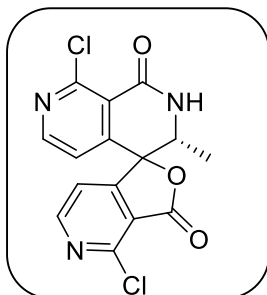
To 2-chloronicotinic acid (5.00 g, 32.00 mmol) in 100 mL of EtOH, thionyl chloride (4.64 mL, 64.00 mmol) was added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred overnight at room temperature. EtOH was evaporated, the residue was purified by silica gel column (CH to CH/EtOAc (9/1)) to afford 2 (5.00 g, 27.00 mmol) as a colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.50 (dd, *J* = 4.8, 2.0 Hz, 1H), 8.14 (dd, *J* = 7.7, 2.0 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 4.41 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 164.2, 151.6, 149.6, 140.0, 126.9, 122.1, 61.9, 13.9.

Spectral data are in agreement with those previously reported.²⁹⁷

(3'R)-4,8'-dichloro-3'-methyl-2',3'-dihydro-1'H,3H-spiro[furo[3,4-c]pyridine-1,4'-[2,7]naphthyridine]-1',3-dione 14



Aspect: White solid

Chemical Formula: C₁₅H₉Cl₂N₃O₃

Molecular Weight: 350.16

Yield: 17%

According to **TP1** the metalation of ethyl 2-chloronicotinate **2** (0.50 g, 2.69 mmol in 10 mL THF) was achieved. The methyl ester **9** of *N*-Boc-D-alanine (0.68 g, 3.36 mmol) pre-deprotected according to **TP2**, was added dropwise. An 1 M aqueous HCl solution (17 ml) was added, then the solution was extracted with EtOAc (3X20 mL). After three days **14** (0.08 g, 2.28 mmol) was obtained as a white solid by slow crystallization from EtOAc.

IR (KBr): ν 3228 (NH), 3211, 3090, 1792 (C=O), 1683 (C=O), 1580, 1406, 1036, 965, 722.

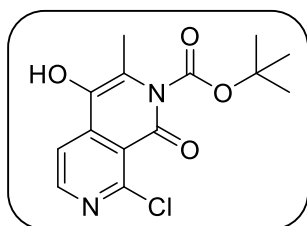
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.84 (s, 1H, NH), 8.74 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, Ar-H), 8.53 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.45 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.43 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, Ar-H), 4.48 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.3, 160.6, 157.3, 155.0, 152.5, 149.9, 149.2, 148.6, 121.0, 119.0, 118.6, 117.7, 83.4, 51.3, 13.1.

mp: 280-281 °C

HRMS/ESI calcd for C₁₅H₁₀N₃O₃Cl₂ [M + H]⁺ = 350.0099, found 350.0099.

Tert-butyl 8-chloro-4-hydroxy-3-methyl-1-oxo-2,7-naphthyridine-2(1H)-carboxylate 18



Aspect: Yellow powder

Chemical Formula: C₁₄H₁₅ClN₂O₄

Molecular Weight: 310.73

Yield: 10%

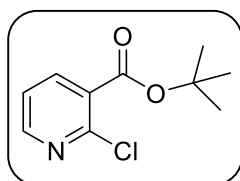
The metalation of ethyl 2-chloronicotinate 2 (0.50 g, 2.69 mmol) was achieved according to **TP1**. The Weinreb amid 15 of *N*-Boc-D-alanine (0.78 g, 3.36 mmol) pre-depronated according to **TP2**, was added dropwise. An 1 M aqueous HCl solution (17 mL) was added, then the solution was extracted with EtOAc (3X20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and evaporated in *vacuum*. The residue was purified by silica gel column (DCM to DCM/EtOAc (8/2)) and 18 (0.02 g, 0.06 mmol) was obtained as a yellow powder.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.43 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.69 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, Ar-H), 2.38 (s, 3H, CH₃), 1.64 (s, 9H, *t*-Bu). Signal due to the OH is missing.

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.2, 152.6, 150.2, 149.6, 143.8, 129.9, 129.3, 116.5, 114.6, 87.7, 27.6, 27.1.

HRMS/ESI in progress

Tert-butyl 2-chloronicotinate 21²⁵⁹



Aspect: colourless oil

Chemical Formula: C₁₀H₁₂ClNO₂

Molecular Weight: 213.66

Yield: 97.5 %

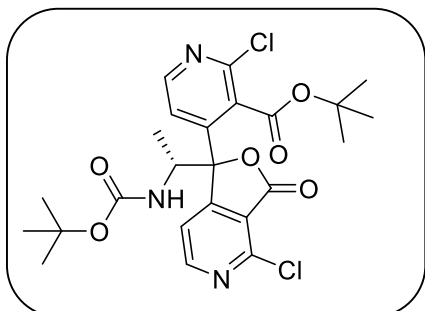
In a round bottom flask at 0°C under nitrogen were introduced 2-Chloronicotinic acid (12.83 g, 81.00 mmol), THF (200 mL), some drops of DMF and oxalyl chloride (14 mL, 16.30 mmol). After stirring the reaction for 2 h at room temperature, the solvent was evaporated to afford a yellow oil. 200 mL of THF were added and the mixture was cooled at -10°C. t-BuOK (11.00 g, 98.00 mmol) was introduced portionwise and the reaction was stirred at room temperature for 2 h. After evaporation under reduce pressure, 200 mL of saturated Na₂CO₃ were added and the solution was then extracted with EtOAc (3X200 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and evaporated. The residue was purified by silica gel column (CH to CH/EtOAc (8/2)) to afford *tert*-butyl 2-chloronicotinate 21 as a colourless oil (12.19 g, 57.05 mmol).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.30 (dd, *J* = 4.8, 2.0 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 7.7, 2.0 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.6, 151.0, 149.1, 139.6, 128.6, 122.0, 83.0, 27.8.

Spectral data are in agreement with those previously reported.²⁵⁹

***Tert*-butyl 4-(1-((*R*)-1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-4-chloro-3-oxo-1,3-dihydrofuro[3,4-*c*]pyridin-1-yl)-2-chloronicotinate 35**



Aspect: White solid

Chemical Formula: C₂₄H₂₇Cl₂N₃O₆

Molecular Weight: 524.40

Yield: 17%

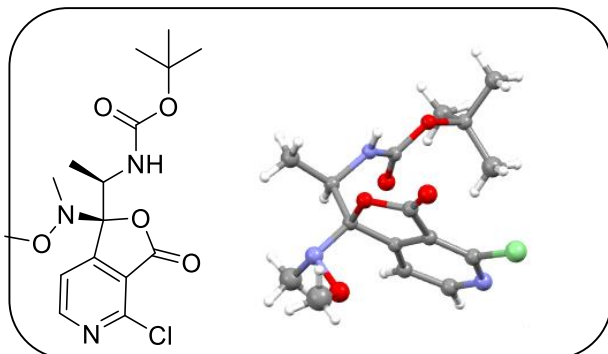
According to **TP3** the metalation of *tert*-butyl 2-chloronicotinate 21 (0.50 g, 2.34 mmol) was achieved. The methyl ester 9 of *N*-Boc-D-alanine (0.95 g, 4.68 mmol) pre-deprotonated according to **TP2**, was added dropwise. An 1 M aqueous HCl solution (23 mL) was added, then the solution was extracted with EtOAc (3X20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and evaporated in *vacuum*. The residue was purified by silica gel column (CH to CH/EtOAc (5/4)) and 35 (0.106 g, 0.20 mmol) was obtained as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.54 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, Ar-H(monocycle)), 8.48 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, Ar-H (bicycle)), 7.74 (*S*_{large band}, 1H, Ar-H(monocycle)), 7.56 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, Ar-H (bicycle)), 4.83 (dq, *J* = 8.9, 6.9 Hz, 1H, CH), 4.56 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH), 1.69 (s, 9H, *t*-Bu), 1.25 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 1.17 (s, 9H, *t*-Bu (NHBoc)).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 164.1, 164.0, 160.4, 154.6, 153.2, 150.4, 149.5, 149.4, 144.8, 128.6, 119.2, 118.5, 118.0, 89.6, 85.4, 80.6, 52.9, 28.1, 27.8, 16.6.

HRMS/ESI in progress

Tert*-butyl((*R*)-1-((*R*)-4-chloro-1-(methoxy(methyl)amino)-3-oxo-1,3-dihydrofuro[3,4-*c*]pyridin-1-yl)ethyl)carbamate **22*



Aspect: White solid

Chemical Formula: C₁₆H₂₂ClN₃O₅

Molecular Weight: 371.82

Yield: 54%

According to **TP3** the metalation of *tert*-butyl 2-chloronicotinate **21** (0.50 g, 2.34 mmol in 10 mL of dry THF) was achieved. The Weinreb amid **15** of *N*-Boc-D-alanine (1.09 g, 4.68 mmol) pre-deprotonated according to **TP2**, was added dropwise. An 1 M aqueous HCl solution (17 mL) was added, then the solution was extracted with EtOAc (3X20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and evaporated in *vacuum*. The residue was purified by silica gel column (DCM to DMC/EtOAc (8/2)) and **22** (0.47 g, 1.26 mmol) was obtained as a white solid.

IR (KBr): ν 3370 (NH), 3097, 2990, 2940, 1790 (C=O), 1779 (C=O), 1597, 1519, 1409, 1250, 1165, 969.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.58 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.58 (dq, *J* = 9.6, 6.8 Hz, 1H, CH), 4.46 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NH), 3.48 (s, 3H, NOME), 2.59 (s, 3H, NMe), 1.27 (d, *J* = 2.0 Hz, 12H, CH₃+*t*-Bu).

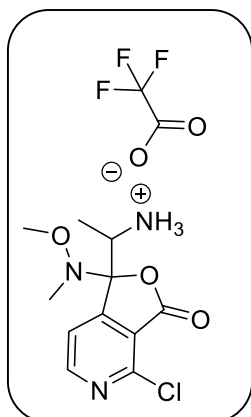
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 164.6, 157.7, 154.7, 153.0, 149.1, 121.7, 118.7, 102.7, 80.4, 60.9, 48.4, 37.3, 28.2, 16.2.

RX (ORTEP) Crystal size: 0.53x0.37x0.12mm. Formula 2(C₁₆H₂₂ClN₃O₅),H₂O, molecular weight 761.65, Crystal system monoclinic, space group, P21, a = 9.5070 (6) Å, b = 16.8513 (12) Å, c = 12.1905 (8) Å, β = 95.581(3)°, V = 1943.7 (2) Å³, Z = 4, calculated density = 1.301 g/cm³, μ = 0.229 mm⁻¹, Rint = 0.030, R[F₂>2 σ (F₂)] = 0.033, wR(F₂) = 0.083, S = 1.03. Flack parameter -0.036 (10) determine using 4706 quotients (Parsons, Flack and Wagner, Acta Cryst B69 (2013), 249-259).

mp : 115-117 °C

HRMS/ESI calcd for C₁₆H₂₃N₃O₅Cl [M + H]⁺ = 372.1326, found 372.1328.

1-(4-chloro-1-(methoxy(methyl)amino)-3-oxo-1,3-dihydrofuro[3,4-c]pyridin-1-yl)ethan-1-aminium trifluoroacetate 23



Aspect: brown oil

Chemical Formula: C₁₃H₁₅ClF₃N₃O₄

Molecular Weight: 385.72

Yield: 100%

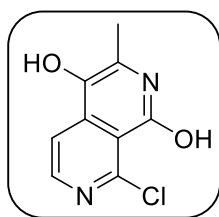
The compound 22 (0.054 g, 0.15 mmol) was deprotected in a mixture of DCM/TFA (2 v/1 v) in 30 min at room temperature. The completion deprotection was checked by LCMS. After evaporation 23 (0.06 g, 0.15 mmol) was obtained as brown oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.19 (s, 3H, NH₃⁺), 8.82 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.59 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, Ar-H), 3.90 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH), 3.70 (s, 3H, NOME), 2.46 (s, 3H, NMe), 1.61 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.68, 160.95 (q, *J* = 41.2 Hz, CO_{TFA}), 156.38, 155.18, 151.40, 120.55, 120.12 – 115.84 (m CF₃), 113.83, 100.56, 60.28, 54.14, 35.68, 13.74.

HRMS/ESI : in progress.

8-chloro-3-methyl-2,7-naphthyridine-1,4-diol 24



Aspect: red oil

Chemical Formula: C₉H₇ClN₂O₂

Molecular Weight: 210.62

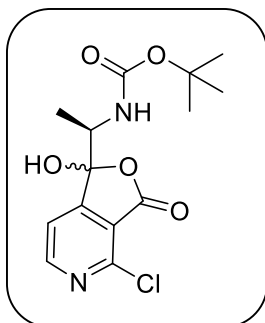
Yield: 20%

The basic treatment of **23** (0.1 g, 0.26 mmol) was carried out with saturated K₂CO₃, the solution was neutralized to pH=6, then extracted with EtOAc. The organic phase was dried over MgSO₄ and evaporated in *vacuum* to afford **24** (0.01 g, 0.06 mmol) as red oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.75 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H). Signals due to the OH are missing

HRMS/ESI : in progress.

Tert-butyl((1R)-1-(4-chloro-1-hydroxy-3-oxo-1,3-dihydrofuro[3,4-c]pyridin-1-yl)ethyl)carbamate 25



Aspect: Colourless oil

Chemical Formula: C₁₄H₁₇ClN₂O₅

Molecular Weight: 328.75

Yield: 24%

The basic treatment of 22 (0.2 g, 5.38 mmol) was carried out with NaOH 5M (1,6 mL) in 1.6 mL of MeOH and stir for 15 min. The acid formation was monitored by LCMS. Then the mixture was acidified to pH 2 with HCl 1M and extracted with EtOAc three times. The combined organic phases were dried over MgSO₄. After filtration, evaporation of the solvent under reduced pressure and purification on silica gel column (CH/EtOAc (8/2) to Acetone) the lactol 25 was obtained as colourless oil.

