



HAL
open science

Synthèse et évaluation biologique de molécules hétérobicycliques dans l'étude des interactions antagonistes entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* chez les patients atteints de mucoviscidose

Bruna Gioia

► To cite this version:

Bruna Gioia. Synthèse et évaluation biologique de molécules hétérobicycliques dans l'étude des interactions antagonistes entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* chez les patients atteints de mucoviscidose. Chimie thérapeutique. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1061 . tel-03593406

HAL Id: tel-03593406

<https://theses.hal.science/tel-03593406v1>

Submitted on 2 Mar 2022

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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1061

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 205 EDISS

Ecole Interdisciplinaire Science et Santé

Spécialité de doctorat : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Discipline : Chimie Thérapeutique et Médicinale

Soutenue publiquement le 27/03/2020, par :

Bruna Gioia

**Synthèse et évaluation biologique des dérivés de la
4-hydroxyquinoléine, dans l'étude des interactions
antagonistes entre *Pseudomonas aeruginosa* et
Staphylococcus aureus, chez les patients atteints de
mucoviscidose**

Devant le jury composé de :

Prof BELMONT Philippe, PU - Université Paris Descartes, - Rapporteur

Dr CAVELIER Florine, DR - CNRS - Université de Montpellier II -
Rapporteuse

Dr DOLEANS-JORDHEIM Anne, MCU-PH - Université Claude Bernard Lyon
1, Hospices Civiles de Lyon - Examinatrice

Dr PEUCHMAUR Marine, MCU - Université Grenoble Alpes - Rapporteur

Dr ROCHEBLAVE Luc, MCU - Université Claude Bernard Lyon 1 - Directeur
de thèse

Prof WALCHSHOFER Nadia, PU - Université Claude Bernard Lyon 1 -
Examinatrice

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Résumé français

La mucoviscidose (MV) est une maladie génétique rare, causée par la mutation génétique du gène CFTR (Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Regulator). Ce gène code un transporteur des ions chlorures, appelé CFTR que l'on trouve dans divers organes du corps humain. Cette mutation entraîne un défaut du transport ionique. La MV est responsable d'une augmentation de la viscosité du mucus, particulièrement dans les poumons. Cela engendre des conditions environnementales favorables à l'installation de pathogènes et à l'apparition d'infections respiratoires.

Chez les patients MV, il existe des différences de colonisation pulmonaire entre les enfants et les adultes, *Staphylococcus aureus* (**Sa**) étant davantage présent chez les jeunes patients, alors que *Pseudomonas aeruginosa* (**Pa**) se retrouve chez les adultes.

Cette dynamique est entre autres liée à des interactions antagonistes entre **Pa** et **Sa**. Les mécanismes de ces interactions restent encore complexes. Cependant, ils pourraient être expliqués par la production et par la sécrétion, dans l'environnement pulmonaire, de molécules issues d'un micro-organisme et perçues par un second.

Suite à des études préliminaires sur les interactions entre ces deux bactéries, une hypothèse a été émise : **les molécules hétérobicycliques dérivées de la 4-hydroxyquinoléine sont responsables de l'activité inhibitrice de Pa sur Sa.**

Les objectifs que nous avons fixés pour ce projet de thèse sont triple. Ils consistent :

- i) en la synthèse de composés appartenant à 3 familles dérivés de la 4-hydroxyquinoléine (Δ^2 -AQ-C_n, AQ-C_n, et Δ^2 -AQNO-C_n),
- ii) en l'évaluation biologique des molécules synthétisées,
- iii) en une étude des relations structure-activité.

Mots clés : Mucoviscidose, 4-hydroxyquinoléine, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, Interactions antagonistes

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease due to a gene mutation, that modifies the synthesis and the function of the CFTR protein (Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Regulator), a chloride channel found in different human organs. This modification induces ionic transport defaults. Particularly, in lungs, CF is responsible for an increase of the mucus viscosity. As a consequence, mucociliary clearance is decreased and the alveoli obstructed, leading to a suitable environment for pathogens development.

In CF patient, differences exist between children and adults. Indeed, *Staphylococcus aureus* (**Sa**) is the major pathogen in young patients, but over the time **Sa** decreases in favor of *Pseudomonas aeruginosa* (**Pa**).

Numerous studies have been conducted to understand the relationship between **Pa-Sa**. It could be explained by different mechanisms including the secretion in the environment of molecules from one microorganism and perceived by the another one. Understanding how the two bacteria interact and most of all, how **Pa**, in the respiratory tracts, takes over other bacteria, including **Sa**, is important to explain the physiopathology of lungs infections induced by **Pa**.

We focused on the outcomes of these molecules, AQ, secreted by **Pa**.

Thanks to previous works concerning the antagonist interactions between **Pa-Sa**, a hypothesis has been issued: **molecules derivatives from 4-hydroxyquinoline are responsible of inhibitory activity of Pa onto Sa.**

The goals defined for this work consist :

- (i) in the synthesis of three classes of molecules (Δ^2 -AQ-C_n, AQ-C_n, et Δ^2 -AQNO-C_n),
- (ii) in the biological evaluation of synthesized molecules,
- (iii) in a structure-activity relationship study.

Keywords: Cystic fibrosis, 4-hydroxyquinoline, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, Antagonist interactions

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont permis la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord je remercie le Professeur Marc Le Borgne, responsable de l'EA4446, de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche.

Je remercie très sincèrement les Docteurs Florine Cavelier, Marine Peuchmaur et le Professeur Phillippe Belmont pour avoir accepté d'être membre de mon jury.

Je remercie le Professeur Nadia Walchshofer de me faire l'honneur de figurer dans mon jury, mais avant tout je tiens à la remercier pour l'aide et les conseils apportés durant ces 3 années.

Mes remerciements vont également à mon directeur de thèse, le Docteur Luc Rocheblave, pour m'avoir proposé de travailler sur ce sujet passionnant et pour l'ensemble de ses conseils durant ces trois ans.

Je remercie le Docteur Anne Doléans-Jordheim, co-encadrante de ce projet, pour ses encouragements, sa disponibilité et pour m'avoir fait découvrir le monde de la microbiologie.

Je remercie l'ensemble des membres de mon Comité de Suivi de Thèse (CST) : les Professeurs Marie Geneviève Dijoux-Franca, Frederic Laurent et Thierry Lomberget et le Docteur Didier Blaha d'avoir accepté de participer aux CST. Merci pour leur disponibilité, leurs suggestions et leur aide pour le bon développement du projet de thèse.

Je remercie très sincèrement le Docteur Sylvie Radix et le Professeur Thierry Lomberget pour l'aide apportée, le soutien moral et professionnel tout au long de ma thèse. Merci pour leurs encouragements et pour ce qu'ils ont fait pour moi. Il m'est difficile d'exprimer à l'écrit mon immense gratitude.

Je remercie l'ensemble du laboratoire EA4446 pour les bons moments passés ensemble. En particulier les Docteurs Angélique Mularoni et Christelle Marminon pour le soutien moral durant ces derniers mois ; Laurent Ettouati durant les séances de TP ; Zouhair Bouaziz pour sa disponibilité et pour nous avoir attendu tard le soir. Un remerciement

particulier à Marc Rolland de Ravel qui m'a aidée du début jusqu'à la fin, merci pour vos conseils et astuces techniques sans lesquels il aurait été difficile de conclure ma thèse.

Un grand grand merci à Dalila pour les bons moments passés, pour les repas, les discussions, le soutien quotidien et l'écoute que tu m'as accordé tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier Carine pour avoir réalisé les tests biologiques des produits synthétisés et pour m'avoir aidée dans la compréhension des techniques utilisées. Je remercie le professeur Marie Geneviève Dijoux-Franca et le docteur Serge Michalet pour les discussions et les collaborations enrichissantes.

Je remercie mes amis : Sarah pour le soutien dans les deux premières années de thèse, pour l'écoute dans les moments plus difficiles (quand on se cachait en salle TP), Alexandre B de m'avoir « écouté », pour la bonne ambiance dans le L2 et pour ton humour souvent nécessaire pour surmonter la journée, Alexandre A pour m'avoir aidée dans les deux dernières années, pour avoir partagé avec moi les difficultés des quinoléines....Merci les enfants pour ces trois ans, ça n'aurait pas été pareil sans vous...

Merci à tous mes amis que j'ai rencontré dans les dernières années en particulier à toute ma famille lyonnaise : mes colocs Myriam et Mariana et la « troisième coloc » Alix pour les soirées, les repas, les discussions et les bons moments ici à Lyon. Carla, Carmen et Moitza per tutti i bei momenti che abbiamo passato insieme, per le nostre serate tranquille, per i lunghi sfoghi e discussioni.

Un MERCI très particulier pour deux personnes, surtout ces 9 dernières mois : Ilaria e Giacomo...Merci pour les longues journées de rédaction, pour tout le soutien et l'écoute dans ces moments difficiles. E stata lunga quest'avventura, finalmente è finita ma non ci sarei arrivata senza voi due. Grazie per tutti i momenti passati insieme e per aver reso questi tre anni indimenticabili...nel bene e nel male.....