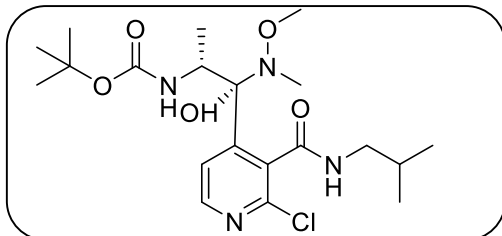
IR (KBr): ν 3321 (OH), 2980 (NH), 2931, 2847, 1714 (C=O), 1600 (C=O), 1428, 1368, 1164, 1052, 758.

¹H NMR (400 MHz, Acetonitrile-d₃) δ 8.65 (d, J = 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.64 (d, J = 5.1 Hz, 1H, Ar-H), 5.40 (s, 1H, NH), 4.26 (dq, J = 9.1, 6.9 Hz, 1H, CH), 1.29 (s, 9H, *t*-Bu), 1.25 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃). Signal due to the OH is missing.

¹³C NMR (101 MHz, Acetonitrile-d₃) δ 165.1, 160.4, 156.7, 156.6, 155.2, 149.0, 122.1, 119.6, 80.4, 52.6, 28.5, 15.5.

HRMS/ESI : in progress.

Tert-butyl((1*R*,2*R*)-1-(2-chloro-3-(isobutylcarbamoyl)pyridin-4-yl)-1-hydroxy-1-(methoxy(methyl)amino)propan-2-yl)carbamate 26



Aspect: Pink oil

Chemical Formula: C₂₀H₃₃ClN₄O₅

Molecular Weight: 444.96

Yield: 40%

According to **TP4**, nucleophile addition of isobutylamine was achieved with **22** (0.63 g, 1.7 mmol) and isobutylamine (0.34 mL, 3.4 mmol) as starting materials. The amide **26** was obtained after purification by silica gel column (CH to CH/EtOAc (8/2)) as a pink oil.

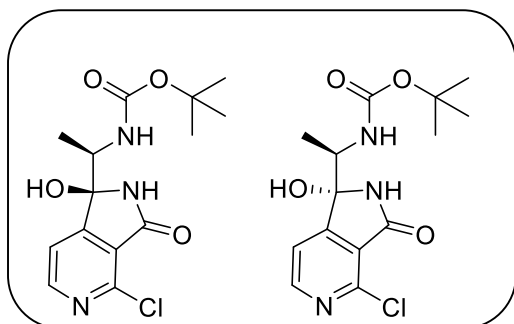
IR (KBr): ν 2298 (OH), 2962 (NH), 2934 (NH), 2874, 1747 (C=O), 1713 (C=O), 1622, 1526, 1367, 1167, 901.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.29 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.64 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.54 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH*i*-Bu), 4.65 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NHBoc), 4.45-4.60 (m, 1H, OH), 3.45 (s, 3H, NOME), 3.42 – 3.30 (m, 3H, CH₂ *i*-Bu, and OH), 2.62 (s, 3H, NMe), 1.94 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH *i*-Bu), 1.39 (s, 9H, *t*-Bu), 1.08 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 0.99 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, CH₃ *i*-Bu).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 169.9, 156.5, 156.5, 155.0, 154.6, 106.4, 104.9, 104.4, 80.1, 60.6, 48.9, 48.2, 36.8, 28.5, 28.4, 20.4, 16.5.

HRMS/ESI : in progress.

Tert-butyl(1-(7-chloro-3-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)ethyl)carbamate 29



Aspect: Colourless oil

Chemical Formula: C₁₄H₁₈ClN₃O₄

Molecular Weight : 327.77

Yield: 64%

According to **TP4**, nucleophile addition of ammoniac hydroxide was done with **22** (0.1 g, 2.82 mmol) and aqueous ammonia (0.04 mL, 5.65 mmol) as starting materials. The lactame **29** was obtained after purification by silica gel column (CH to CH/EtOAc (9/1)) as a colourless oil. The NMR spectra revealed two diastereoisomers (2:1) because of the two asymmetric centers.

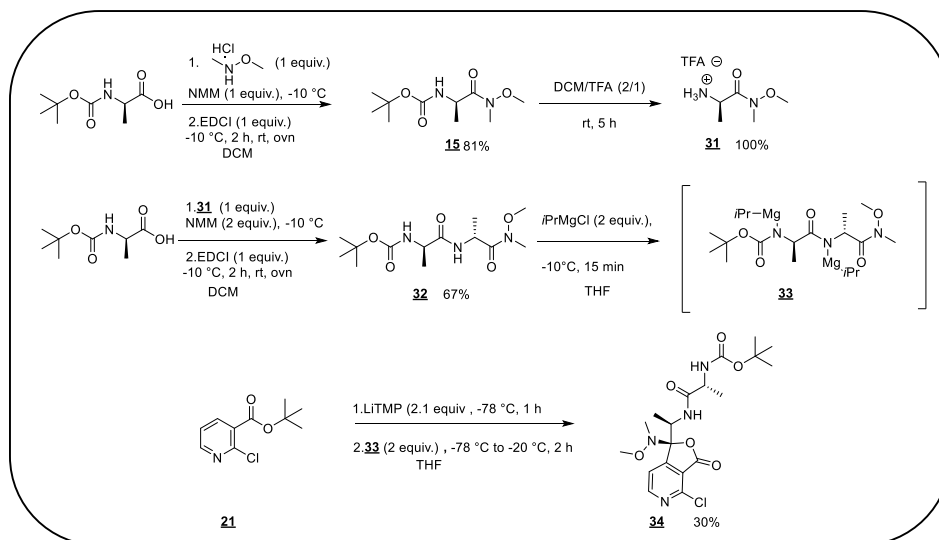
IR (KBr): ν 3347 (OH), 2981 (NH), 2855, 1779 (C=O), 1685 (C=O), 1600, 1529, 1163, 1080, 913.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.06 (s, 2H, NH cyclic), 8.92 (s, 1H, NH cyclic), 8.58 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.50 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.60 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, Ar-H), 6.85 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, NHBoc), 6.73 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NHBoc), 6.70 (s, 1H, OH), 6.67 (s, 2H, OH), 4.22 – 4.11 (m, 2H, CH), 3.96 – 3.84 (m, 1H, CH), 1.36 (s, 9H, t-Bu), 1.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH₃), 1.09 (s, 18H, t-Bu), 1.02 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.1, 164.3, 160.9, 160.0, 155.2, 154.6, 152.7, 151.8, 145.4, 144.4, 124.4, 124.2, 118.7, 118.5, 88.6, 87.3, 78.0, 77.5, 51.7, 49.7, 28.2, 27.9, 15.9, 15.0.

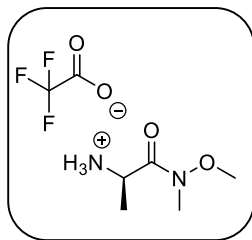
HRMS/ESI calcd for C₁₄H₁₉N₃O₄Cl [M + H]⁺ = 328.1064, found 328.1062.

Synthesis of a pyridine derivative substituted in position 4 by protected D-Alanine-D-Alanine



Schema 4 : Synthesis of lactone heterocycle carrying a D-Ala-D-Ala sequence

(R)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxopropan-2-aminium 2,2,2-trifluoroacetate 31



Aspect: White crystals

Chemical Formula: C₇H₁₃F₃N₂O₄

Molecular Weight: 246.19

Yield: 100%

In a round bottom flask the *tert*-butyl (R)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate **15** (4.43 g, 23.00 mmol) was introduced and 63 mL of DCM and 21 mL of TFA were added. The completion of the reaction was checked by TLC. The solvents were removed in *vacuum* and the residue was washed with toluene (3X20 ml). The product was then crystallized in cyclohexane to afford **31** as white crystals.

IR (KBr): ν 3252 (NH), 3081, 3002, 2950, 1723 (C=O), 1646 (C=O), 1213, 732 (CF), 719, 689

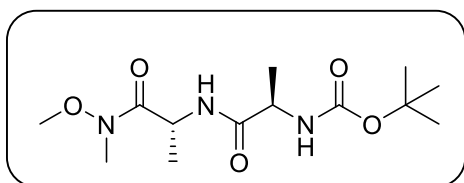
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.41 (s, 3H, NH₃⁺), 4.92 (p, J = 7.0 Hz, 1H, CH), 3.76 (s, 3H, NOME), 3.23 (s, 3H, NMe), 1.42 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 171.4, 156.5 (q, J = 37.5 Hz, CO_{TFA}), 115.8 (q, J = 287.5 Hz, CF₃), 61.9, 46.6, 32.3, 18.1.

mp : 91-92 °C

HRMS/ESI : in progress.

Tert-butyl((R)-1-(((R)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate 32



Aspect: Translucent gum

Chemical Formula: C₁₃H₂₅N₃O₅

Molecular Weight: 303.36

Yield: 82%

31 (9.84 g, 40 mmol) and *N*-methylmorpholine (13.2 mL, 120 mmol) were added to Boc-D-Alanine (7.57 g, 40 mmol) in DCM (200 mL) at -10 °C. Then 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDCI) (7.02 mL, 40 mmol) was added. After stirring at the same temperature for 2 h, the reaction was allowed to stir at room temperature overnight. Then, the solvent was removed in *vacuum*. Then, a cooled aqueous 1 M HCl (150 mL) was added on the residue, this solution was extracted with EtOAc (3X150 mL). The combined organic phases were washed with saturated NaHCO₃, brine and dried over MgSO₄. After filtration, evaporation of the solvent under reduced pressure and purification on silica gel column (CH/EtOAc (8/2) to CH/EtOAc (5/5)) **32** was obtained (10 g, 32.96 mmol) as a translucent gum.

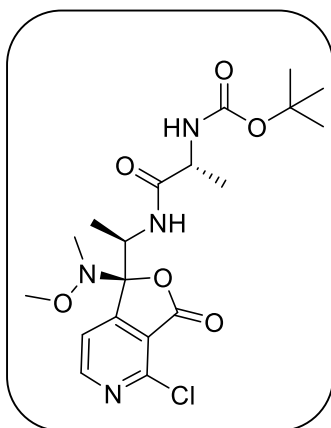
IR (KBr): ν 3600 (NH), 3318 (NH), 2980, 2934, 1700 (C=O), 1654 (C=O), 1529 (C=O), 1357, 1249, 1171.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.95 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 6.88 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 4.74 – 4.64 (m, 1H, CH), 4.04 – 3.92 (m, 1H, CH), 3.72 (s, 3H, NOME), 3.10 (s, 3H, NMe), 1.37 (s, 9H, *t*-Bu), 1.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.6, 172.4, 155.0, 78.0, 61.2, 49.3, 44.5, 31.8, 28.2, 18.2, 17.2.

HRMS/ESI calcd for C₁₃H₂₅N₃O₅Na [M + Na]⁺ = 326.1692, found 326.1695.

Tert*-butyl((*R*)-1-(((*R*)-1-((*R*)-4-chloro-1-(methoxy(methyl)amino)-3-oxo-1,3-dihydrofuro[3,4-*c*]pyridin-1-yl)ethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate **34*



Aspect: White solid

Chemical Formula: C₁₉H₂₇ClN₄O₆

Molecular Weight: 442.90

Yield: 30%

According to **TP3** the metalation of *tert*-butyl 2-chloronicotinate **21** (0.50 g, 2.34 mmol) was achieved. The Weinreb amid **32** of D-alanine-D-Alanine (1.42g, 4.68mmol) pre-depronated according to **TP2**, was added dropwise. An 1 M aqueous HCl solution (17 ml) was added, then the solution was extracted with EtOAc (3X20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and evaporated in *vacuum*. The residue was purified by silica gel column (CH/EtOAc (8/2) to CH/EtOAc (5/5)) and **34** (0.36 g, 1.26 mmol) was obtained as a white solid.

IR (KBr): ν 3312 (NH), 2080, 2040, 1784 (C=O), 1684 (C=O), 1643 (C=O), 1529, 1249, 1169, 1042, 970.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.60 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.61 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.76 – 6.60 (m, 1H, NH), 4.97 – 4.78 (m, 2H, NH+CH), 4.01 – 3.87 (m, 1H, CH), 3.42 (s, 3H, NOME), 2.64 (s, 3H, NMe), 1.40 (s, 9H, *t*-Bu), 1.20 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 1.04 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 172.2, 164.6, 157.6, 155.8, 153.3, 149.3, 121.7, 118.1, 102.6, 80.6, 60.8, 50.0, 46.6, 37.2, 28.4, 17.6, 15.9.

mp : 137-139.00 °C

HRMS/ESI : in progress.

Bibliographie

- (1) Ginsberg, J. Selman Waksman and Antibiotics. *Am. Chem. Soc. Natl. Hist. Chem. Landmarks* **2005**.
- (2) Arseculeratne, S. N.; Arseculeratne, G. A Re-Appraisal of the Conventional History of Antibiosis and Penicillin. *Mycoses* **2017**, *60* (5), 343–347.
<https://doi.org/10.1111/myc.12599>.
- (3) Julien, P. Pour Le Cinquantenaire de La Pénicilline : La Thèse de Duchesne Rééditée : Jean Théodoridès (Ed), La Thèse Prophétique d'Ernest Duchesne (1897) Sur l'antagonisme Entre Les Moisissures et Les Microbes. *Rev. Hist. Pharm. (Paris)*. **1992**, *80* (293), 234–234.
- (4) Rossignol, P. L'aventure Des Sulfamides : Daniel Bovet, Une Chimie Qui Guérit. Histoire de La Découverte Des Sulfamides. *Rev. Hist. Pharm. (Paris)*. **1990**, No. 285, 227–228.
- (5) Davies, J.; Ryan, K. S. Introducing the Parvome: Bioactive Compounds in the Microbial World. *Am. Chem. Soc.* **2011**, *7*, 252–259. <https://doi.org/10.1021/cb200337h>.
- (6) Calabrese, E. J.; Blain, R. The Occurrence of Hormetic Dose Responses in the Toxicological Literature, the Hormesis Database: An Overview. *Toxicology and Applied Pharmacology*. February 1, **2005**, pp 289–301.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.023>.
- (7) Sengupta, S.; Chattopadhyay, M. K.; Grossart, H. The Multifaceted Roles of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Nature. **2013**, *4* (March), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>.
- (8) Thomashow, L. S.; Weller, D. M. *Role of a Phenazine Antibiotic from Pseudomonas Fluorescens in Biological Control of Gaeumannomyces Graminis Var. Tritici*; 1988; Vol. 170.
- (9) Thomashow, L. S.; Weller, D. M.; Bonsall, R. F.; Iii, L. S. P. *Production of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid by Fluorescent Pseudomonas Species in the Rhizosphere of Wheat*; 1990; Vol. 56.

- (10) Neeno-Eckwall, E. C.; Kinkel, L. L.; Schottel, J. L. Competition and Antibiosis in the Biological Control of Potato Scab. *Can. J. Microbiol.* **2001**, *47* (4), 332–340. <https://doi.org/10.1139/w01-010>.
- (11) Davies, J. Are Antibiotics Naturally Antibiotics? *Soc. Ind. Microbiol.* **2006**. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0112-5>.
- (12) McPhee, J. B.; Hancock, R. E. W. Function and Therapeutic Potential of Host Defense Peptides. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11* (11), 677–687. <https://doi.org/10.1002/psc.704>.
- (13) Yim, G.; De La Cruz, F.; Spiegelman, G. B.; Davies, J. Transcription Modulation of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Promoters by Sub-MIC Levels of Rifampin. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (22), 7988–7991. <https://doi.org/10.1128/JB.00791-06>.
- (14) Gerber, M.; Walch, C.; Lö, B.; Tischendorf, K.; Reischl, U.; Ackermann, G. Effect of Sub-MIC Concentrations of Metronidazole, Vancomycin, Clindamycin and Linezolid on Toxin Gene Transcription and Production in Clostridium Difficile. *Jounal Med. Microbiol.* **2008**, 776–783. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47739-0>.
- (15) Hoffman, L. R.; D’argenio, D. A.; Maccoss, M. J.; Zhang, Z.; Jones, R. A.; Miller, S. I. Aminoglycoside Antibiotics Induce Bacterial Biofilm Formation. *Nature* **2005**, *436*, 1171–1175. <https://doi.org/10.1038/nature03912>.
- (16) Rajeev, L. Antibiotic Discovery. *Mater. Methods* **2018**, *8*. <https://doi.org/10.13070/mm.en.8.2671>.
- (17) Bérdy, J. Thoughts and Facts about Antibiotics: Where We Are Now and Where We Are Heading. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2012**, *65*, 385–395. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>.
- (18) Reygaert, W. C. An Overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4* (3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>.
- (19) Mayer, C.; Kluj, R. M.; Mühleck, M.; Walter, A.; Unsleber, S.; Hottmann, I.; Borisova, M. International Journal of Medical Microbiology Bacteria ’ s Different Ways to Recycle Their Own Cell Wall. *Int. J. Med. Microbiol.* **2019**, No. April, 151326. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.06.006>.

- (20) Patrick, G. L.; Spencer, J. *An Introduction to Medicinal Chemistry*; Oxford University Press, 2009.
- (21) Lukaszczyk, M.; Pradhan, B.; Remaut, H. *Bacterial Cell Walls and Membranes*; 2019; Vol. 92, pp 369–413. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2>.
- (22) Nauciel, C.; Vildé, J.-L. *Bactériologie Médicale*; Masson, 2005.
- (23) Vaubourdolle, M.; Porquet, D. *Infectiologie / collection dirigée par Michel Vaubourdolle*; Vaubourdolle Dominique, M. ; P., Ed.; Wolters Kluwer. Rueil-Malmaison CN - Internat Pharmacie ; Internat Pharmacie, 2013; Vol. tome 33.
- (24) Bourgeois-Nicolaos, N.; Doucet-Populaire, F. Oxazolidinones. *Elsevier Masson* **2010**, 13, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S1166-8598\(10\)53772-4](https://doi.org/10.1016/S1166-8598(10)53772-4).
- (25) Revuelta, J. L.; Serrano-Amatriain, C.; Ledesma-Amaro, R.; Jiménez, A. Formation of Folates by Microorganisms: Towards the Biotechnological Production of This Vitamin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag October 1, 2018, pp 8613–8620. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9266-0>.
- (26) Hooper, D. C.; Jacoby, G. A. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Lab. Press* **2016**. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>.
- (27) Bardell, D. *The Roles of the Sense of Taste and Clean Teeth in the Discovery of Bacteria by Antoni van Leeuwenhoek*; 1982; Vol. 47.
- (28) Berche, P. Louis Pasteur, from Crystals of Life to Vaccination. *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd 2012, pp 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03945.x>.
- (29) Schwartz, M.; Perrot, A. *PASTEUR ET KOCH, Un Duel de Géants Dans Le Monde Des Microbes-Maxime Schwartz et Annick Perrot*; 2015.
- (30) Lee Ventola, C. *The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats*; 2015; Vol. 40.
- (31) O'NEILL, J. *TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE CHAIRED BY JIM*

O'NEILL; 2016.

- (32) Caniça, M.; Manageiro, V.; Abriouel, H.; Moran-Gilad, J.; Franz, C. M. A. P. Antibiotic Resistance in Foodborne Bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *84*, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.001>.
- (33) Roger, F.; Ducrot, C. Antibiotiques En Agriculture : Réduire Leur Usage Tout En Limitant Les Risques Sanitaires et Socioéconomiques Au Sud. *perspective* **2017**, *4*, 1–4.
- (34) Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **2016**, *14* (8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.
- (35) Spellberg, B.; Gilbert, D. N. The Future of Antibiotics and Resistance: A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett. **2014**. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu392>.
- (36) Centers for Disease Control and Prevention, O. of I. D. *ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States*; 2013.
- (37) Das, B.; Chaudhuri, S.; Srivastava, R.; Nair, G. B. AntiMicroBiAl ReSiStAnce in South EAST AsiA. *BMJ* **2017**. <https://doi.org/10.1136/bmj.j3535>.
- (38) Mercurio, N. J.; Davis, S. L.; Zervos, M. J.; Herc, E. S. Combatting Resistant Enterococcal Infections: A Pharmacotherapy Review. *Expert Opin. Pharmacother.* **2018**, *19* (9), 979–992. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1479397>.
- (39) Hutchings, M.; Truman, A.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Current Opinion in Microbiology*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- (40) Perry, J. A.; Westman, E. L.; Wright, G. D. The Antibiotic Resistome: What's New? *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd October 1, 2014, pp 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.002>.
- (41) D'costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; et al. Antibiotic Resistance Is Ancient. *Nature* **2011**, *477*. <https://doi.org/10.1038/nature10388>.
- (42) Koskiniemi, S.; Pránting, M.; Gullberg, E.; Näsval, J.; Andersson, D. I. Activation of Cryptic Aminoglycoside Resistance in Salmonella Enterica. *Mol. Microbiol.* **2011**, *80*

- (6), 1464–1478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07657.x>.
- (43) Kumar, A.; Schweizer, H. P. Bacterial Resistance to Antibiotics: Active Efflux and Reduced Uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. July 29, 2005, pp 1486–1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>.
- (44) Goldstein, F. W.; Gutmann, L.; Williamson, R.; Collatz, E.; Acar, J. F. In Vivo and in Vitro Emergence of Simultaneous Resistance to Both Beta-Lactam and Aminoglycoside Antibiotics in a Strain of *Serratia Marcescens*. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 134A (3), 329–337.
- (45) Beceiro, A.; Tomás, M.; Bou, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: A Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **2013**. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>.
- (46) Huovinen, P.; Sundström, L.; Sundström, S.; Go, G.; Swedberg, G.; Skold, O.; Skold, S. *MINIREVIEW Trimethoprim and Sulfonamide Resistance*; 1995; Vol. 39.
- (47) Bush, K.; Jacoby, G. A. Updated Functional Classification Of-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
- (48) Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, 13 (1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- (49) WHO *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*; 2001.
- (50) OMS. *PLAN D' ACTION MONDIAL POUR COMBATTRE LA RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS*; 2016.
- (51) WHO. *ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance*; 2014.
- (52) Anderson, M.; Clift, C.; Schulze, K.; Sagan, A. *What Are the Avenues for Policy Action for Countries in Europe?*; 2019.
- (53) Maragakis, L. L.; Perencevich, E. N.; Cosgrove, S. E. Clinical and Economic Burden of Antimicrobial Resistance. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2008**, 6 (5), 751–763. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.751>.

- (54) WHO GUIDELINES ON USE OF MEDICALLY IMPORTANT ANTIMICROBIALS IN FOOD-PRODUCING ANIMALS; 2017.
- (55) Monnoyer-smith, P. L. Consommation d'antibiotiques et Résistance Aux Antibiotiques En France : Une Infection Évitée, c'est Un Antibiotique Préservé ! **2018**.
- (56) Aarestrup, F. M.; Vibeke, F.; Jacobsen, E.; Wegener, H. C. Changes in the Use of Antimicrobials and the Effects on Productivity of Swine Farms in Denmark. *Am. J. Vet. Res.* **2010**, *71* (7), 726–733.
- (57) Zhou, F.; Shefer, A.; Wenger, J.; Messonnier, M.; Yan Wang, L.; Lopez, A.; Moore, M.; Murphy, T. V; Cortese, M.; Rodewald, L. *Economic Evaluation of the Routine Childhood Immunization Program in The*; 2014; Vol. 133.
- (58) Monserrat-Martinez, A.; Gambin, Y.; Sierecki, E. Thinking Outside the Bug: Molecular Targets and Strategies to Overcome Antibiotic Resistance. **2019**.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061255>.
- (59) Theuretzbacher, U.; Piddock, L. J. V. Non-Traditional Antibacterial Therapeutic Options and Challenges. *Cell Host Microbe* **2019**, *26* (1), 61–72.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.004>.
- (60) Yu, X.-Q.; Robbie, G. J.; Wu, Y.; Esser, M. T.; Jensen, K.; Schwartz, H. I.; Bellamy, T.; Hernandez-Illas, M.; Jafri MedImmune LLC, H. S.; Research Associates, M. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MEDI4893, an Investigational, Extended-Half-Life, Anti-Staphylococcus Aureus Alpha-Toxin Human Monoclonal Antibody, in Healthy Adults. **2016**. <https://doi.org/10.1128/AAC.01020-16>.
- (61) Maura, D.; Drees, S. L.; Bandyopadhaya, A.; Kitao, T.; Negri, M.; Starkey, M.; Lesic, B.; Milot, S.; Déziel, E. D.; Zahler, R.; et al. Polypharmacology Approaches against the Pseudomonas Aeruginosa MvfR Regulon and Their Application in Blocking Virulence and Antibiotic Tolerance. **2017**. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01139>.
- (62) Keith, J. W.; Pamer, E. G. Enlisting Commensal Microbes to Resist Antibiotic-Resistant Pathogens. *J. Exp. Med* **2018**, *216* (1). <https://doi.org/10.1084/jem.20180399>.
- (63) Darkoh, C.; Plants-Paris, K.; Bishoff, D.; DuPont, H. L. Clostridium Difficile Modulates

- the Gut Microbiota by Inducing the Production of Indole, an Interkingdom Signaling and Antimicrobial Molecule . *mSystems* **2019**, 4 (2).
<https://doi.org/10.1128/msystems.00346-18>.
- (64) Cammarota, G.; Ianiro, G.; Tilg, H.; Rajilić-Stojanović, M.; Kump, P.; Satokari, R.; Sokol, H.; Arkkila, P.; Pintus, C.; Hart, A.; et al. European Consensus Conference on Faecal Microbiota Transplantation in Clinical Practice. In *Gut*; BMJ Publishing Group, 2017; Vol. 66, pp 569–580. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017>.
- (65) Rodrigues, G. R.; López-Abarrategui, C.; de la Serna Gómez, I.; Dias, S. C.; Otero-González, A. J.; Franco, O. L. Antimicrobial Magnetic Nanoparticles Based-Therapies for Controlling Infectious Diseases. *Int. J. Pharm.* **2019**, 555, 356–367.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.043>.
- (66) Dufour, N.; Debarbieux, L. Phage Therapy: A Realistic Weapon against Multidrug Resistant Bacteria. *Medecine/Sciences*. Editions EDK April 1, 2017, pp 410–416.
<https://doi.org/10.1051/medsci/20173304011>.
- (67) Niu, G.; Li, W. Next-Generation Drug Discovery to Combat Antimicrobial Resistance. *Trends Biochem. Sci.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.05.005>.
- (68) Krismer, B.; Liebeke, M.; Janek, D.; Nega, M.; Rautenberg, M.; Hornig, G.; Unger, C.; Weidenmaier, C.; Lalk, M.; Peschel, A. Nutrient Limitation Governs Staphylococcus Aureus Metabolism and Niche Adaptation in the Human Nose. *PLoS Pathog.* **2014**, 10 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003862>.
- (69) Zipperer, A.; Konnerth, M. C.; Laux, C.; Berscheid, A.; Janek, D.; Weidenmaier, C.; Burian, M.; Schilling, N. A.; Slavetinsky, C.; Marschal, M.; et al. Human Commensals Producing a Novel Antibiotic Impair Pathogen Colonization. *Nature* **2016**, 535 (7613), 511–516. <https://doi.org/10.1038/nature18634>.
- (70) Gavrish, E.; Sit, C. S.; Cao, S.; Kandror, O.; Spoering, A.; Peoples, A.; Ling, L.; Fetterman, A.; Hughes, D.; Bissell, A.; et al. Lassomycin, a Ribosomally Synthesized Cyclic Peptide, Kills Mycobacterium Tuberculosis by Targeting the ATP-Dependent Protease ClpC1P1P2. *Chem. Biol.* **2014**, 21 (4), 509–518.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.01.014>.