Infine, ringrazio Pippo e Benni, Rosa e Maria per la pazienza, per avermi appoggiato nelle mie scelte e per avermi sopportato. È stato difficile ma ce l'abbiamo fatta.

Table des matières

<i>Liste des abreviations</i>	8
<i>Liste des composés</i>	11
<i>Introduction générale</i>	13
Chapitre 1. Contexte Biologique	19
1. LA MUCOVISCIDOSE	19
1.1. Épidémiologie	19
1.2. Mutations du gène CFTR	19
1.2.1. Les différentes mutations	20
1.2.2. La protéine CFTR	22
1.2.3. La physiopathologie de la mucoviscidose	24
1.3. Les symptômes de la mucoviscidose	25
1.3.1. Au niveau des poumons.....	27
1.4. Les traitements	28
1.5. Diagnostic de la mucoviscidose	29
2. LE MICROBIOTE PULMONAIRE MUCOVISCIDOSE	29
2.1. Microbiote pulmonaire sain vs microbiote MV.....	29
2.2. Facteurs influençant le microbiote	31
2.2.1. Environnement pulmonaire	32
2.2.2. Hôte.....	32
2.2.2.1. Génotype/phénotype	32
2.2.2.2. Age.....	33
2.2.3. Antibiotiques	35
2.2.4. Interactions microbiennes.....	36
2.2.4.1. Interactions <i>P. aeruginosa</i> et microorganismes	37
2.2.4.2. Interactions <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>	39
2.2.4.2.1. Interactions antagonistes	40
2.2.4.2.2. Interactions agonistes	45
3. SYSTEME PSEUDOMONAS QUINOLONE SIGNAL	50
3.1. Biosynthèse de molécules 2-alkyl-4-hydroxyquinolèines.....	51
Le récepteur des 2-alkyl-4-hydroxyquinolèines.....	56
4. CONCLUSIONS	57
Chapitre 2. MOLECULES AQs : données bibliographiques	60
1. LE NOYAU QUINOLEINE	60

2.	LES 4-HYDROXYQUINOLEINES	63
2.1.	Structure	63
2.2.	La tautomérie	65
2.3.	Synthèses des 4-hydroxyquinoléines.....	74
2.4.	Activités biologiques.....	76
3.	2-ALKYL-4-HYDROXYQUINOLEINES	79
3.1.	Synthèse et extraction	79
3.2.	Activités biologiques des molécules 2-alkyl-4-hydroxyquinoléines	90
3.2.1.	Activités anti-Pa.....	91
3.2.2.	Activités anti-Sa	92
3.2.3.	Activités diverses	97
<i>Chapitre 3. SYNTHÈSES DES COMPOSÉS DE TYPE AQs : Travaux personnels</i>		<i>101</i>
1.	STRATÉGIE DE SYNTHÈSE	101
2.	SYNTHÈSE DES 2-(HALOGÉNOMÉTHYL)-4-HYDROXYQUINOLÉINES	103
2.1.	Utilisation de la cyclisation de Conrad-Limpach (VOIE A).....	104
2.2.	Utilisation de la bromation radicalaire (VOIE B)	107
2.3.	Utilisation de la chloration par SOCl ₂ (VOIE C).....	108
2.3.1.	Estérification de l'acide kynurénique	109
2.3.2.	Réduction de l'ester en alcool	110
2.3.3.	Chloration de l'alcool	110
3.	SYNTHÈSE DES ESTERS BORONIQUES	111
4.	SYNTHÈSE DES COMPOSÉS Δ^n -AQ-C _n	118
4.1.	Couplage de Suzuki-Miyaura : données bibliographiques.....	119
4.2.	Couplage de Suzuki : travaux personnels.....	121
5.	SYNTHÈSE DE COMPOSÉS AQ-C _n	128
5.1.	Essai d'alkylation de la 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine.....	128
5.2.	Hydrogénation catalytique de Δ^2 -AQ-C _n	129
6.	SYNTHÈSE DES COMPOSÉS Δ^2 -AQNO-C _n	131
7.	CONCLUSIONS	145
<i>Chapitre 4. Évaluations biologiques des composés synthétisés de type AQ.....</i>		<i>147</i>
1.	CRIBLAGE DES MOLÉCULES ET IDENTIFICATION DES COMPOSÉS PRÉSENTANT UNE ACTIVITÉ INHIBITRICE	147
2.	DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE	148
3.	IDENTIFICATION DES PARTICULARITÉS CHIMIQUES FAVORISANT L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES COMPOSÉS	150

4. PROPOSITION DU MÉCANISME D'ACTION.....	151
5. CONCLUSIONS	154
<i>Conclusion et perspectives</i>	157
<i>Experimental Section</i>	165
Experimental chemical section	165
General information	165
General procedures	166
General procedure A: Conrad-Limpach cyclization:.....	166
General procedure B: Suzuki-Miyaura coupling (Δ^2 -AQ-C _n (1a-h)):	166
General procedure C: catalytic hydrogenation (AQ-C _n (2a-h)):	166
General procedure D: N-oxydation (Δ^2 -AQNO-C _n (3a-c)):	167
General procedure E: Synthesis of Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)	167
General procedure F: MCPBA purification:	168
General procedure G: MCPBA titration :.....	168
Experimental biological section	216
<i>ANNEXE</i>	219

Liste des abreviations

2-ABA : 2-aminobenzoylacetate

4-HQ : 4-hydroxyquinoléine

ABC : Transporteurs ATP binding Cassette

AcOEt : Acétate d'éthyle

AcOH : Acide acétique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AHL : N-Acyl homoserine lactones

AiBN : Azobisisobutyronitrile

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AQ : 2-alkyl-4-hydroxyquinoléine

AQNO : 2-alkyl-4-hydroxyquinoléine-N-oxyde

ASL : Surface des voies aériennes

ATP : Adénosine triphosphate

BCC : *Burkholderia* du complexe *cepacia*

BPOE : Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement

CCM : Chromatographie sur couche mince

CESN : Centre d'Etude des Substances Naturelles

CFTR : Cystic Fibrosis Trans membrane conductance Regulator

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DCM : Dichlorométhane

DHQ : 2,4-dihydroxyquinoléine

DMAP : 4-(diméthylamino)pyridine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ENaC : Canal sodique épithelial

FT-IR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

GC-MS : Chromatographie sur phase gaseuse couplée avec spectrometrie de masse

HEMATITE : impact of **HE**terobicyclic **M**olecules in the **Antagonist inT**eractions
Pseudomonas aeruginosa – *STaphylococcus aurEus*

HHQ : 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

HQ : hydroxyquinoléine

HQNO : 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine N-oxyde

IR : infra-rouge

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry.

LC-HRMS : chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie
de masse haute-résolution

MCPBA : Acide métachloroperbenzoïque

MH : milieu Mueller-Hinton

MO : Microondes

Mp : Melting point

MSD : Domaines intermembranaires

MTBE : Méthyl tert-butyl éther

MV : Mucoviscidose

NBD : Domaines de liaison de l'ATP de CFTR

NBS : *N*-bromosuccinimide

NMM : *N*-méthylmorpholine

NQNO : 2-nonyl-4-hydroxyquinoléine N-oxyde

ORL: Oto-rhino-laryngologie

Pa : *Pseudomonas aeruginosa*

PPA : Acide poly-phosphorique

PPLAI : Souche de primo-colonisation

PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal

QS : Quorum sensing

rhDNase : recombinant human deoxyribonuclease I

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RV : Rhinovirus

RX : Rayonnement X

Sa : *Staphylococcus aureus*

SCVs : Small Colony Variants

SM : couplage de Suzuki-Miyaura

SOID : Syndrome obstruction intestinale distale

SPE : Extractions en phase solide

TEA : Triéthylamine

THF : Tétrahydrofurane

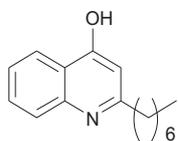
TMSI : Triméthylsilyl iodide

UV-Vis : Spectroscopie ultraviolet-visible

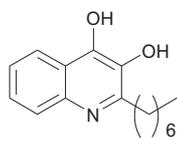
VRS : Virus respiratoire syncytial

WGS : Whole Genoma Sequencing

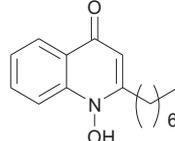
Liste des composés



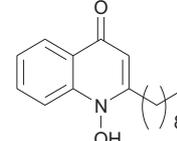
HHQ (I)



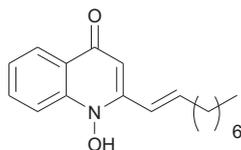
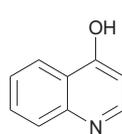
PQS (II)



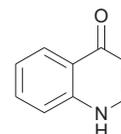
HQNO (III)



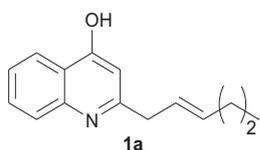
NQNO (IV)

 Δ^1 -NQNO (LXXIX)