- (71) Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Schäberle, T. F.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; et al. A New Antibiotic Kills Pathogens without Detectable Resistance. *Nature* **2015**, *517* (7535), 455–459. <https://doi.org/10.1038/nature14098>.
- (72) Martin, S. E.; Melander, R. J.; Brackett, C. M.; Scott, A. J.; Chandler, C. E.; Nguyen, C. M.; Minrovic, B. M.; Harrill, S. E.; Ernst, R. K.; Manoil, C.; et al. Small Molecule Potentiation of Gram-Positive Selective Antibiotics against *Acinetobacter Baumannii*. **2019**. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00067>.
- (73) Binda, E.; Marinelli, F.; Marcone, G. L. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **2014**, *3* (4), 572–594. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3040572>.
- (74) Cattoir, V.; Leclercq, R. Les Entérocoques Résistants Aux Glycopeptides. *MEDECINE/SCIENCES* **2010**, *11* (26), 936–942. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611936>.
- (75) Pootoolal, J.; Neu, J.; Wright, G. D. Lycopptide Antibiotic Resistance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 381–408.
- (76) Henson, K. E. R.; Levine, M. T.; Wong, E. A. H.; Levine, D. P. Glycopeptide Antibiotics: Evolving Resistance, Pharmacology and Adverse Event Profile. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, *13* (10), 1265–1278. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1068118>.
- (77) Pfeiffer, R. R. *Structural Features of Vancomycin*; 1981; Vol. 3.
- (78) French, G. L. Enterococci and Vancomycin Resistance. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *27* (Supplement 1), S75–S83. <https://doi.org/10.1086/514910>.
- (79) Leclercq, R.; Derlot, E.; Duval, J.; Courvalin, P. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. *N. Engl. J. Med.* **1988**, *319* (3), 157–161. <https://doi.org/10.1056/NEJM198807213190307>.
- (80) Gaynes, R. P.; Culver, D. H.; Horan, T. C.; Edwards, J. R.; Richards, C.; Tolson, J. S.; System, N. N. I. S. Surgical Site Infection (SSI) Rates in the United States, 1992–1998: The National Nosocomial Infections Surveillance System Basic SSI Risk Index. *Clin.*

- Infect. Dis.* **2001**, 33 (Supplement 2), S69–S77. <https://doi.org/10.1086/321860>.
- (81) Cundliffe, E.; Demain, A. L. Avoidance of Suicide in Antibiotic-Producing Microbes. *Soc. Ind. Microbiol.* **2010**, 643–672. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0721-x>.
- (82) Marshall, C. G.; Broadhead, G.; Leskiw, B. K.; Wright, G. D. D-Ala-D-Ala Ligases from Glycopeptide Antibiotic-Producing Organisms Are Highly Homologous to the Enterococcal Vancomycin-Resistance Ligases VanA and VanB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94 (12), 6480–6483. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6480>.
- (83) Marshall, C. G.; Lessard, I. A.; Park, I.; Wright, G. D. Glycopeptide Antibiotic Resistance Genes in Glycopeptide-Producing Organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42 (9), 2215–2220.
- (84) Sosio, M.; Kloosterman, H.; Bianchi, A.; De Vreugd, P.; Dijkhuizen, L.; Donadio, S. Organization of the Teicoplanin Gene Cluster in Actinoplanes Teichomyceticus. *Microbiology* **2004**, 95–102. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26507-0>.
- (85) Li, T.-L.; Huang, F.; Haydock, S. F.; Mironenko, T.; Leadlay, P. F.; Spencer, J. B. Biosynthetic Gene Cluster of the Glycopeptide Antibiotic Teicoplanin. *Chem. Biol.* **2004**, 11 (1), 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.01.001>.
- (86) Schäberle, T. F.; Vollmer, W.; Fräsch, H. J.; Hüttel, S.; Kulik, A.; Röttgen, M.; Von Thaler, A. K.; Wohlleben, W.; Stegmann, E. Self-Resistance and Cell Wall Composition in the Glycopeptide Producer Amycolatopsis Balhimycina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55 (9), 4283–4289. <https://doi.org/10.1128/AAC.01372-10>.
- (87) Evers, S.; Sahm, D. F.; Courvalin, P. The VanB Gene of Vancomycin-Resistant Enterococcus Faecalis V583 Is Structurally Related to Genes Encoding d-Ala:D-Ala Ligases and Glycopeptide-Resistance Proteins VanA and VanC. *Gene* **1993**, 124 (1), 143–144. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90779-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90779-3).
- (88) Perichon, B.; Reynolds, P.; Courvalin, P. VanD-Type Glycopeptide-Resistant Enterococcus Faecium BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41 (9), 2016–2018.
- (89) Fines, M.; Perichon, B.; Reynolds, P.; Sahm, D. F.; Courvalin, P. VanE, a New Type of

- Acquired Glycopeptide Resistance in *Enterococcus Faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (9), 2161–2164. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.9.2161>.
- (90) Xu, X.; Lin, D.; Yan, G.; Ye, X.; Wu, S.; Guo, Y.; Zhu, D.; Hu, F.; Zhang, Y.; Wang, F.; et al. VanM, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus Faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (11), 4643–4647. <https://doi.org/10.1128/AAC.01710-09>.
- (91) Lebreton, F.; Depardieu, F.; Bourdon, N.; Fines-Guyon, M.; Berger, P.; Camiade, S.; Leclercq, R.; Courvalin, P.; Cattoir, V. D-Ala-D-Ser VanN-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus Faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (10), 4606–4612. <https://doi.org/10.1128/AAC.00714-11>.
- (92) Sassi, M.; Guérin, F.; Leseq, L.; Isnard, C.; Fines-Guyon, M.; Cattoir, V.; Giard, J. C. Genetic Characterization of a VanG-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus Faecium* Clinical Isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73* (4), 852–855. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx510>.
- (93) Walsh, C. Molecular Mechanisms That Confer Antibacterial Drug Resistance. *Nature* **2000**, *406* (6797), 775–781. <https://doi.org/10.1038/35021219>.
- (94) Mazaheri Nezhad Fard, R.; Barton, M. D.; Heuzenroeder, M. W. Bacteriophage-Mediated Transduction of Antibiotic Resistance in Enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *52* (6), 559–564. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03043.x>.
- (95) Clewell, D. B.; Weaver, K. E.; Dunny, G. M.; Coque, T. M.; Francia, M. V.; Hayes, F. *Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology*; 2014.
- (96) Lam, M. M. C.; Seemann, T.; Bulach, D. M.; Gladman, S. L.; Chen, H.; Haring, V.; Moore, R. J.; Ballard, S.; Grayson, M. L.; Johnson, P. D. R.; et al. Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus Faecium* Genome. *J. Bacteriol.* **2012**, *194* (9), 2334–2341. <https://doi.org/10.1128/JB.00259-12>.
- (97) Qin, X.; Galloway-Pěa, J. R.; Sillanpaa, J.; Roh, J. H.; Nallapareddy, S. R.; Chowdhury, S.; Bourgogne, A.; Choudhury, T.; Muzny, D. M.; Buhay, C. J.; et al. Complete Genome Sequence of *Enterococcus Faecium* Strain TX16 and Comparative Genomic Analysis of

- Enterococcus Faecium Genomes. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-135>.
- (98) Paulsen, I. T.; Banerjee, L.; Hyers, G. S. A.; Nelson, K. E.; Seshadri, R.; Read, T. D.; Fouts, D. E.; Eisen, J. A.; Gill, S. R.; Heidelberg, J. F.; et al. Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant Enterococcus Faecalis. *Science (80-.)*. **2003**, *299* (5615), 2071–2074. <https://doi.org/10.1126/science.1080613>.
- (99) Weaver, K. E. Enterococcal Genetics. *Am. Soc. Microbiol.* **2019**.
<https://doi.org/10.1128/9781555816513.ch26>.
- (100) Murugaiyah, V. Emergence of Vancomycin-Resistant Staphylococcus Aureus (VRSA). *WebmedCentral Infect. Dis.* **2012**.
- (101) Courvalin, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin. Infect. Dis. An Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2006**, *42 Suppl 1*, S25-34. <https://doi.org/10.1086/491711>.
- (102) Arthur, M.; Molinas, C.; Depardieu, F.; Courvalin, P. Characterization of Tn1546, a Tn3-Related Transposon Conferring Glycopeptide Resistance by Synthesis of Depsipeptide Peptidoglycan Precursors in Enterococcus Faecium BM4147. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (1), 117–127. <https://doi.org/10.1128/jb.175.1.117-127.1993>.
- (103) Depardieu, F.; Podglajen, I.; Leclercq, R.; Collatz, E.; Courvalin, P. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20* (1), 79–114. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-06>.
- (104) Arthur, M.; Depardieu, F.; Gerbaud, G.; Galimand, M.; Leclercq, R.; Courvalin, P. The VanS Sensor Negatively Controls VanR-Mediated Transcriptional Activation of Glycopeptide Resistance Genes of Tn1546 and Related Elements in the Absence of Induction. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (1), 97–106. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.97-106.1997>.
- (105) Reynolds, P. E.; Depardieu, F.; Dutka-Malen, S.; Arthur, M.; Courvalin, P. Glycopeptide Resistance Mediated by Enterococcal Transposon Tn1546 Requires Production of VanX for Hydrolysis of D-Alanyl-D-Alanine. *Mol. Microbiol.* **1994**, *13* (6), 1065–1070.
- (106) Arthur, M.; Molinas, C.; Courvalin, P. Sequence of the VanY Gene Required for

- Production of a Vancomycin-Inducible D,D-Carboxypeptidase in *Enterococcus Faecium* BM4147. *Gene* **1992**, *120* (1), 111–114. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90017-J](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90017-J).
- (107) Arthur, M.; Depardieu, F.; Molinas, C.; Reynolds, P.; Courvalin, P. The VanZ Gene of Tn1546 from *Enterococcus Faecium* BM4147 Confers Resistance to Teicoplanin. *Gene* **1995**, *154* (1), 87–92. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00851-I](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00851-I).
- (108) Hughes, D. Exploiting Genomics, Genetics and Chemistry to Combat Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4* (6), 432–441. <https://doi.org/10.1038/nrg1084>.
- (109) Khan, Z. A.; Siddiqui, M. F.; Park, S.; Khan, Z. A.; Siddiqui, M. F.; Park, S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics* **2019**, *9* (2), 49. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9020049>.
- (110) Trotter, A. J.; Aydin, A.; Strinden, M. J.; O’Grady, J. Recent and Emerging Technologies for the Rapid Diagnosis of Infection and Antimicrobial Resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.03.001>.
- (111) Billy, C. Détection Génotypique Des Résistances Bactériennes: De La Phénotypie à La Génotypie, Deux Méthodes Complémentaires. *Reanimation* **2003**, *12* (3), 192–197. [https://doi.org/10.1016/S1624-0693\(03\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S1624-0693(03)00042-2).
- (112) EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Breakpoints. **2019**, 0–99.
- (113) Janvier, V.; Cattoir, V.; Courvalin, P.; Dubreuil, L.; Jarlier, V.; Lina, G.; Merens, A.; Plesiat, P.; Ploy, M. Comité de l’Antibiogramme de La Société Française de Microbiologie Recommandations 2019. **2019**.
- (114) EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance.
- (115) Schleifer, K. H.; Kilpper-Balz, R. Transfer of *Streptococcus Faecalis* and *Streptococcus Faecium* to the Genus *Enterococcus* Nom. Rev. as *Enterococcus Faecalis* Comb. Nov. and *Enterococcus Faecium* Comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1984**, *34* (1), 31–34. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-1-31>.