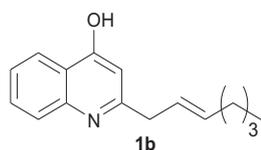
XXI



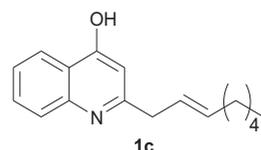
XXIV



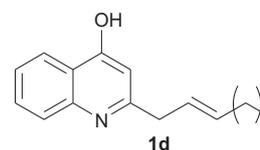
1a



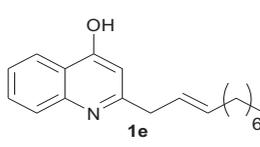
1b



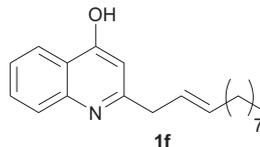
1c



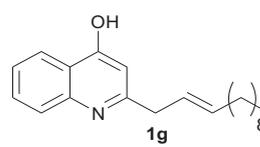
1d



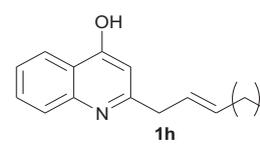
1e



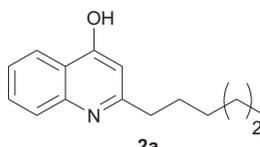
1f



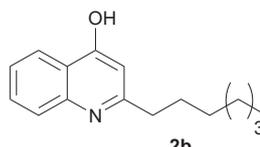
1g



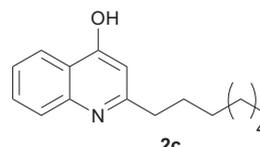
1h



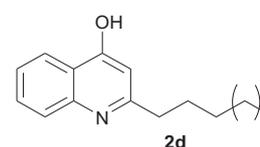
2a



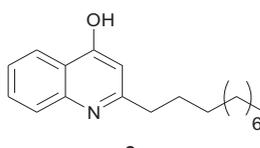
2b



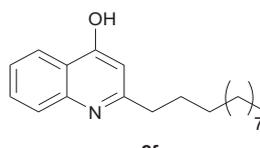
2c



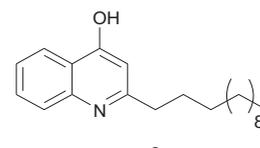
2d



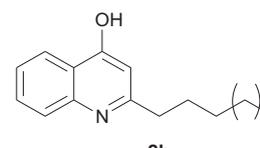
2e



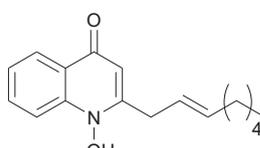
2f



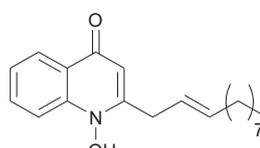
2g



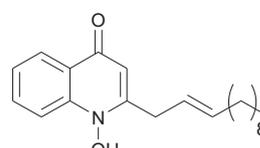
2h



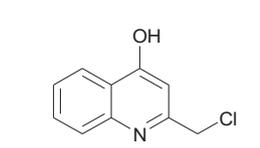
3a



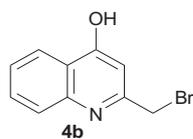
3b



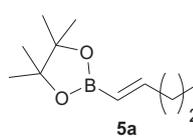
3c



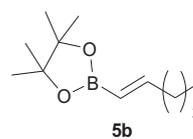
4 a



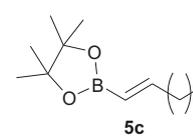
4b



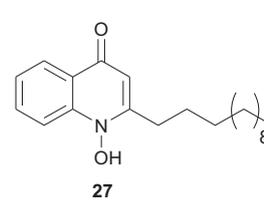
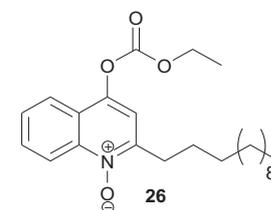
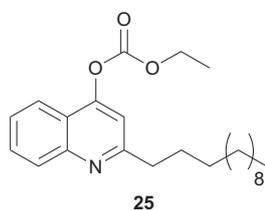
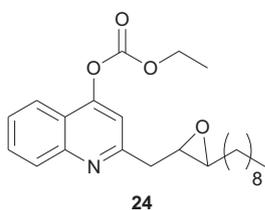
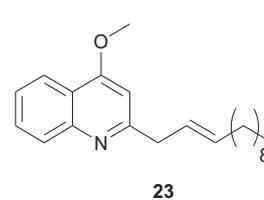
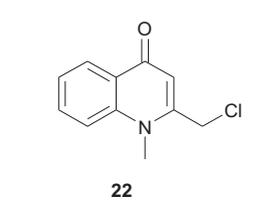
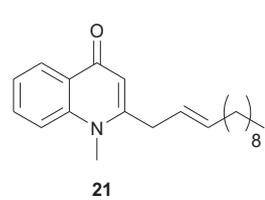
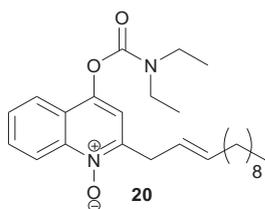
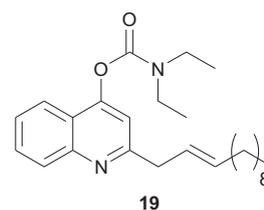
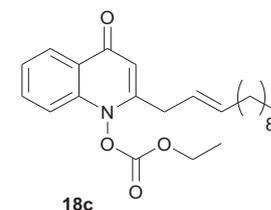
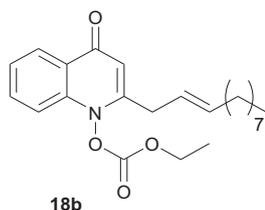
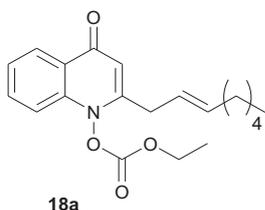
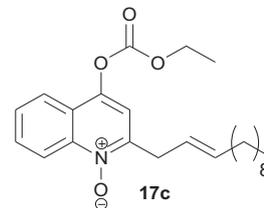
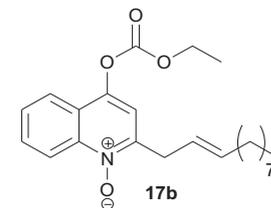
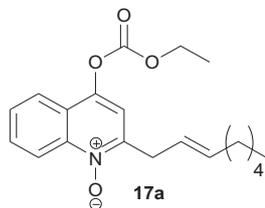
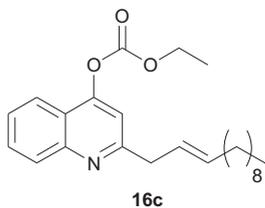
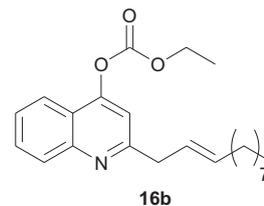
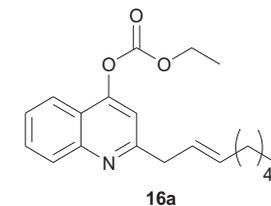
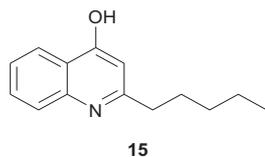
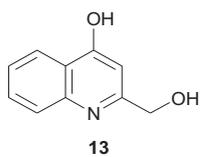
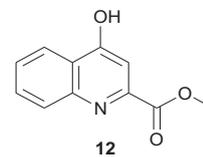
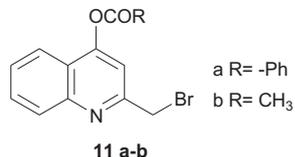
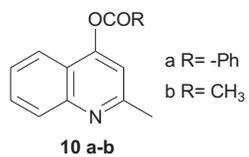
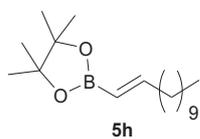
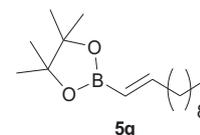
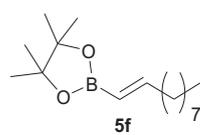
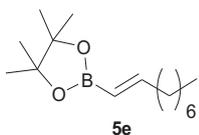
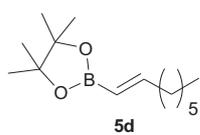
5a



5b



5c



Introduction générale

La mucoviscidose (MV), aussi appelée « fibrose kystique » dans les pays anglo-saxons, est une maladie génétique rare, qui est la conséquence de mutations affectant le gène CFTR. Ce gène code un transporteur des ions chlorures, appelé CFTR pour Cystic Fibrosis Trans membrane conductance Regulator. En cas de mutation, un défaut de transport d'ions et d'eau est observé à la surface apicale de nombreuses cellules, entraînant l'atteinte de plusieurs organes dont les voies respiratoires et digestives.

La symptomatologie plus importante concerne les poumons où l'altération des échanges ioniques engendre des conditions environnementales favorables à l'installation de pathogènes et à l'apparition d'infections respiratoires. Parmi ces pathogènes, nos travaux se sont portés sur *Pseudomonas aeruginosa* (**Pa**), bactérie hautement redoutée dans le cadre de la MV en raison de ses conséquences dramatiques en termes de morbidité et mortalité.