- (116) Miller, W. R.; Murray, B. E.; Rice, L. B.; Arias, C. A. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2016**, *30* (2), 415–439. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.006>.
- (117) Lee, T.; Pang, S.; Abraham, S.; Coombs, G. W. Antimicrobial-Resistant CC17 Enterococcus Faecium: The Past, the Present and the Future. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.016>.
- (118) Bra\ek, O. Ben; Smaoui, S. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. **2019**. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>.
- (119) García-Solache, M.; Rice, L. B. The Enterococcus: A Model of Adaptability to Its Environment. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32* (2), 1–28. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>.
- (120) Golob, M.; Pate, M.; Kušar, D.; Dermota, U.; Avberšek, J.; Papić, B.; Zdovc, I.; Bondi, M. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in Enterococcus Faecium and Enterococcus Faecalis from Humans and Retail Red Meat. *Biomed Res. Int.* **2019**. <https://doi.org/10.1155/2019/2815279>.
- (121) Aarestrup, F. M. Occurrence of Glycopeptide Resistance among Enterococcus Faecium Isolates from Conventional and Ecological Poultry Farms. *Microb. Drug Resist.* **1995**, *1* (3), 255–257. <https://doi.org/10.1089/mdr.1995.1.255>.
- (122) Klare, I.; Heier, H.; Claus, H.; Reissbrodt, R.; Witte, W. VanA -Mediated High-Level Glycopeptide Resistance in *Enterococcus Faecium* from Animal Husbandry. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *125* (2–3), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07353.x>.
- (123) Aymeric Cantais, Roland Cash, Brigitte Lamy, Claire Poyart, G. R. Les Tests Rapides, Outils Essentiels de Lutte Contre l'antibiorésistance. **2016**, *84*. <https://doi.org/10.1192/bjp.112.483.211-a>.
- (124) Philip L. Carl, Prasun K. Chakravarty, J. A. K. A Novel Connector Linkage Applicable in Prodrug Design. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479–480.
- (125) Roth, M. E.; Green, O.; Gnaim, S.; Shabat, D. Dendritic, Oligomeric, and Polymeric Self-

- Immolative Molecular Amplification. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1309–1352.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00372>.
- (126) Wong, A. D.; DeWit, M. A.; Gillies, E. R. Amplified Release through the Stimulus Triggered Degradation of Self-Immolative Oligomers, Dendrimers, and Linear Polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (11), 1031–1045.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.012>.
- (127) Wu, W.; Li, J.; Chen, L.; Ma, Z.; Zhang, W.; Liu, Z.; Cheng, Y.; Du, L.; Li, M. Bioluminescent Probe for Hydrogen Peroxide Imaging in Vitro and in Vivo. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (19), 9800–9806. <https://doi.org/10.1021/ac502396g>.
- (128) Sella, E.; Shabat, D. Dendritic Chain Reaction. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 9934–9936.
<https://doi.org/10.1021/ja903032t>.
- (129) Gnaim, S.; Shabat, D. Quinone-Methide Species, a Gateway to Functional Molecular Systems: From Self-Immolative Dendrimers to Long-Wavelength Fluorescent Dyes. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (10), 2970–2984. <https://doi.org/10.1021/ar500179y>.
- (130) Park, J.; Kim, Y. An Improved Fluorogenic Substrate for the Detection of Alkaline Phosphatase Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2332–2335.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.063>.
- (131) Zhang, J.; Bao, X.; Zhou, J.; Peng, F.; Ren, H.; Dong, X.; Zhao, W. A Mitochondria-Targeted Turn-on Fluorescent Probe for the Detection of Glutathione in Living Cells. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.005>.
- (132) Sloniec-Myszk, J.; Resch-Genger, U.; Hennig, A. Chiral, J-Aggregate-Forming Dyes for Alternative Signal Modulation Mechanisms in Self-Immolative Enzyme-Activatable Optical Probes. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (5), 877–885.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b10526>.
- (133) Wang, R. E.; Costanza, F.; Niu, Y.; Wu, H.; Hu, Y.; Hang, W.; Sun, Y.; Cai, J. Development of Self-Immolative Dendrimers for Drug Delivery and Sensing. *J. Control. Release* **2012**, *159* (2), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.032>.
- (134) Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. Self-Immolative Spacers:

- Kinetic Aspects, Structure-Property Relationships, and Applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (26), 7492–7509. <https://doi.org/10.1002/anie.201500088>.
- (135) Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. Engineering Folate-Drug Conjugates to Target Cancer: From Chemistry to Clinic. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (7), 1357–1369. <https://doi.org/10.1021/bc2005522>.
- (136) Leamon, C. P.; Vlahov, I. R.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Bloomfield, A.; Dorton, R.; Nelson, M.; Kleindl, P.; et al. Folate-Vinca Alkaloid Conjugates for Cancer Therapy: A Structure-Activity Relationship. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (3), 560–568. <https://doi.org/10.1021/bc400441s>.
- (137) Vlahov, I. R.; Wang, Y.; Kleindl, P. J.; Leamon, C. P. Design and Regioselective Synthesis of a New Generation of Targeted Chemotherapeutics. Part II: Folic Acid Conjugates of Tubulysins and Their Hydrazides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4558–4561. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.041>.
- (138) Vlahov, I. R.; Vite, G. D.; Kleindl, P. J.; Wang, Y.; Krishna, H.; Santhapuram, R.; You, F.; Howard, S. J.; Kim, S.-H.; Lee, F. F. Y.; et al. Regioselective Synthesis of Folate Receptor-Targeted Agents Derived from Epothilone Analogs and Folic Acid. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4578–4581. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.016>.
- (139) Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D.; Hilgenbrink, A. R.; Kularatne, S. A.; Low, P. S. Synthesis and Activity of a Folate Peptide Camptothecin Prodrug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350–5335. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.07.076>.
- (140) El Alaoui, A.; Schmidt, F.; Amessou, M.; Sarr, M.; Decaudin, D.; Florent, J. C.; Johannes, L. Shiga Toxin-Mediated Retrograde Delivery of a Topoisomerase I Inhibitor Prodrug. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (34), 6469–6472. <https://doi.org/10.1002/anie.200701270>.
- (141) Park, C. S.; Ha, T. H.; Choi, S.-A.; Nguyen, D. N.; Noh, S.; Kwon, O. S.; Lee, C.-S.; Yoon, H. A Near-Infrared “Turn-On” Fluorescent Probe with a Self-Immolative Linker for the In Vivo Quantitative Detection and Imaging of Hydrogen Sulfide. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *89*, 919–926. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.093>.
- (142) Jiang, Y.; Wu, Q.; Chang, X. A Ratiometric Fluorescent Probe for Hydrogen Sulfide

- Imaging in Living Cells. *Talanta* **2014**, *121*, 122–126.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.001>.
- (143) Ervin, E. M.; Adams, B. T.; Snyman, N.; Phenix, C. P.; Kariuki, J. K.; Rempel, B. P. Carbohydrate-Modified Electrode Surfaces Sensitive to β -Glucosidase Enzyme Activity. *Int. J. Electrochem. Sci. Int. J. Electrochem. Sci* **2014**, *9* (9), 6043–6058.
- (144) Kolakowski, R. V.; Haelsig, K. T.; Emmerton, K. K.; Leiske, C. I.; Miyamoto, J. B.; Cochran, J. H.; Lyon, R. P.; Senter, P. D.; Jeffrey, S. C. The Methylene Alkoxy Carbamate Self-Immolative Unit: Utilization for the Targeted Delivery of Alcohol-Containing Payloads with Antibody-Drug Conjugates. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (28), 7948–7951. <https://doi.org/10.1002/anie.201601506>.
- (145) Tranoy-Opalinski, I.; Legigan, T.; Barat, R.; Clarhaut, J.; Thomas, M.; Renoux, B.; Papot, S. Beta-Glucuronidase-Responsive Prodrugs for Selective Cancer Chemotherapy: An Update. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 302–313.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.045>.
- (146) Weinstain, R.; Segal, E.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. Real-Time Monitoring of Drug Release. *Chem. Commun. Chem. Commun* **2009**, *46*, 553–555.
<https://doi.org/10.1039/b919329d>.
- (147) Batische, E.; Dransart, E.; Sarkouh, R. A.; Brulle, L.; Bai, S.-K.; Godefroy, S.; Johannes, L.; Ed, F.; Schmidt, E. A New Delivery System for Auristatin in STxB-Drug Conjugate Therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 483–491.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.047>.
- (148) Satyam, A. Design and Synthesis of Releasable Folate-Drug Conjugates Using a Novel Heterobifunctional Disulfide-Containing Linker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3196–3199. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.04.063>.
- (149) Tan, X.; Lu, X.; Jia, F.; Liu, X.; Sun, Y.; Logan, J. K.; Zhang, K. Blurring the Role of Oligonucleotides: Spherical Nucleic Acids as a Drug Delivery Vehicle. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10834–10837. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b07554>.
- (150) DeWit, M. a; Gillies, E. R. Design, Synthesis, and Cyclization of 4-Aminobutyric Acid Derivatives: Potential Candidates as Self-Immolative Spacers. *Org. Biomol. Chem.*

- 2011**, 9 (6), 1846–1854. <https://doi.org/10.1039/c0ob00890g>.
- (151) Kock, A.; Zuwala, K.; Smith, A. A. A.; Ruiz-Sanchis, P.; Wohl, B. M.; Tolstrup, M.; Zelikin, A. N. Disulfide Reshuffling Triggers the Release of a Thiol-Free Anti-HIV Agent to Make up Fast-Acting, Potent Macromolecular Prodrugs. *Chem. Commun. Chem. Commun* **2014**, 50 (50), 14498–14500.
- (152) Blencowe, C. A.; Russell, A. T.; Greco, F.; Hayes, W.; Thornthwaite, D. W. Self-Immolative Linkers in Polymeric Delivery Systems. *Polym. Chem.* **2011**, 2 (4), 773–790. <https://doi.org/10.1039/C0PY00324G>.
- (153) Hisamatsu, S.; Suzuki, S.; Kohmoto, S.; Kishikawa, K.; Yamamoto, Y.; Motokawa, R.; Yaita, T. A Chemiluminescence Sensor with Signal Amplification Based on a Self-Immolative Reaction for the Detection of Fluoride Ion at Low Concentrations. *Tetrahedron* **2017**, 73 (27–28), 3993–3998. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.05.084>.
- (154) Ivanciuc, T.; Sbrana, E.; Ansar, M.; Bazhanov, N.; Szabo, C.; Casola, A.; Garofalo, R. P. Hydrogen Sulfide Is an Antiviral and Antiinflammatory Endogenous Gasotransmitter in the Airways. Role in Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2016**, 55 (5), 684–696. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0385OC>.
- (155) Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et al. A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92 (20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>.
- (156) Filho, M. S.; Dao, P.; Gesson, M.; Martin, A. R.; Benhida, R. Development of Highly Sensitive Fluorescent Probes for the Detection of β -Galactosidase Activity—Application to the Real-Time Monitoring of Senescence in Live Cells †. *Analyst* **2018**, 143, 2680–2688. <https://doi.org/10.1039/c8an00516h>.
- (157) Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J. D.; Campisi, J.; Toussaint, O. Protocols to Detect Senescence-Associated Beta-Galactosidase (SA-Bgal) Activity, a Biomarker of Senescent Cells in Culture and in Vivo. *Nat. Protoc.* **2009**, 4 (12), 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>.
- (158) Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. Cancer Drug

- Resistance: An Evolving Paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (10), 714–726.
<https://doi.org/10.1038/nrc3599>.
- (159) Roux, J.; Gouze, J. L.; Hofman, P. L'hétérogénéité Intraclonale Des Tumeurs et Son Impact Sur La Médecine de Précision: Les Promesses de l'imagerie de Cellules Vivantes Couplée à La Modélisation Mathématique. *Medecine/Sciences* **2015**, *31* (1), 28–31. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153101009>.
- (160) Mikuła-Pietrasik, J.; Niklas, A.; Uruski, P.; Tykarski, A.; Książek, K. Mechanisms and Significance of Therapy-Induced and Spontaneous Senescence of Cancer Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03261-8>.
- (161) Sharma, U.; Deeksha, •; Prasad, R. Alkaline Phosphatase: An Overview. *Ind J Clin Biochem* **2014**, *29*, 269–278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>.
- (162) Armstrong, J. S.; Steinauer, K. K.; Hornung, B.; Irish, J. M.; Lecane, P.; Birrell, G. W.; Peehl, D. M.; Knox, S. J. Role of Glutathione Depletion and Reactive Oxygen Species Generation in Apoptotic Signaling in a Human B Lymphoma Cell Line. *Cell Death Differ.* **2002**, *9* (3), 252–263. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400959>.
- (163) Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. The Antioxidant Role of Selenium and Seleno-Compounds. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 134–144.
[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00035-0](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00035-0).
- (164) Zhang, J.; Ji, X.; Zhou, J.; Chen, Z.; Dong, X.; Zhao, W. Sensors and Actuators B : Chemical Pyridinium Substituted BODIPY as NIR Fluorescent Probe for Simultaneous Sensing of Hydrogen Sulphide / Glutathione and Cysteine / Homocysteine. *Sensors Actuators B. Chem.* **2018**, *257*, 1076–1082. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.133>.
- (165) Sloniec, J.; Resch-Genger, U.; Hennig, A. Photophysics and Release Kinetics of Enzyme-Activatable Optical Probes Based on H-Dimerized Fluorophores on Self-Immolative Linkers. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (46), 14336–14344.
<https://doi.org/10.1021/jp409388b>.
- (166) Locquet, N. *Les Principes de La Spectroscopie de Fluorescence : De La Théorie à La Pratique*.