Compte tenu des conséquences néfastes de ces pneumopathies à **Pa**, une meilleure connaissance des paramètres permettant ces infections est primordiale pour une prise en charge optimale des patients MV. Le développement de ces atteintes respiratoires repose notamment sur l'implantation de **Pa** dans les poumons déjà envahis par d'autres micro-organismes, dont le pathogène *Staphylococcus aureus* (**Sa**). Cette implantation va être suivie d'une colonisation durable de cette niche par **Pa**. La compréhension des interactions entre **Pa** et les autres bactéries du microbiote pulmonaire des patients MV est, de ce fait, cruciale pour expliquer la physiopathologie des pneumopathies dues à **Pa**.

Chez les patients MV, **Sa** représente le pathogène initial colonisant les poumons pendant l'enfance, tandis que **Pa** est prédominant chez les adolescents et les adultes (Registre Français de La Mucoviscidose 2017)¹. La succession entre ces deux pathogènes pourrait s'inscrire dans ces phénomènes d'interactions liés à l'implantation de **Pa** au niveau pulmonaire. Différentes études ont été réalisées pour comprendre ces relations **Pa-Sa** mais les mécanismes impliqués restent encore complexes². Ils pourraient être expliqués par

¹ Registre Français de La Mucoviscidose - Bilan Des Données. 2017.

² Pernet, E.; Guillemot, L.; Burgel, P. R.; Martin, C.; Lambeau, G.; Sermet-Gaudelus, I.; Sands, D.; Leduc, D.; Morand, P. C.; Jeammet, L.; et al. *Pseudomonas Aeruginosa Eradicates Staphylococcus Aureus by Manipulating the Host Immunity. Nat. Commun.* **2014**, *5*.

plusieurs mécanismes y compris des régulations fonctionnelles entre ces deux bactéries. Ils seraient également liés à la production et à la sécrétion dans l'environnement de molécules par un micro-organisme et perçues par un second.

Suite à ces observations, un projet multidisciplinaire, portant le nom d'**HEMATITE** (pour « impact of **HE**terobicyclic **M**olecules in the **A**ntagonist in**T**eractions **P**seudomonas aeruginosa – **S**Taphylococcus aur**E**us ») a été mis en place. Ce projet soutenu par les associations Vaincre la Mucoviscidose et Grégory Lemarchal regroupe des chimistes, des microbiologistes et des médecins.

L'hypothèse initiale du projet HEMATITE a été la suivante : ***Pa* émettrait dans l'environnement pulmonaire des molécules capables d'interagir négativement avec *Sa*, en empêchant son développement et/ou en détruisant cette bactérie. Ces molécules permettraient donc à *Pa* de remplacer *Sa* (et vraisemblablement d'autres pathogènes) dans les poumons afin d'y engendrer une infection.**

Dans le cadre de ce projet **HEMATITE**, des premiers travaux de mises en compétition entre des souches de ***Pa*** et ***Sa*** ont été réalisées par l'équipe BPOE (Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement, C. Commun et Dr A. Doléans-Jordheim). Toutes les bactéries utilisées ont été isolées d'expectorations de patients MV et les techniques de mise en compétition ont été effectuées par co-culture sur milieux solides³.

Suite à ces premières expérimentations, des souches de ***Pa*** ont été identifiées comme inhibitrices de la croissance de ***Sa***. Les surnageants de culture de ces mêmes souches, dénués de bactéries, se sont révélés eux aussi inhibiteurs de ***Sa***, suggérant une production par ***Pa*** de molécules diffusibles permettant cette activité inhibitrice.

Afin d'identifier les molécules actives dans ces surnageants, une souche de ***Pa*** ayant une activité inhibitrice sur ***Sa*** a été sélectionnée (souche de primo-colonisation PPLAI). Le choix d'une étude par métabolomique et fractionnement bioguidé a été retenu et une collaboration est née entre l'équipe BPOE et les chimistes de l'équipe « Multi-résistance et efflux bactérien » de l'UMR 5557 Ecologie Microbienne qui sont notamment rattachés à la plateforme « **Centre d'Etude des Substances Naturelles** » - CESN- (Pr MG Dijoux-Franca; Dr S

³ Baldan, R.; Cigana, C.; Testa, F.; Bianconi, I.; De Simone, M.; Pellin, D.; Di Serio, C.; Bragonzi, A.; Cirillo, D. M. Adaptation of Pseudomonas Aeruginosa in Cystic Fibrosis Airways Influences Virulence of Staphylococcus Aureus in Vitro and Murine Models of Co-Infection. *PLoS One* **2014**, 9 (3).

Michalet). A partir des surnageants d'une culture en milieu liquide de PPLAI, une extraction liquide/liquide *via* différents solvants de polarités diverses ainsi que des extractions en phase solide (SPE) ont été conduites. Un suivi des fractions contenant l'activité inhibitrice a été effectué *via* leur confrontation avec des cultures bactériennes de *Sa*. Des fractions ayant une activité contre *Sa* ont ainsi été mises en évidence. Une analyse par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute-résolution (LC-HRMS) de ces fractions a permis d'y mettre en évidence des molécules de type **2-alkyl-4-hydroxyquinoléines** (Figure A). Nous avons alors émis l'hypothèse que certaines de ces molécules hétérocycliques sont responsables de l'activité inhibitrice de *Pa* sur *Sa*.

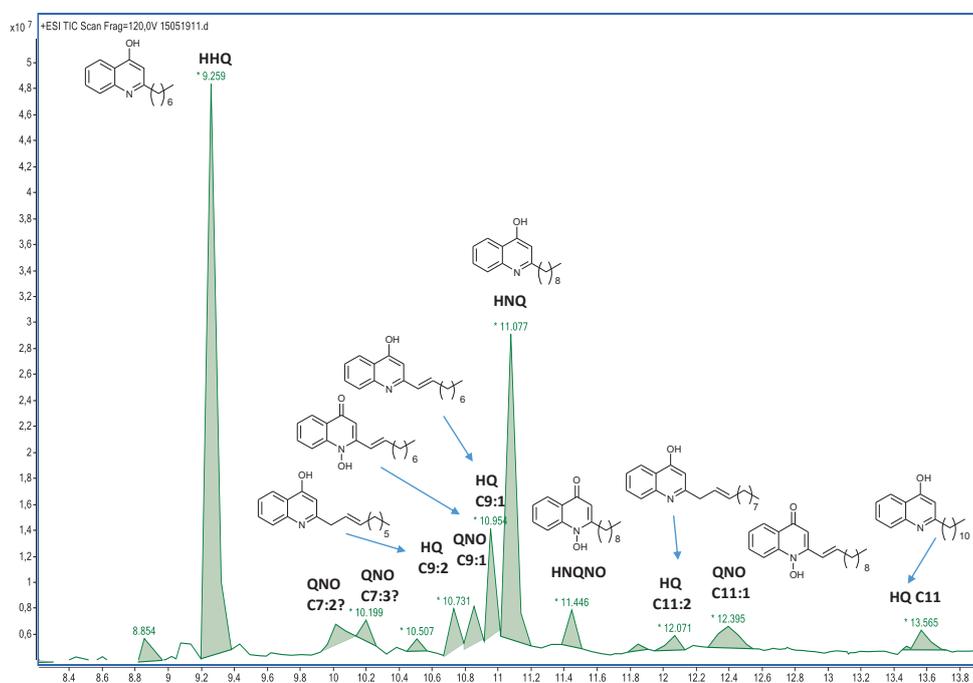


Figure A. Spectre de LC-HRMS représentant quelques exemples des molécules issues du métabolisme de *Pa*.

Parmi les structures des familles identifiées, certaines molécules sont décrites dans la littérature comme issues du métabolisme de *Pa* (AQ-C_n), alors que d'autres n'ont jamais été rapportées. Les molécules Δ^2 -AQ-C_n et Δ^2 -AQNO-C_n (avec une insaturation non conjuguée sur la chaîne alkyle en position 2) font partie de ces nouvelles structures (Figure B).

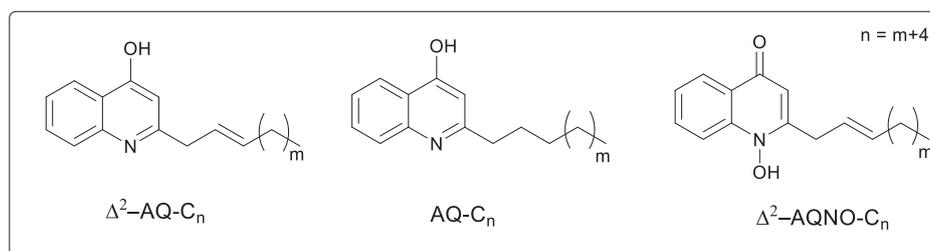


Figure B. Structures de trois classes identifiées suite aux analyses métabolomiques.

Les quantités obtenues par extraction des fractions étant insuffisantes pour permettre la séparation des molécules contenues dans les fractions actives, une synthèse organique des composés $\Delta^2\text{-AQ-C}_n$, AQ-C_n , et $\Delta^2\text{-AQNO-C}_n$ s'est révélée nécessaire afin d'une part de confirmer leurs structures exactes et d'autre part de caractériser leur activité sur *Sa*. C'est dans ce cadre que mon projet et mes travaux de thèse s'inscrivent.

Les objectifs que nous avons fixés pour ce projet de thèse consistent i) en la synthèse de composés appartenant aux 3 familles dérivées de la 4-hydroxyquinoléine ($\Delta^2\text{-AQ-C}_n$, AQ-C_n , et $\Delta^2\text{-AQNO-C}_n$) identifiées pendant les travaux préliminaires ii) en l'évaluation biologique des molécules synthétisées et iii) en une étude des relations structure-activité.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons mis en place une stratégie de synthèse polyvalente, nous permettant une grande flexibilité sur la longueur de la chaîne alkyle en position 2. L'activité de chaque molécule synthétisée ayant été évaluée sur des souches bactériennes de *Sa*, les résultats obtenus nous ont permis d'orienter les synthèses afin d'étudier les relations entre la structure et l'activité des composés synthétisés.

Ce manuscrit est constitué de 4 chapitres :

- Le **chapitre I** de ce mémoire présente le contexte biologique du projet de thèse. Nous avons introduit la mucoviscidose et les conséquences de cette pathologie chez les jeunes patients. Nous avons par la suite décrit un aperçu des interactions qui se développent au niveau pulmonaire entre **Pa** et les autres espèces, en prenant pour exemples les interactions agonistes et antagonistes **Pa/Sa**.
- Le **chapitre II** rassemble les données bibliographiques sur les molécules dérivées de la 4-hydroxyquinoléine et sur les 2-alkyl-4-hydroxyquinoléines. Nous avons décrit leur structure, leur synthèse et leur activité biologique. Une partie importante de ce chapitre est dédiée à l'équilibre tautomérique qui caractérise ces composés.
- Le **chapitre III** présente l'ensemble des synthèses des molécules de trois familles (Δ^2 -AQ-C_n, AQ-C_n, et Δ^2 -AQNO-C_n), réalisées au cours de ma thèse. Dans ce chapitre nous présentons aussi une nouvelle méthode de synthèse des alkenylboronates.
- Le **chapitre IV** décrit les résultats biologiques des molécules synthétisées sur des cultures bactériennes de **Sa**. Une analyse sur la relation structure-activité a également été conduite.

Dans la dernière partie de ce mémoire sont présentées une **synthèse** de nos travaux ainsi que les **perspectives** qui en découlent, ainsi que les **méthodologies expérimentales** (modes opératoires et protocoles des réactions, descriptions de RMN des composés synthétisés).

Chapitre 1.
Contexte Biologique

Chapitre 1. Contexte Biologique

1. LA MUCOVISCIDOSE

1.1. Épidémiologie

La mucoviscidose (MV) est une maladie génétique autosomique récessive touchant plusieurs organes. C'est la maladie génétique rare la plus fréquente chez les caucasiens⁴. Son incidence en Europe est de 1 patient sur 2500 naissances. En Amérique du Nord, cette incidence est de 1 sur 3500 naissances⁵.

En 2017, le Registre Français de la Mucoviscidose a recensé 7114 patients suivis en France. Dans ce pays, le pourcentage de patients adultes (55,9 %) est à présent supérieur à celui des enfants (44,1 %), ce qui indique une diminution de la mortalité infantile¹. En 2016, le « Registro Italiano Fibrosi Cistica » a recensé 5362 patients suivis en Italie avec un pourcentage de patients adultes de 56,7 %⁶.

Concernant les patients hétérozygotes, non atteints mais pouvant transmettre la maladie à leur descendance, leur incidence chez les européens représente 4 % de la population⁵.

1.2. Mutations du gène CFTR

La MV est une conséquence de mutations génétiques touchant le gène CFTR, constitué de 27 exons et localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2). Ce gène code un

¹ Registre Français de La Mucoviscidose - Bilan Des Données. 2017.

⁴ Rafeeq, M. M.; Murad, H. A. S. Cystic Fibrosis: Current Therapeutic Targets and Future Approaches. *J. Transl. Med.* **2017**, *15* (1), 1–9.

⁵ Bobadilla, J. L.; Macek, M.; Fine, J. P.; Farrell, P. M. Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations - Correlation with Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation.* **2002**, 575–606.

⁶ Giordani, B.; Amato, A.; Majo, F.; Ferrari, G.; Quattrucci, S.; Minicucci, L.; Padoan, R.; Florida, G.; Salvatore, D.; Carnovale, V.; et al. Registro Italiano Fibrosi Cistica (RIFC) Epidemiologia & Prevenzione. **2019**.

transporteur transmembranaire, appelé CFTR (Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Regulator), qui est un canal ionique.

1.2.1. Les différentes mutations

On dénombre à l'heure actuelle plus de 2000 mutations pouvant engendrer la MV. La plus fréquente est la mutation $\Delta F508$, correspondant à une délétion d'une phénylalanine en position 508⁷. Les mutations sont regroupées en 7 classes en fonction de leur impact sur la production et la fonction de la protéine CFTR (Figure 1.1).

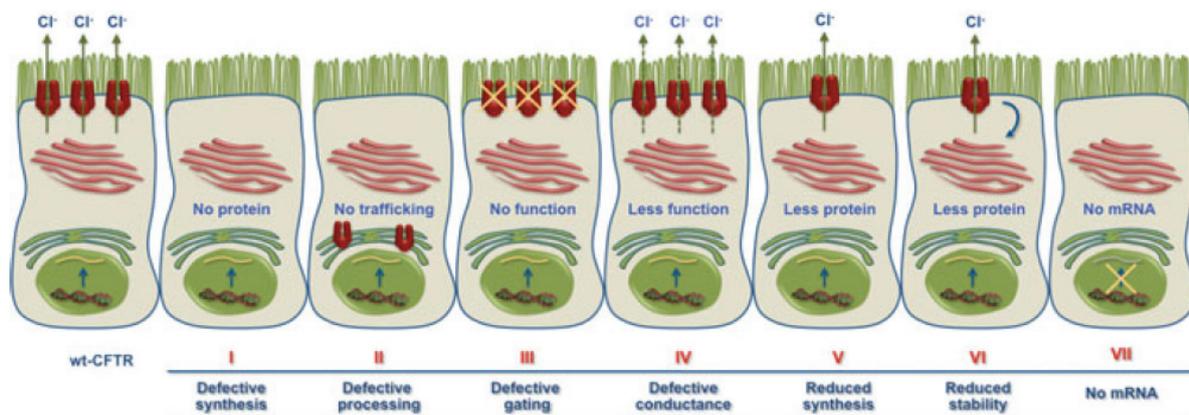


Figure 1.1 Les sept classes de mutations du gène CFTR⁸.

Classe I

Cette classe regroupe les mutations de type insertions ou délétions de nucléotides ou encore les mutations non-sens. Les conséquences de ces mutations peuvent être d'une part, la production d'un ARNm instable entraînant l'absence de production d'une protéine CFTR ou d'autre part, la production de protéines CFTR aberrantes ou tronquées. Ces dernières sont instables et sont rapidement dégradées. On considère que 2,4 % des patients MV sont porteurs de mutations de cette classe.

⁷ Bhagirath, A. Y.; Li, Y.; Somayajula, D.; Dadashi, M.; Badr, S.; Duan, K. Cystic Fibrosis Lung Environment and Pseudomonas Aeruginosa Infection. *BMC Pulm. Med.* **2016**, *16* (1), 1–22.

⁸ Farinha, C.M. CFTR and Cystic Fibrosis. In: *CFTR and Cystic Fibrosis*. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Cham **2018**, 1-56

Classe II

Cette classe correspond à la classe des mutations par délétion, dont celle engendrant une délétion d'une phénylalanine en position 508 (67 % de patients homozygotes). La protéine qui en dérive présente une conformation incorrecte. Elle est reconnue comme aberrante et donc éliminée par les cellules. Les autres mutations de cette classe sont liées à un défaut de maturation de la protéine CFTR au niveau de l'appareil de Golgi. Ces protéines ne sont pas transportées au niveau apical de la cellule.

Classe III

Cette classe concerne les mutations qui perturbent les fonctions de la protéine CFTR, à savoir le transport d'ions Cl⁻ et l'ouverture ou la fermeture du canal ionique. Ces mutations sont impliquées dans le dysfonctionnement de l'interaction entre un domaine de liaison (NBD) et sa cible qui est l'ATP (Figure 1.2 a). On estime que 1,6 % des patients portent une mutation appartenant à cette classe.

Classe IV

Cette classe regroupe les mutations impliquées dans la diminution du flux de Cl⁻ causée par une diminution de l'ouverture du canal ionique. Ce flux est réduit d'un tiers par rapport à la protéine non mutée. Les mutations concernent le domaine transmembranaire de la protéine CFTR⁹.

Classe V

Cette classe représente la classe des mutations qui engendrent une diminution de la synthèse de la protéine CFTR. L'activité du canal est maintenue mais le nombre de transporteurs en surface est réduit.