- (167) Gonzalez, F. J.; Nebert, D. W. Evolution of the P450 Gene Superfamily: Animal-Plant “Warfare”, Molecular Drive and Human Genetic Differences in Drug Oxidation. *Trends Genet.* **1990**, *6* (C), 182–186. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90174-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90174-5).
- (168) Jarrar, Y. B.; Lee, S.-J. Molecular Functionality of Cytochrome P450 4 (CYP4) Genetic Polymorphisms and Their Clinical Implications. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (17), 4274. <https://doi.org/10.3390/ijms20174274>.
- (169) Wang, D.; DuBois, R. N. Epoxyeicosatrienoic Acids: A Double-Edged Sword in Cardiovascular Diseases and Cancer. *Journal of Clinical Investigation*. January 3, 2012, pp 19–22. <https://doi.org/10.1172/JCI61453>.
- (170) Jiang, J. G.; Chen, C. L.; Card, J. W.; Yang, S.; Chen, J. X.; Fu, X. N.; Ning, Y. G.; Xiao, X.; Zeldin, D. C.; Wang, D. W. Cytochrome P450 2J2 Promotes the Neoplastic Phenotype of Carcinoma Cells and Is Up-Regulated in Human Tumors. *Cancer Res.* **2005**, *65* (11), 4707–4715. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4173>.
- (171) Chen, C.; Wei, X.; Rao, X.; Wu, J.; Yang, S.; Chen, F.; Ma, D.; Zhou, J.; Dackor, R. T.; Zeldin, D. C.; et al. Cytochrome P450 2J2 Is Highly Expressed in Hematologic Malignant Diseases and Promotes Tumor Cell Growth. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336* (2), 344–355. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.174805>.
- (172) Jiang, J. G.; Ning, Y. G.; Chen, C.; Ma, D.; Liu, Z. J.; Yang, S.; Zhou, J.; Xiao, X.; Zhang, X. A.; Edin, M. L.; et al. Cytochrome P450 Epoxygenase Promotes Human Cancer Metastasis. *Cancer Res.* **2007**, *67* (14), 6665–6674. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3643>.
- (173) Panigrahy, D.; Edin, M. L.; Lee, C. R.; Huang, S.; Bielenberg, D. R.; Butterfield, C. E.; Barnés, C. M.; Mammoto, A.; Mammoto, T.; Luria, A.; et al. Epoxyeicosanoids Stimulate Multiorgan Metastasis and Tumor Dormancy Escape in Mice. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (1), 178–191. <https://doi.org/10.1172/JCI58128>.
- (174) Karkhanis, A.; Hong, Y.; Chan, E. C. Y. Inhibition and Inactivation of Human CYP2J2: Implications in Cardiac Pathophysiology and Opportunities in Cancer Therapy. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc. July 1, 2017, pp 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.017>.

- (175) Ning, J.; Liu, T.; Dong, P.; Wang, W.; Ge, G.; Wang, B.; Yu, Z.; Shi, L.; Tian, X.; Huo, X.; et al. Molecular Design Strategy to Construct the Near-Infrared Fluorescent Probe for Selectively Sensing Human Cytochrome P450 2J2. *J Am Chem Soc* **2018**, No. 141, 1126–1134. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b12136>.
- (176) Braun, E.; Sauter, D. Furin-mediated Protein Processing in Infectious Diseases and Cancer. *Clin. Transl. Immunol.* **2019**, *8* (8). <https://doi.org/10.1002/cti2.1073>.
- (177) Bassi, D. E.; Fu, J.; De Cicco, R. L.; Klein-Szanto, A. J. P. Proprotein Convertases: “Master Switches” in the Regulation of Tumor Growth and Progression. *Molecular Carcinogenesis*. November 2005, pp 151–161. <https://doi.org/10.1002/mc.20134>.
- (178) Klein-Szanto, A. J.; Bassi, D. E. Proprotein Convertase Inhibition: Paralyzing the Cell’s Master Switches. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc. September 15, 2017, pp 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.027>.
- (179) Jaaks, P.; Bernasconi, M. The Proprotein Convertase Furin in Tumour Progression. *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc. August 15, 2017, pp 654–663. <https://doi.org/10.1002/ijc.30714>.
- (180) Li, K.; Hu, X.-X.; Liu, H.-W.; Xu, S.; Huan, S.-Y.; Li, J.-B.; Deng, T.-G.; Zhang, X.-B. In Situ Imaging of Furin Activity with a Highly Stable Probe by Releasing of Precipitating Fluorochrome. *Anal. Chem* **2018**, *90*, 11680–11687. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03335>.
- (181) Żądło-Dobrowolska, A.; Szczygieł, M.; Koszelewski, D.; Paprocki, D.; Ostaszewski, R. Self-Immolative Versatile Fluorogenic Probes for Screening of Hydrolytic Enzyme Activity. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (38), 9146–9150. <https://doi.org/10.1039/C6OB01488G>.
- (182) Luo, Z.; Feng, L.; An, R.; Duan, G.; Yan, R.; Shi, H.; He, J.; Zhou, Z.; Ji, C.; Chen, H. Y.; et al. Activatable Near-Infrared Probe for Fluorescence Imaging of γ -Glutamyl Transpeptidase in Tumor Cells and In Vivo. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (59), 14778–14785. <https://doi.org/10.1002/chem.201702210>.
- (183) Safir Filho, M.; Dao, P.; Gesson, M.; Martin, A. R.; Benhida, R. Development of Highly Sensitive Fluorescent Probes for the Detection of β -Galactosidase Activity –

- Application to the Real-Time Monitoring of Senescence in Live Cells. *Analyst* **2018**, *143* (11), 2680–2688. <https://doi.org/10.1039/C8AN00516H>.
- (184) Miao, Q.; Yeo, D. C.; Wiraja, C.; Zhang, J.; Ning, X.; Xu, C.; Pu, K. Near-Infrared Fluorescent Molecular Probe for Sensitive Imaging of Keloid. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (5), 1256–1260. <https://doi.org/10.1002/anie.201710727>.
- (185) Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Bannerjee, S. K. Drug Delivery Systems: An Updated Review. *Int. J. Pharm. Investig.* **2012**, *2* (1), 2–11. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>.
- (186) Aznar, E.; Oroval, M.; Pascual, L.; Murguía, J. R.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. Gated Materials for On-Command Release of Guest Molecules. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (2), 561–718. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00456>.
- (187) Zhang, X.; Li, X.; Li, Z.; Wu, X.; Wu, Y.; You, Q.; Zhang, X. An NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Responsive and Self-Immolative Prodrug of 5-Fluorouracil for Safe and Effective Cancer Therapy. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 3635–3638. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01409>.
- (188) Doura, T.; Takahashi, K.; Ogra, Y.; Suzuki, N. Combretastatin A4- β -Galactosyl Conjugates for Ovarian Cancer Prodrug Monotherapy. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (2), 211–214. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00427>.
- (189) Gébleux, R.; Stringhini, M.; Casanova, R.; Soltermann, A.; Neri, D. Non-Internalizing Antibody–Drug Conjugates Display Potent Anti-Cancer Activity upon Proteolytic Release of Monomethyl Auristatin E in the Subendothelial Extracellular Matrix. *Int. J. Cancer* **2017**, *140* (7), 1670–1679. <https://doi.org/10.1002/ijc.30569>.
- (190) Kanduluru, A. K.; Low, P. S. Development of a Ligand-Targeted Therapeutic Agent for Neurokinin-1 Receptor Expressing Cancers. *Mol. Pharm.* **2017**, *14* (11), 3859–3865. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00583>.
- (191) Vlahov, I. R.; Qi, L.; Kleindl, P. J.; Santhapuram, H. K.; Felten, A.; Parham, G. L.; Wang, K.; You, F.; Vaughn, J. F.; Hahn, S. J.; et al. Latent Warheads for Targeted Cancer Therapy: Design and Synthesis of pro-Pyrrolobenzodiazepines and Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (12), 2921–2931.

<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00476>.

- (192) Sandvig, K.; Van Deurs, B. Delivery into Cells: Lessons Learned from Plant and Bacterial Toxins. *Gene Ther.* **2005**, *12*, 865–872. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302525>.
- (193) Johannes, L.; Decaudin, D. Protein Toxins: Intracellular Trafficking for Targeted Therapy. *Gene Ther.* **2005**, *12*, 1360–1368. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302557>.
- (194) Senter, P. D.; Sievers, E. L. The Discovery and Development of Brentuximab Vedotin for Use in Relapsed Hodgkin Lymphoma and Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30* (7), 631–637. <https://doi.org/10.1038/nbt.2289>.
- (195) Tietze, L. F.; Seele, R.; Leiting, B.; Krach, T. Stereoselective Synthesis of (1-Alkoxyalkyl) α - and β -d-Glucopyranosiduronates (Acetal-Glucopyranosiduronates): A New Approach to Specific Cytostatics for the Treatment of Cancer. *Carbohydr. Res.* **1988**, *180* (2), 253–262. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80082-X](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80082-X).
- (196) Alaoui, A. El; Saha, N.; Schmidt, F.; Monneret, C.; Florent, J. C. New Taxol[®] (Paclitaxel) Prodrugs Designed for ADEPT and PMT Strategies in Cancer Chemotherapy. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14* (14), 5012–5019. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.03.002>.
- (197) El Alaoui, A.; Schmidt, F.; Monneret, C.; Florent, J. C. Protecting Groups for Glucuronic Acid: Application to the Synthesis of New Paclitaxel (Taxol) Derivatives. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (26), 9628–9636. <https://doi.org/10.1021/jo0612675>.
- (198) Thomas, M.; Rivault, F.; Tranoy-Opalinski, I.; Roche, J.; Gesson, J. P.; Papot, S. Synthesis and Biological Evaluation of the Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) β -Glucuronide and β -Galactoside for Application in Selective Prodrug Chemotherapy. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (4), 983–986. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.11.042>.
- (199) Thomas, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Gesson, J. P.; Roche, J.; Papot, S. Synthesis and Biological Evaluation of Glucuronide Prodrugs of the Histone Deacetylase Inhibitor CI-994 for Application in Selective Cancer Chemotherapy. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16* (17), 8109–8116. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.048>.

- (200) Hamon, F.; Renoux, B.; Chadéneau, C.; Muller, J. M.; Papot, S. Study of a Cycloamine Glucuronide Prodrug for the Selective Chemotherapy of Glioblastoma. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (4), 1678–1682. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.067>.
- (201) Renoux, B.; Legigan, T.; Bensalma, S.; Chadéneau, C.; Muller, J. M.; Papot, S. A New Cycloamine Glucuronide Prodrug with Improved Kinetics of Drug Release. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (24), 8459–8465. <https://doi.org/10.1039/c1ob06081c>.
- (202) Leu, Y. L.; Roffler, S. R.; Chern, J. W. Design and Synthesis of Water-Soluble Glucuronide Derivatives of Camptothecin for Cancer Prodrug Monotherapy and Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT). *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (18), 3623–3628. <https://doi.org/10.1021/jm990124q>.
- (203) Prijovich, Z. M.; Chen, B. M.; Leu, Y. L.; Chern, J. W.; Roffler, S. R. Anti-Tumour Activity and Toxicity of the New Prodrug 9-Aminocamptothecin Glucuronide (9acg) in Mice. *Br. J. Cancer* **2002**, *86* (10), 1634–1638. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600317>.
- (204) Juan, T.-Y.; Roffler, S. R.; Hou, H.-S.; Huang, S.-M.; Chen, K.-C.; Leu, Y.-L.; Prijovich, Z. M.; Yu, C.-P.; Wu, C.-C.; Sun, G.-H.; et al. Antiangiogenesis Targeting Tumor Microenvironment Synergizes Glucuronide Prodrug Antitumor Activity. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (14), 4600–4611. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0090>.
- (205) Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Jayle, C.; Alsarraf, J.; Thomas, M.; Papot, S. Synthesis and Biological Evaluations of a Monomethylauristatin E Glucuronide Prodrug for Selective Cancer Chemotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.037>.
- (206) Grinda, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Renoux, B.; Monvoisin, A.; Cronier, L.; Papot, S. A Heterodimeric Glucuronide Prodrug for Cancer Tritherapy: The Double Role of the Chemical Amplifier. *ChemMedChem* **2011**, *6* (12), 2137–2141. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100355>.
- (207) Grinda, M.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Papot, S. A Self-Immolative Dendritic Glucuronide Prodrug of Doxorubicin. In *MedChemComm*; Royal Society of Chemistry, 2012; Vol. 3, pp 68–70. <https://doi.org/10.1039/c1md00193k>.
- (208) Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Berjeaud, J.

- M.; Guilhot, F.; Papot, S. Synthesis and Antitumor Efficacy of a β -Glucuronidase-Responsive Albumin-Binding Prodrug of Doxorubicin. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (9), 4516–4520. <https://doi.org/10.1021/jm300348r>.
- (209) Reddy, J. A.; Dorton, R.; Westrick, E.; Dawson, A.; Smith, T.; Xu, L.-C.; Vetzal, M.; Kleindl, P.; Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. Preclinical Evaluation of EC145, a Folate-Vinca Alkaloid Conjugate. *Cancer Res* **2007**, *67* (9), 4434–4442. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0033>.
- (210) LoRusso, P. M.; Edelman, M. J.; Bever, S. L.; Forman, K. M.; Pilat, M.; Quinn, M. F.; Li, J.; Heath, E. I.; Malburg, L. M.; Klein, P. J.; et al. Phase I Study of Folate Conjugate EC145 (Vintafolide) in Patients With Refractory Solid Tumors. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 4011–4016. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.4946>.
- (211) Naumann, R. W.; Coleman, R. L.; Burger, R. A.; Sausville, E. A.; Kutarska, E.; Ghamande, S. A.; Gabrail, N. Y.; Depasquale, S. E.; Nowara, E.; Gilbert, L.; et al. PRECEDENT: A Randomized Phase II Trial Comparing Vintafolide (EC145) and Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) in Combination versus PLD Alone in Patients with Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31* (35), 4400–4406. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.7685>.
- (212) Grinda, M.; Legigan, T.; Clarhaut, J.; Peraudeau, E.; Tranoy-Opalinski, I.; Renoux, B.; Thomas, M.; Guilhot, F.; Papot, S. Organic & Biomolecular Chemistry An Enzyme-Responsive System Programmed for the Double Release of Bioactive Molecules through an Intracellular Chemical Amplification Process. *Org. Biomol. Chem* **2013**, *11*. <https://doi.org/10.1039/c3ob41536h>.
- (213) Danial, M.; Andersen, A. H. F.; Zuwala, K.; Cosson, S.; Riber, C. F.; Smith, A. A. A.; Tolstrup, M.; Moad, G.; Zelikin, A. N.; Postma, A. Triple Activity of Lamivudine Releasing Sulfonated Polymers against HIV-1. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (7), 2397–2410. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00156>.
- (214) Neumann, W.; Nolan, E. M. Evaluation of a Reducible Disulfide Linker for Siderophore-Mediated Delivery of Antibiotics. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1588-y>.

- (215) Wang, X.; Borges, C. A.; Ning, X.; Rafi, M.; Zhang, J.; Park, B.; Takemiya, K.; Lo Sterzo, C.; Taylor, W. R.; Riley, L.; et al. A Trimethoprim Conjugate of Thiomaltose Has Enhanced Antibacterial Efficacy in Vivo. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (5), 1729–1735. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00177>.
- (216) Kelkar, S. S.; Reineke, T. M. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (10), 1879–1903. <https://doi.org/10.1021/bc200151q>.
- (217) Wang, L. S.; Chuang, M. C.; Ho, J. an A. Nanotheranostics - A Review of Recent Publications. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, pp 4679–4695. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33065>.
- (218) Jeelani, S.; Jagat Reddy, R. C.; Maheswaran, T.; Asokan, G. S.; Dany, A.; Anand, B. Theranostics: A Treasured Tailor for Tomorrow. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. Medknow Publications 2014. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.137249>.
- (219) Redy, O.; Shabat, D. Modular Theranostic Prodrug Based on a FRET-Activated Self-Immolative Linker. *J. Control. Release* **2012**, *164* (3), 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.009>.
- (220) Liu, P.; Xu, J.; Yan, D.; Zhang, P.; Zeng, F.; Li, B.; Wu, S. A DT-Diaphorase Responsive Theranostic Prodrug for Diagnosis, Drug Release Monitoring and Therapy. *Chem. Commun. Chem. Commun* **2015**, *51* (51), 9567–9570. <https://doi.org/10.1039/c5cc02149a>.
- (221) Wang, Z.; Wu, H.; Liu, P.; Zeng, F.; Wu, S. A Self-Immolative Prodrug Nanosystem Capable of Releasing a Drug and a NIR Reporter for in Vivo Imaging and Therapy. *Biomaterials* **2017**, *139*, 139–150. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.06.002>.
- (222) Gnaim, S.; Shabat, D. Activity-Based Optical Sensing Enabled by Self-Immolative Scaffolds: Monitoring of Release Events by Fluorescence or Chemiluminescence Output. *Acc. Chem. Res.* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00338>.
- (223) Yang, Z.; Lin, H.; Huang, J.; Li, A.; Sun, C.; Richmond, J.; Gao, J. A Gadolinium-Complex-Based Theranostic Prodrug for in Vivo Tumour-Targeted Magnetic Resonance Imaging and Therapy †. *Chem. Commun* **2019**, *55*, 4546–4549.

<https://doi.org/10.1039/c9cc01816f>.

- (224) De Groot, F. M. H.; Loos, W. J.; Koekkoek, R.; Van Berkom, L. W. A.; Busscher, G. F.; Seelen, A. E.; Albrecht, C.; De Bruijn, P.; Scheeren, H. W. Elongated Multiple Electronic Cascade and Cyclization Spacer Systems in Activatable Anticancer Prodrugs for Enhanced Drug Release. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (26), 8815–8830.
<https://doi.org/10.1021/jo0158884>.
- (225) Amir, R. J.; Pessah, N.; Shamis, M.; Shabat, D. Self-Immolative Dendrimers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (37), 4494–4499. <https://doi.org/10.1002/anie.200351962>.
- (226) Szalai, M. L.; Kevitch, R. M.; McGrath, D. V. Geometric Disassembly of Dendrimers: Dendritic Amplification. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (51), 15688–15689.
<https://doi.org/10.1021/ja0386694>.
- (227) Bolton, J. L. Quinone Methide Bioactivation Pathway: Contribution to Toxicity and/or Cytoprotection? *Curr Org Chem* **2014**, *18* (1), 61–69.
<https://doi.org/10.2174/138527281801140121123046>.
- (228) Bolton, J. L.; Dunlap, T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. *Chem Res Toxicol* **2017**, *30*, 13–37.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00256>.
- (229) Li, S.; Szalai, M. L.; Kevitch, R. M.; McGrath, D. V. Dendrimer Disassembly by Benzyl Ether Depolymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (35), 10516–10517.
<https://doi.org/10.1021/ja0349960>.
- (230) Ortiz, A.; Shanahan, C. S.; Sisk, D. T.; Perera, S. C.; Rao, P.; Mcgrath, D. V. Improved Iterative Synthesis of Linearly Disassembling Dendrons. *J. Org. Chem* **2010**, *75*, 6154–6162. <https://doi.org/10.1021/jo1009849>.
- (231) Warnecke, A.; Kratz, F. 2,4-Bis(Hydroxymethyl)Aniline as a Building Block for Oligomers with Self-Eliminating and Multiple Release Properties. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (4), 1546–1552. <https://doi.org/10.1021/jo702484z>.
- (232) De Groot, F. M. H.; Albrecht, C.; Koekkoek, R.; Beusker, P. H.; Scheeren, H. W. “Cascade-Release Dendrimers” Liberate All End Groups upon a Single Triggering Event

- in the Dendritic Core. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (37), 4490–4494.
<https://doi.org/10.1002/anie.200351942>.
- (233) Shamis, M.; Shabat, D. Single-Triggered AB₆self-Immolative Dendritic Amplifiers. *Chem. - A Eur. J.* **2007**, *13* (16), 4523–4528. <https://doi.org/10.1002/chem.200700142>.
- (234) Avital-Shmilovici, M.; Shabat, D. Enzymatic Activation of Hydrophobic Self-Immolative Dendrimers: The Effect of Reporters with Ionizable Functional Groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3959–3962. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.002>.
- (235) Gopin, A.; Ebner, S.; Attali, B.; Shabat, D. Enzymatic Activation of Second-Generation Dendritic Prodrugs: Conjugation of Self-Immolative Dendrimers with Poly(Ethylene Glycol) via Click Chemistry. *Bioco* **2006**, *17*, 1432–1440.
<https://doi.org/10.1021/bc060180n>.
- (236) Perry-Feigenbaum, R.; Baran, P. S.; Shabat, D. The Pyridinone-Methide Elimination. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (23), 4825–4828. <https://doi.org/10.1039/B915265B>.
- (237) Amir, R. J.; Danieli, E.; Shabat, D. Receiver-Amplifier, Self-Immolative Dendritic Device. *Chem. - A Eur. J.* **2007**, *13* (3), 812–821. <https://doi.org/10.1002/chem.200601263>.
- (238) Perry-Feigenbaum, R.; Sella, E.; Shabat, D. Autoinductive Exponential Signal Amplification: A Diagnostic Probe for Direct Detection of Fluoride. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (43), 12123–12128. <https://doi.org/10.1002/chem.201101796>.
- (239) Sella, E.; Weinstain, R.; Erez, R.; Burns, N. Z.; Baran, S. Sulfhydryl-Based Dendritic Chain Reaction W. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6575–6577.
<https://doi.org/10.1039/c0cc02195d>.
- (240) Weinstain, R.; Baran, P. S.; Shabat, D. Activity-Linked Labeling of Enzymes by Self-Immolative Polymers. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (9), 1783–1791.
<https://doi.org/10.1021/bc9002037>.
- (241) Lewis, G. G.; Robbins, J. S.; Phillips, S. T. A Prototype Point-of-Use Assay for Measuring Heavy Metal Contamination in Water Using Time as a Quantitative Readout. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (40), 5352–5354. <https://doi.org/10.1039/c3cc47698g>.
- (242) Dewit, M. A.; Gillies, E. R. A Cascade Biodegradable Polymer Based on Alternating

- Cyclization and Elimination Reactions. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 18327–18334.
- (243) Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J. Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2008**, *1*, 17–32.
- (244) Filipponi, L.; Sutherland, D. *Principles, Applications, Implications and Hands-on Activities NANOTECHNOLOGIES A Compendium for Educators*; 2013.
<https://doi.org/10.2777/76945>.
- (245) Narayan, R.; Nayak, U.; Raichur, A.; Garg, S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics* **2018**, *10* (3), 118. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030118>.
- (246) Deng, Z.; Qian, Y.; Yu, Y.; Liu, G.; Hu, J.; Zhang, G.; Liu, S. Engineering Intracellular Delivery Nanocarriers and Nanoreactors from Oxidation-Responsive Polymersomes via Synchronized Bilayer Cross-Linking and Permeabilizing Inside Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (33), 10452–10466. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b04115>.
- (247) Juárez, L. A.; Añón, E.; Giménez, C.; Sancenón, F.; Martínez-Máñez, R.; Costero, A. M.; Gaviña, P.; Parra, M.; Bernardos, A. Self-Immolative Linkers as Caps for the Design of Gated Silica Mesoporous Supports. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22*, 14126–14130.
<https://doi.org/10.1002/chem.201602126>.
- (248) Gisbert-Garzarán, M.; Lozano, D.; Vallet-Re, M.; Manzano, M. Self-Immolative Polymers as Novel PH-Responsive Gate Keepers for Drug Delivery. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 132–136. <https://doi.org/10.1039/c6ra26771h>.
- (249) Liu, R.; Aw, J.; Teo, W.; Padmanabhan, P.; Xing, B. Novel Trimethyl Lock Based Enzyme Switch for the Self-Assembly and Disassembly of Gold Nanoparticles. *RSC Adv.* **2010**, *34*, 594–598. <https://doi.org/10.1039/b9nj00776h>.
- (250) Latorre, A.; Posch, C.; Garcimar, Y.; Celli, A.; Sanlorenzo, M.; Vujic, I.; Ma, J.; Zekhtser, M.; Rappersberger, K.; Ortiz-Urda, S.; et al. DNA and Aptamer Stabilized Gold Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Therapeutics. *RSC Adv.* **2014**, *6*, 7436–7442. <https://doi.org/10.1039/c4nr00019f>.
- (251) Julien, L.-A.; Roux, P. P. MTOR, La Cible Fonctionnelle de La Rapamycine.

- médecine/sciences* **2010**, 26 (12), 1056–1060.
<https://doi.org/10.1051/medsci/201026121056>.
- (252) Fan, B.; Gillies, E. R. Poly(Ethyl Glyoxylate)-Poly(Ethylene Oxide) Nanoparticles: Stimuli- Responsive Drug Release via End-to-End Polyglyoxylate Depolymerization. *Mol. Pharm.* **2017**, 14, 2548–2559.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00030>.
- (253) Gisbert-Garzarán, M.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. Self-Immolative Chemistry in Nanomedicine. *Chem. Eng. J.* **2018**, 340 (December 2017), 24–31.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.098>.
- (254) Jäger, E.; Höcherl, A.; Janoušková, O.; Jäger, A.; Hrubý, M.; Konefał, R.; Netopilik, M.; Pánek, J.; Šlouf, M.; Ulbrich, K.; et al. Fluorescent Boronate-Based Polymer Nanoparticles with Reactive Oxygen Species (ROS)-Triggered Cargo Release for Drug-Delivery Applications. *RSC Adv.* **2016**, 8, 6958–6963.
<https://doi.org/10.1039/c6nr00791k>.
- (255) WIDDISON, W. C. Maytansinoid Derivatives With Self-Immolative Peptide Linkers And Conjugates Thereof. WO2018160539A1, 2018.
- (256) Lin, R.-H.; Lin, S.-Y.; Hsieh, Y.-C.; Huang, C.-C. Hydrophilic Self-Immolative Linkers and Conjugates Thereof. WO 2014:100762 A9, 2014.
- (257) KOLAKOWSKI, Robert, JEFFREY, Scott, BURKE, P. Methylene Carbamate Linkers For Use With Targeted-Drug Conjugates. WO 2015:095755 A1, 2015.
- (258) Steinkuhler M Christian, Gallinari M Paola, Osswald Bianca, Sewald Norbert, Ritzefeld Markus, Frese Marcel, Figueras Eduard, P. L. Cryptophycin-Based Antibody-Drug Conjugates With Novel Self-Immolative Linkers. EP3069734A1, 2016.
- (259) Thomas Cailly, Caen (FR); Frédéric Fabis, Mathieu (FR); Ali Laayoun, La Frette (FR); Alain Laurent, Grenoble (FR); Sylvain Ursuegui, C. (FR). Methods of Functionalization and Reagents Used in Such Methods Using an Aza-Isatoic Anhydride or a Derivative Thereof, Biological Molecules Thus Treated and Kits, July 26, 2013.
- (260) Ursuegui, S.; Yougnia, R.; Moutin, S.; Burr, A.; Fossey, C.; Cailly, T.; Laayoun, A.;

- Laurent, A.; Fabis, F. Organic & Biomolecular Chemistry A Biotin-Conjugated Pyridine-Based Isatoic Anhydride, a Selective Room Temperature RNA-Acylating Agent for the Nucleic Acid Separation †. *Org. Biomol. Chem* **2015**, *13*, 3625.
<https://doi.org/10.1039/c4ob02636e>.
- (261) Ursuegui, S. Université de Caen Basse-Normandie, 2013.
- (262) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (263) Breece, R. M. Spectroscopic Characterization of Co(II)-Substituted VanX, a Zn(II)-Dependent Dipeptidase Required for High-Level Vancomycin Resistance, Miami University, 2004.
- (264) Bussiere, D. E.; Pratt, S. D.; Katz, L.; Severin, J. M.; Holzman, T.; Park, C. H. The Structure of VanX Reveals a Novel Amino-Dipeptidase Involved in Mediating Transposon-Based Vancomycin Resistance. *Mol. Cell* **1998**, *2* (1), 75–84.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80115-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80115-X).
- (265) Wu, Z.; Wright, G. D.; Walsh, C. T. Overexpression, Purification, and Characterization of VanX, a D-, D-Dipeptidase Which Is Essential for Vancomycin Resistance in *Enterococcus Faecium* BM4147. *Biochemistry* **1995**, *34* (8), 2455–2463.
- (266) Hsieh, M. L.; Tseng, M. J.; Tseng, M. C.; Chu, Y. H. Identification of a New Chromophoric Substrate in the Library of Amino Acid P-Nitroanilides for Continuous Assay of VanX, a d,d-Dipeptidase Essential for Vancomycin Resistance. *Anal. Biochem.* **2006**, *354* (1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.054>.
- (267) Uhlén, M.; Forsberg, G.; Moks, T.; Hartmanis, M.; Nilsson, B. Fusion Proteins in Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, *3* (4), 363–369.
[https://doi.org/10.1016/0958-1669\(92\)90164-E](https://doi.org/10.1016/0958-1669(92)90164-E).
- (268) Gräslund, S.; Nordlund, P.; Weigelt, J.; Martin Hallberg, B.; Bray, J.; Gileadi, O.; Knapp, S.; Oppermann, U.; Arrowsmith, C.; Hui, R.; et al. Protein Production and Purification. *Shigeyuki Yokoyama* **2008**, *18* (2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>.