Classe VI

Cette classe est la plus récemment décrite. Elle regroupe les mutations qui engendrent une réduction de la demi-vie de la protéine causée par l'instabilité de la protéine même¹⁰.

⁹ Welsh, M. J.; Smith, A. E. Molecular Mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Cell* **1993**, *73*, 1251–1254.

¹⁰ Quintana-Gallego, E.; Delgado-Pecellín, I.; Calero Acuña, C. CFTR Protein Repair Therapy in Cystic Fibrosis. *Arch. Bronconeumol.* **2014**, *50* (4), 146–150.

Classe VII

Cette classe comprend les mutations qui déterminent une absence totale de production d'ARNm. Ces mutations pourraient être incluses dans la première classe mais la création de la classe VII a été réalisée car les mutations qu'elle regroupe ne répondent à aucun traitement pharmacologique⁸.

1.2.2. La protéine CFTR

Le transporteur CFTR est une protéine composée de 12 hélices transmembranaires et partagée en deux domaines transmembranaires et deux domaines de liaison de l'ATP (Figure 1.2). Comme vu précédemment, le CFTR est un canal ionique permettant le transport des ions chlorure au niveau des épithéliums glandulaires. Cette protéine, retrouvée dans la membrane apicale des cellules de plusieurs organes (poumons, pancréas, foie), est un transporteur dont l'activité est en lien avec l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). Elle fait partie de la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Ce transporteur CFTR est impliqué dans la régulation ionique du sodium, potassium, chlorure, sodium bicarbonate et des aquaporines¹¹.

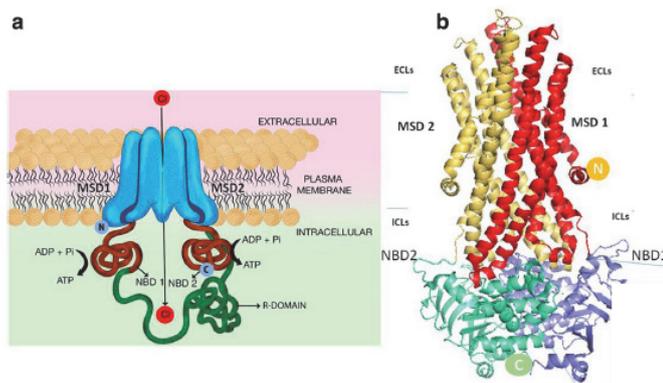


Figure 1.2 Représentations du transporteur CFTR (a) Représentation montrant les deux domaines intermembranaires (MSD) et les deux domaines de liaison de l'ATP de CFTR (NBD) ; (b) Modélisation de la protéine en trois dimensions¹¹.

⁸ Farinha, C.M. CFTR and Cystic Fibrosis. In: *CFTR and Cystic Fibrosis*. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Cham **2018**, 1-56

¹¹ Schmidt, B. Z.; Haaf, J. B.; Leal, T.; Noel, S. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators in Cystic Fibrosis: Current Perspectives. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **2016**, *8*, 127–140.

Au niveau pulmonaire, à l'état physiologique, les cellules épithéliales secrètent les ions chlorures *via* différents canaux situés au niveau de la membrane apicale dont le canal CFTR (Figure 1.3). Cette sortie d'ions engendre une sortie d'eau par osmose et de ce fait, une hydratation du mucus situé à la surface des cellules. Une bonne fluidité permet aux cils vibratiles, également situés à la surface des cellules, de battre correctement. Ces battements permettent un « escalator » mucociliaire. Le mucus piège les particules/pathogènes inhalés et le mouvement des cils fait remonter ce mucus dans les voies aériennes supérieures, facilitant leur élimination. Une bonne clairance mucociliaire garantit un environnement pulmonaire pauvre en poussières et microorganismes⁸.

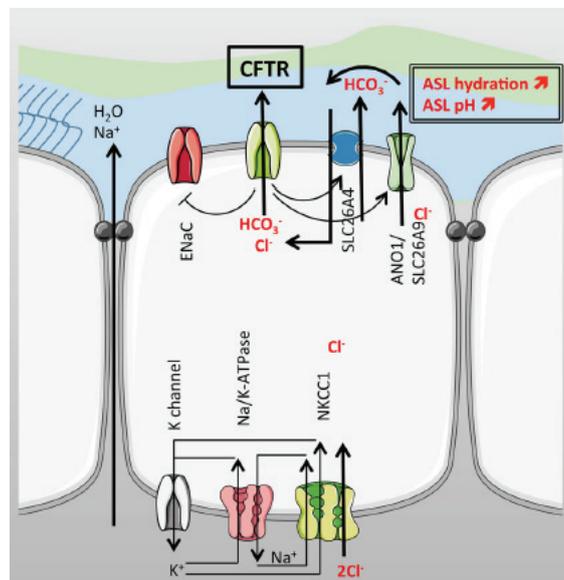


Figure 1.3 Transports ioniques en conditions physiologiques au niveau épithélial des voies aériennes. Sur le côté apical, le transporteur CFTR favorise la sécrétion de Cl^- et de HCO_3^- . Il inhibe le canal ENaC afin de favoriser l'absorption de Na^+ . Ce système de régulation engendre une augmentation de l'hydratation et du pH du liquide de surface des voies aériennes (ASL)¹².

Une relation entre le transporteur CFTR et d'autres canaux, dont le canal épithélial à sodium (ENaC), a également été retrouvée. En effet, il semble que CFTR régule l'activité et la stabilité de ENaC même si les mécanismes ne sont pas encore clairs¹¹.

⁸ Farinha, C.M. CFTR and Cystic Fibrosis. In: *CFTR and Cystic Fibrosis*. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Cham **2018**, 1-56

¹² Saint-Criq, V.; Gray, M. A. Role of CFTR in Epithelial Physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, 74 (1), 93–115.

1.2.3. La physiopathologie de la mucoviscidose

Lors de la MV, suite à la présence de deux allèles mutés du gène CFTR, la fonction du transporteur est altérée et la régulation de la clairance mucociliaire est modifiée (Figure 1.4). Au niveau pulmonaire, les conséquences de ces mutations génétiques sont une diminution du flux de Cl^- vers le mucus (Figure 1.4 – 3). Cette diminution de Cl^- s'accompagne d'une augmentation de l'absorption de Na^+ et d'une baisse de la quantité en eau dans le mucus. Cette réduction d'eau entraîne une augmentation de la viscosité du mucus (mucus visqueux = *muco viscidose*). Ce phénomène perturbe l'activité des cils permettant la clairance mucociliaire (Figure 1.4 – 4 et 5). L'augmentation de la viscosité entraîne la diminution de la clairance et donc une élimination réduite des agents externes, parmi lesquels se trouvent les agents infectieux. L'environnement créé est alors favorable à l'implantation de pathogènes. De plus, une forte réponse immunitaire, souvent inefficace, se développe (Figure 1.4 – 6 et 7).

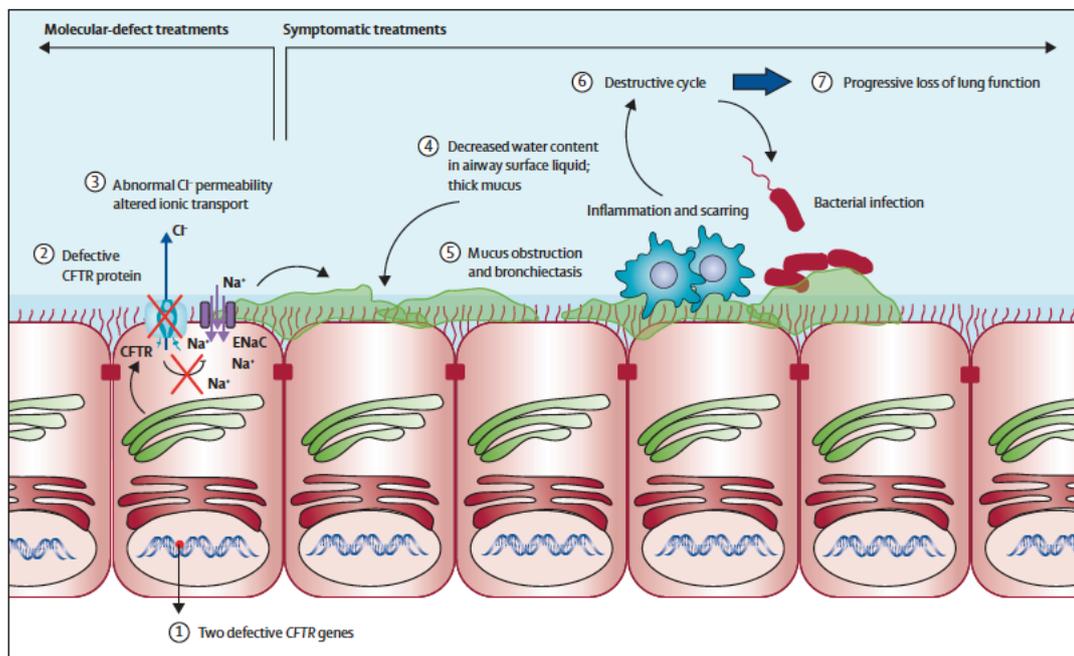


Figure 1.4 Cascade des événements associés au dysfonctionnement de la protéine CFTR et engendrant le développement de bronchopneumopathies sévères¹³.

¹³ De Boeck, K.; Amaral, M. D. Progress in Therapies for Cystic Fibrosis. *Lancet Respir. Med.* **2016**, *4* (8), 662–674.

1.3. Les symptômes de la mucoviscidose

Les symptômes de la MV les plus connus sont ceux décrits au niveau pulmonaire. Il est cependant très fréquent de retrouver d'autres manifestations, notamment au niveau pancréatique et au niveau hépatique (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Pathologies et symptômes (hors poumons) retrouvés dans la MV

Organe	Pathologies et Symptômes
Pancréas¹⁴	Pancréatites aiguës ou chroniques Diminution de la sécrétion des enzymes (lipase et trypsine) Malabsorption des graisses et stéatorrhée Diarrhée chronique Fibrose kystique Diabète par sécrétion anormale d'insuline
Appareil digestif¹⁴	Reflux gastro-œsophagiens Troubles nutritionnels Ulcère peptique et duodénites Iléus Méconial Occlusion intestinale Syndrome obstruction intestinale distale (SOID) Prolapsus rectal
Foie¹⁴	Sécrétion d'une bile épaisse Cirrhose biliaire Ictère rétionnel néonatal Hypertension portale Insuffisance hepato cellulaire
Appareil reproducteur¹⁵	<u>Femme</u> : hypofertilité par réduction du contenu en eau du mucus cervical <u>Homme</u> : stérilité par atrésie des canaux déférents
Autre	Sinusite chronique et polypose nasale ¹⁶ Cardiomyopathie et hypertension artérielle pulmonaire ¹⁷ Hyponatrémie, hypochlorémie, alcalose métabolique ¹⁸ Retard de croissance Problèmes psychologiques

¹⁴ Kelly, T.; Buxbaum, J. Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *12* (1), 43–47.

¹⁵ Lyon, A.; Bilton, D. Fertility Issues in Cystic Fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* **2003**, *3* (2), 128–134.

¹⁶ Ramsey, B.; Richardson, M. A. Impact of Sinusitis in Cystic Fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1992**, *90*, 547–552.

¹⁷ Wiebicke, W.; Artlich, A.; Gerling, I. Myocardial Fibrosis - a Rare Complication in Patients with Cystic Fibrosis. *Eur. J. Pediatr.* **1993**, *152* (8), 694–696.

¹⁸ Ballesteros, Y.; Hernandez, M. I.; Rojo, P.; Manzaneros, J.; Nebreda, V.; Carbajosa, H.; Infante, E.; Baro, M. Hyponatremic Dehydration as a Presentation of Cystic Fibrosis. *Pediatr. Emerg. Care* **2006**, *22* (11), 725–727.

1.3.1. Au niveau des poumons

L'atteinte progressive de la fonction respiratoire est considérée comme la plus grande cause de morbidité et mortalité dans la MV⁸. Les poumons MV sont le cadre de bronchopneumopathies répétées¹⁹, responsables progressivement d'une défaillance respiratoire. La symptomatologie pulmonaire de la MV n'est pas spécifique. Les nouveau-nés présentent une toux rebelle et une respiration sifflante. Ces symptômes sont accentués par l'installation d'infections fongiques, bactériennes ou virales.

Des épisodes d'exacerbation viennent aggraver l'état clinique des patients. La définition et l'origine des exacerbations sont encore difficiles à identifier avec exactitude. Une exacerbation consiste en une augmentation de tous les signes cliniques. Les critères pour définir un état d'exacerbation ont été déterminés par Fuchs *et al.* (Tableau 1.2)²⁰.

Tableau 1.2. Critères caractérisant une exacerbation (selon Fuchs et al.²⁰).

<i>Augmentation de l'hémoptysie</i>
<i>Augmentation de la toux</i>
<i>Augmentation de la dyspnée</i>
<i>Fatigue ou léthargie</i>
<i>Douleur sinusale</i>
<i>Température supérieure à 38 °C</i>
<i>Changement de l'aspect des expectorations</i>
<i>Diminution du poids corporel et anorexie</i>
<i>Changement de l'aspect des écoulements du sinus</i>
<i>Modification de l'auscultation de la poitrine</i>
<i>Diminution de la fonction pulmonaire de 10 %</i>
<i>Signes d'infection pulmonaire à la radiographie</i>

⁸ Farinha, C.M. CFTR and Cystic Fibrosis. *In: CFTR and Cystic Fibrosis*. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Cham **2018**, 1-56

¹⁹ Saiman, L. Microbiology of Early CF Lung Disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **2004**, *5*, 367–369.

²⁰ Fuchs, H. J.; Christiansen, D. H.; Borowitz, D. S.; Nash, M. L.; Ramsey, B. W.; Smith, A. L.; Morris, E. M.; Rosenstein, B. J.; Wohl, M. E. Effect of Aerosolized Recombinant Human Dnase on Exacerbations of Respiratory Symptoms and on Pulmonary Function in Patients with Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331* (10), 637–642.

Les exacerbations respiratoires nécessitent parfois une hospitalisation et un traitement par voie intraveineuse.

1.4. Les traitements

Les traitements mis en place pour la MV sont des types symptomatiques. Aucun traitement curatif n'est encore disponible, malgré les divers travaux en cours (ex. thérapie génique). Les thérapies protéiques représentent à l'heure actuelle une voie prometteuse (utilisation de molécules palliant les défaillances du canal CFTR).

Pour l'atteinte respiratoire, le traitement consiste notamment en l'administration de mucolytiques. Un exemple de ces médicaments est la rhDNase (Pulmozyme®), enzyme recombinante humaine clivant l'ADN des composants du mucus et permettant de fluidifier celui-ci. L'effet attendu est, donc, de diminuer la viscosité du mucus. La clairance mucociliaire est ainsi améliorée²¹.

Le traitement avec le Pulmozyme® est associé à la kinésithérapie. Cette dernière permet d'améliorer l'état des bronches par évacuation de sécrétions bronchiques.

Un autre type de traitement largement utilisé chez les patients atteints de MV est l'antibiothérapie et les antifongiques. Ils visent à contrôler les infections microbiennes qui s'installent dans les poumons MV. L'administration de corticoïdes peut être parfois conseillée, pour une courte durée (<https://www.vaincrelamuco.org>).

Lorsque l'atteinte pulmonaire est caractérisée par une insuffisance respiratoire sévère, une greffe des poumons est recommandée. La greffe des organes permet de restaurer la fonction respiratoire et d'améliorer et prolonger la vie des patients atteints de MV (<https://www.cff.org>).

²¹ Henke, M. O.; Ratjen, F. Mucolytics in Cystic Fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* **2007**, *8* (1), 24–29.

1.5. Diagnostic de la mucoviscidose

En France depuis 2002, le diagnostic de la MV est réalisé avec un dépistage néonatal à trois jours de la naissance des nouveau-nés. Le dépistage consiste dans le dosage de la trypsine immuno-réactive (TIR), proenzyme sécrétée par le pancréas²². Des valeurs supérieures à 60 µg/L indiquent une anomalie et des tests de génotypage sont réalisés. Le génotypage de l'ADN permet d'identifier les mutations sur le gène CFTR.

Le diagnostic de la MV est complété par le test de la sueur réalisé quelques mois après la naissance²³. Ce test permet de mesurer la quantité d'ions chlorure contenue dans la sueur. La méthode consiste en la stimulation de la production de sueur par le patient, la récolte de cette sueur et le dosage des ions chlorures. Si la concentration de Cl⁻ est supérieure à 60 mmol/L, le test est considéré positif et donc en faveur du diagnostic de MV.

Une autre méthode repose sur la mesure de la différence de potentiel de l'épithélium nasal. Elle permet d'étudier les flux ioniques transépithéliaux²⁴. Chez les patients MV, la différence de potentiel est plus élevée par rapport aux patients sains, reflétant une augmentation de l'absorption de Na⁺.

2. LE MICROBIOTE PULMONAIRE MUCOVISCIDOSE

2.1. Microbiote pulmonaire sain vs microbiote MV

Longtemps, l'arbre pulmonaire a été considéré comme stérile. Cependant, au cours de ces dernières années et grâce au développement de nouvelles techniques d'étude (notamment les approches par métagénomique, voire plus loin), cet environnement s'est révélé colonisé par de nombreux micro-organismes de natures différentes. Ainsi, bien que

²² Grosskopf, C.; Farriaux, J. P.; Vidailhet, M.; Briard, M. L.; Navarro, J.; Turck, D.; Travert, G.; Belot, V.; Bloch, J.; Roussel, P. Le Programme National de Dépistage Néonatal de La Mucoviscidose: Mise En Place et Organisation. *Arch. Pediatr.* **2003**, *10*, 56–60.

²³ Mishra, A.; Greaves, R.; Massie, J. The Relevance of Sweat Testing for the Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era. *Clin. Biochem. Rev.* **2005**, *26* (4), 135–153.