- (269) Booth, W. T.; Schlachter, C. R.; Pote, S.; Ussin, N.; Mank, N. J.; Klapper, V.; Offermann, L. R.; Tang, C.; Hurlburt, B. K.; Chruszcz, M. Impact of an N-Terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability. *ACS Omega* **2018**, *3* (1), 760–768.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01598>.
- (270) Crowder, M. W. Combating Vancomycin Resistance in Bacteria: Targeting the D-Ala-D-Ala Dipeptidase VanX. *Infect. Disord. Drug Targets* **2006**, *6* (2), 147–158.
- (271) Golich, F. C.; Sigdel, T.; Breece, R. M.; Detar, L.; Herron, L. R.; Crowder, M. W. L-Alanine-p-Nitroanilide Is Not a Substrate for VanX. *Anal. Biochem.* **2004**, *331* (2), 398–400. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.05.026>.
- (272) invitrogen. *Champion™ PET SUMO Protein Expression System For High-Level Expression and Enhanced Solubility of Recombinant Proteins in E. Coli and Cleavage of Native Protein*; 2010.
- (273) Snieckus, V. *Directed Ortho Metalation. Tertiary Amide and O-Carbamate Directors in Synthetic Strategies for Polysubstituted Aromaticst VICTOR S NIECKUS*; 1990; Vol. 90.
- (274) Beak, P.; Meyers, A. I. Stereo- and Regiocontrol by Complex Induced Proximity Effects: Reactions of Organolithium Compounds. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19* (11), 356–363.
<https://doi.org/10.1021/ar00131a005>.
- (275) Whisler, M. C.; MacNeil, S.; Snieckus, V.; Beak, P. Beyond Thermodynamic Acidity: A Perspective on the Complex-Induced Proximity Effect (CIPE) in Deprotonation Reactions. *Angewandte Chemie - International Edition*. April 19, 2004, pp 2206–2225.
<https://doi.org/10.1002/anie.200300590>.
- (276) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *ORGANIC CHEMISTRY*, Second.; Oxford University Press, 2001.
- (277) Plé, N.; Turck, A.; Couture, K.; Quéguiner, G. Diazines. 13. Metalation without Ortho-Directing Group Functionalization of Diazines via Direct Metalation. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (12), 3781–3786. <https://doi.org/10.1021/jo00117a033>.
- (278) POONI, Parminder, K.; MERCHANT, Kevin, J.; KERR, Catrina, M.; HARRISON, D. DÉRIVÉS DE LA BENZAZÉPINE DESTINÉS À TRAITER DES TROUBLES DU SYSTÈME NERVEUX

CENTRAL, July 14, 2011.

- (279) Eaton, P. E.; Lee, C. H.; Xiong, Y. Magnesium Amide Bases and Amido-Grignards. 1. Ortho Magnesiumation. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (20), 8016–8018.
<https://doi.org/10.1021/ja00202a054>.
- (280) Krasovskiy, A.; Krasovskaya, V.; Knochel, P. Mixed Mg/Li Amides of the Type R₂NMgCl·LiCl as Highly Efficient Bases for the Regioselective Generation of Functionalized Aryl and Heteroaryl Magnesium Compounds. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45* (18), 2958–2961. <https://doi.org/10.1002/anie.200504024>.
- (281) Knochel, P.; Schade, M. A.; Bernhardt, S.; Manolikakes, G.; Metzger, A.; Piller, F. M.; Rohbogner, C. J.; Mosrin, M. Functionalization of Heterocyclic Compounds Using Polyfunctional Magnesium and Zinc Reagents. *Beilstein J. Org. Chem* **2011**, *7*, 1261–1277. <https://doi.org/10.3762/bjoc.7.147>.
- (282) Boudet, N.; Lachs, J. R.; Knochel, P. Multiple Regioselective Functionalizations of Quinolines via Magnesiations. *Org. Lett.* **2007**, *9* (26), 5525–5528.
<https://doi.org/10.1021/ol702494k>.
- (283) Wunderlich, S. H.; Rohbogner, C. J.; Unsinn, A.; Knochel, P. Scaleable Preparation of Functionalized Organometallics via Directed Ortho Metalation Using Mg- and Zn-Amide Bases. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14* (2). <https://doi.org/10.1021/op9002888>.
- (284) Shirley, D. A. The Synthesis of Ketones from Acid Halides and Organometallic Compounds of Magnesium, Zinc, and Cadmium. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1954; pp 28–58.
<https://doi.org/10.1002/0471264180.or008.02>.
- (285) Jorgenson, M. J. Preparation of Ketones from the Reaction of Organolithium Reagents with Carboxylic Acids. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1980; pp 1–98. <https://doi.org/10.1002/0471264180.or018.01>.
- (286) Wunderlich, S. Fakultät Für Chemie Und Pharmazie Der Ludwig-Maximilians-Universität, Munich., 2010.
- (287) Liu, J.; Ikemoto, N.; Petrillo, D.; Armstrong, J. D. Improved Syntheses of α -BOC-

- Aminoketones from α -BOC-Amino-Weinreb Amides Using a Pre-Deprotonation Protocol. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43 (46), 8223–8226. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02031-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02031-2).
- (288) Krasovskiy, A.; Knochel, P. Convenient Titration Method for Organometallic Zinc, Magnesium, and Lanthanide Reagents. *Synthesis (Stuttg)*. **2006**, No. 5, 890–891. <https://doi.org/10.1055/s-2006-926345>.
- (289) Qiagen. *A Handbook for High-Level Expression and Purification of 6xHis-Tagged Proteins*; 2003.
- (290) Krasovskiy, A.; Krasovskaya, V.; Knochel, P. Mixed Mg/Li Amides of the Type R 2 NMgCl·LiCl as Highly Efficient Bases for the Regioselective Generation of Functionalized Aryl and Heteroaryl Magnesium Compounds**. **2006**, 2958–2961. <https://doi.org/10.1002/anie.200504024>.
- (291) Piller, F. M.; Appukkuttan, P.; Gavryushin, A.; Helm, M.; Knochel, P. Convenient Preparation of Polyfunctional Aryl Magnesium Reagents by a Direct Magnesium Insertion in the Presence of LiCl. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, 47 (36), 6802–6806. <https://doi.org/10.1002/anie.200801968>.
- (292) Pande, S. V.; Utale, P. S.; Gholve, S. B.; Tekade, P. V.; Patil, S. G. SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL EVALUATION OF CARBOXAMIDE DERIVATIVES OF AMINO ACIDS. **2014**.
- (293) Gruzdev, D. A.; Levit, G. L.; Krasnov, V. P.; Chulakov, E. N.; Sh Sadretdinova, L.; Grishakov, A. N.; Ezhikova, M. A.; Kodess, M. I.; Charushin, V. N. Acylative Kinetic Resolution of Racemic Amines Using N-Phthaloyl-(S)-Amino Acyl Chlorides. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 936–942. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2010.05.013>.
- (294) Marosvölgyi-Haskó, D.; Petz, A.; Takács, A.; Kollár, L. Synthesis of Tetrahydrophthalazine and Phthalamide (Phthalimide) Derivatives via Palladium-Catalysed Carbonylation of Iodoarenes. *Tetrahedron* **2011**, 67 (47), 9122–9128. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.09.095>.
- (295) Jahns, C.; Hoffmann, T.; Müller, S.; Gerth, K.; Washausen, P.; Höfle, G.; Reichenbach,

- H.; Kalesse, M.; Müller, R. Pellasoren: Structure Elucidation, Biosynthesis, and Total Synthesis of a Cytotoxic Secondary Metabolite from *Sorangium Cellulosum*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5239–5243. <https://doi.org/10.1002/anie.201200327>.
- (296) Martinez, C. M.; Neudörffer, A.; Largeron, M. A Convenient Biomimetic Synthesis of Optically Active Putative Neurotoxic Metabolites of MDMA (“ecstasy”) from R-(-)- and S-(+)-N-Methyl- α -Methyldopamine Precursors. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (18), 3739–3748. <https://doi.org/10.1039/c2ob25245g>.
- (297) Penhoat, M.; Levacher, V.; Dupas, G. Supporting Information Novel Extension of Meyers’ Methodology: Stereoselective Construction of Axially Chiral 7,5-Fused Bicyclic Lactams. *J. Org. Chem.* **2003**, 9517–9520.

Détection de la résistance à la vancomycine par mise en évidence d'une activité D-Ala-D-Ala dipeptidase

Les antibiotiques de la famille des glycopeptidiques ont été utilisés intensivement chez l'homme et l'animal depuis leur autorisation. L'utilisation massive de la vancomycine en milieu hospitalier, et de l'avoparcine comme facteur de croissance dans l'élevage intensif a induit une pression de sélection et l'émergence d'*Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides. Selon l'OMS, *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine représente une menace pour la santé publique mondiale. Des méthodes de détection de la résistance aux glycopeptides existent mais elles sont lentes et/ou coûteuses. La présente étude vise à la découverte d'une méthode rapide de détection de la résistance à la vancomycine qui permettrait une prise en charge précoce et l'isolement du patient, limitant ainsi l'expansion de la résistance. Le concept de la méthode proposée s'appuie sur la détection de la résistance à la vancomycine par mise en évidence de l'activité dipeptidase D-Alanine-D-Alanine de VanX en libérant un chromophore. Pour apporter la preuve de concept de cette méthode, deux esters, le 2-chloronicotinate d'éthyle et le 2-chloronicotinate de *tert*-butyle ont été fonctionnalisés en position 4 avec une D-alanine *N*-protégée. Cette fonctionnalisation s'est avérée complexe en raison d'une forte tendance à la cyclisation du système nicotinate, qui prouve d'ailleurs l'efficacité de l'auto-immolation du système que nous proposons. Suivant le même protocole de fonctionnalisation du 2-chloronicotinate de *tert*-butyle, un premier dérivé furopyridinone avec la séquence D-Ala-D-Ala a été obtenu. Après déprotection, cette molécule peut servir de première molécule-test pour la détection de l'activité VanX. Elle peut également servir de pivot pour la synthèse d'autres molécules pro-chromophores auto-immolables. Un clonage de la protéine VanX a été effectué dans deux types de vecteurs donnant respectivement une protéine recombinante 6xHis-VanX et une protéine recombinante VanX native qui possèdent toutes deux une activité D-Ala-D-Ala dipeptidase.

Mots clés : Vancomycine, antibiorésistance, *Enterococcus faecium*, système auto-immolable.

Detection of vancomycin resistance through D-Alanine-D-Alanine dipeptidase activity

Glycopeptide antibiotics have been used intensively in humans and animals since they have been approved. Emergence of glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* has been ascribed to a selective pressure due to the increasing use of vancomycine in hospitals and avoparcin as a growth promoter in intensive livestock. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* represents a serious and increasing threat for world public health according to WHO. Glycopeptides resistance detection methods do exist, however they are slow and/or expensive. The present study aims at discovering a much faster method that would allow early medical care and isolation of the patient, thus limiting the dissemination of the resistance. The concept of the proposed method is based on the detection of vancomycin resistance through the evidencing of a D-Alanine-D-Alanine dipeptidase activity of VanX by releasing a chromophore. To demonstrate the concept of this method, ethyl 2-chloronicotinate and *tert*-butyl 2-chloronicotinate were functionalized with an *N*-protected D-alanine. This functionalization has proven to be complex due to a strong tendency towards cyclization of the nicotinate system, which moreover proves the effectiveness of the self-immolation of the system that we offer. Following the same functionalization protocol with *tert*-butyl 2-chloronicotinate, a first furopyridinone derivative with a D-Ala-D-Ala sequence was obtained. After deprotection, this molecule can be used to detect VanX activity. It can also serve as a pivot for synthesis of self-immolable pro-chromophoric molecules. Cloning and over-expression of the VanX protein was carried out in two types of vectors giving respectively a recombinant protein 6xHis-VanX and a recombinant native protein VanX which both possess D-Ala-D-Ala dipeptidase activity.

Keywords: Vancomycin, antimicrobial resistance, *Enterococcus faecium*, Self-immolative systems.