²⁴ Schüler, D.; Sermet-Gaudelus, I.; Wilschanski, M.; Ballmann, M.; Dechaux, M.; Edelman, A.; Hug, M.; Leal, T.; Lebacqz, J.; Lebecque, P.; et al. Basic Protocol for Transepithelial Nasal Potential Difference Measurements. *J. Cyst. Fibros.* **2004**, *3*, 151–155.

microbiologiquement moins riche que certains autres organes humains (au niveau digestif, ORL...), il est à présent reconnu que les poumons constituent une niche renfermant un microbiote structuré et complexe.

L'identification exacte de tous les micro-organismes présents dans les poumons d'un adulte « sain » ou atteint d'une pneumopathie reste encore difficile. En effet, le contact de l'appareil respiratoire avec notamment l'environnement externe résulte en une large diversité microbienne²⁵, plus ou moins cultivable. De plus, les études permettant d'établir la composition du microbiote varient en fonction du type de prélèvement analysé (par exemple une expectoration *versus* une biopsie pulmonaire), de la région pulmonaire échantillonnée, ainsi que certains critères tels que le pH, le pourcentage d'O₂ ou encore la température du tissu pulmonaire.

Différentes techniques sont à présent utilisées pour l'identification des espèces et l'évaluation de l'abondance et la richesse des populations bactériennes au sein des poumons. Les dernières méthodes, basées sur des techniques dites « non cultivables » (par opposition aux techniques basées sur la mise en culture des prélèvements) reposent sur la métagénomique. En bactériologie, le séquençage du gène codant l'ARN 16S ou le séquençage complet du génome (WGS pour Whole Genome Sequencing) ont ainsi permis des avancées majeures²⁶.

Chez un individu « sain », les espèces bactériennes les plus fréquentes appartiennent aux espèces de type Bacteroidetes (*Prevotella*) et Firmicutes (*Streptococcus*) et dans une moindre mesure aux familles Proteobacteria (*Haemophilus*) et Actinobacteria (*Corynebacterium*). Les espèces fongiques les plus identifiées sont *Saccharomyces* et *Cladrosporium*. Enfin, le virome est constitué par des virus de types bacteriophages et des virus infectant les eucaryotes²⁵ (Figure 1.5).

²⁵ Marsland, B. J.; Gollwitzer, E. S. Host-Microorganism Interactions in Lung Diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14* (12), 827–835.

²⁶ Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* 2010;*38*(22).

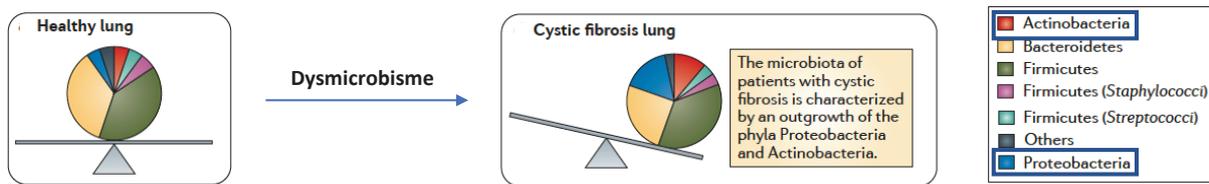


Figure 1.5. Comparaison entre le microbiote pulmonaire « sain » et le microbiote des patients MV²⁵.

En conditions pathologiques, notamment lors de la MV, le microbiote change sous l'influence de plusieurs facteurs (Figure 1.5). Le microbiote MV est caractérisé par un dysmicrobisme traduisant des modifications de l'équilibre entre les espèces bactériennes. Dans la MV, une diminution de la diversité du microbiote est souvent observée avec cependant une augmentation de la quantité et de l'agressivité de certaines bactéries dont celles appartenant aux familles de *Proteobacteria* et *Actinobacteria*^{25,27,28}.

2.2. Facteurs influençant le microbiote

Au cours de la mucoviscidose, l'évolution du microbiote est un événement multifactoriel, lié à de très nombreux facteurs. Seront brièvement présentés dans ce manuscrit l'impact des variations de l'environnement pulmonaire (inhérentes à la maladie), des caractéristiques de l'hôte et des interactions microbiennes.

²⁵ Marsland, B. J.; Gollwitzer, E. S. Host-Microorganism Interactions in Lung Diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14* (12), 827–835.

²⁷ Dickson, R. P.; Martinez, F. J.; Huffnagle, G. B. The Role of the Microbiome in Exacerbations of Chronic Lung Diseases. *Lancet* **2014**, *384* (9944), 691–702.

²⁸ Crull, M. R.; Somayaji, R.; Ramos, K. J.; Caldwell, E.; Mayer-Hamblett, N.; Aitken, M. L.; Nichols, D. P.; Rowhani-Rahbar, A.; Goss, C. H. Changing Rates of Chronic *Pseudomonas Aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis: A Population-Based Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *67* (7), 1089–1095.

2.2.1. Environnement pulmonaire

Les conditions physico-chimiques au sein des poumons peuvent influencer sur la composition des poumons en microorganismes. Par exemple, dans les poumons MV, le pH tend à être acide, en raison de la réduction du transport de bicarbonate par le transporteur CFTR. La réduction de ce pH engendre une augmentation de la viscosité de la mucine, une diminution de la clairance bactérienne et donc une modification de la composition microbienne des poumons²⁹.

2.2.2. Hôte

Les facteurs dépendant de l'hôte et influençant le microbiote pulmonaire sont principalement classés en deux types : le génotype et l'âge du patient.

2.2.2.1. Génotype/phénotype

La MV se présente sous différentes formes plus ou moins sévères selon les classes. Les trois premières classes (I, II, III) amènent à une gravité majeure de la maladie. Des études sur des cohortes des patients ont montré que la mutation non-sens R553X (homozygote - Classe I) et la mutation Δ F508 (homozygote - Classe II) influencent principalement le microbiote³⁰. En particulier, en présence de ces mutations chez un patient homozygote, les infections par *Pa* s'installent plus facilement par rapport aux patients hétérozygotes³¹. Pour expliquer ce phénomène, des études sur les patients présentant la mutation Δ F508 ont été menées.

²⁹ Héry-Arnaud, G.; Boutin, S.; Cuthbertson, L.; Elborn, S. J.; Tunney, M. M. The Lung and Gut Microbiome: What Has to Be Taken into Consideration for Cystic Fibrosis? *J. Cyst. Fibros.* **2019**, *18* (1), 13–21.

³⁰ Liechti-Gallati, S.; Bonsall, I.; Malik, N.; Schneider, V.; Kraemer, L. G.; Ruedeberg, A.; Moser, H.; Kraemer, R. Genotype/Phenotype Association in Cystic Fibrosis: Analyses of the Δ F508, R553X, and 3905insT Mutations. *Pediatr. Res.* **1992**, *32* (2), 175–178.

³¹ Marson, F. A. de L.; Bertuzzo, C. S.; Ribeiro, M. A. G. de O.; Ribeiro, A. F.; Ribeiro, J. D. Screening for F508del as a First Step in the Molecular Diagnosis of Cystic Fibrosis. *J. Bras. Pneumol.* **2013**, *39* (3), 306–316.

Zar *et al.*³² ont montré que la bactérie *Pa* était plus présente chez les patients homozygotes, par rapport aux patients hétérozygotes, ou ne présentant pas cette mutation. Une des hypothèses serait que certains glycolipides, en plus grande quantité chez les patients homozygotes, fonctionneraient comme des récepteurs pour *Pa* et faciliteraient donc son implantation.

2.2.2.2. Age

Le microbiote pulmonaire est un système complexe et en évolution constante (Figure 1.6)¹. Par exemple, avec l'avancée de l'âge des patients, les espèces changent. Ainsi, nous pouvons remarquer que chez les enfants MV, les premières bactéries identifiées sont *Staphylococcus aureus (Sa)* et *Haemophilus influenzae*, *Sa* étant prédominant (50-60 % des patients MV). Au cours du temps, une augmentation des taux de *Pa* est observée. A partir de l'adolescence, ces infections augmentent petit-à-petit jusqu'à dépasser l'incidence de *S. aureus*³³. A terme, les infections par *Pa* sont la cause majeure de mortalité et morbidité des patients MV¹⁹. Cette dynamique temporelle et la succession observée entre *Sa* et *Pa*, caractéristique de la mucoviscidose, sont une des observations majeures en lien avec nos travaux de thèse et le projet HEMATITE.

¹ Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données. **2017**.

¹⁹ Saiman, L. Microbiology of Early CF Lung Disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **2004**, *5*, 367–369.

³² Zar, H.; Saiman, L.; Quittell, L.; Prince, A. Binding of *Pseudomonas Aeruginosa* to Respiratory Epithelial Cells from Patients with Various Mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator. *J. Pediatr.* **1995**, *126* (2), 230–233.

³³ Coburn, B.; Wang, P. W.; Diaz Caballero, J.; Clark, S. T.; Brahma, V.; Donaldson, S.; Zhang, Y.; Surendra, A.; Gong, Y.; Elizabeth Tullis, D.; et al. Lung Microbiota across Age and Disease Stage in Cystic Fibrosis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–12.

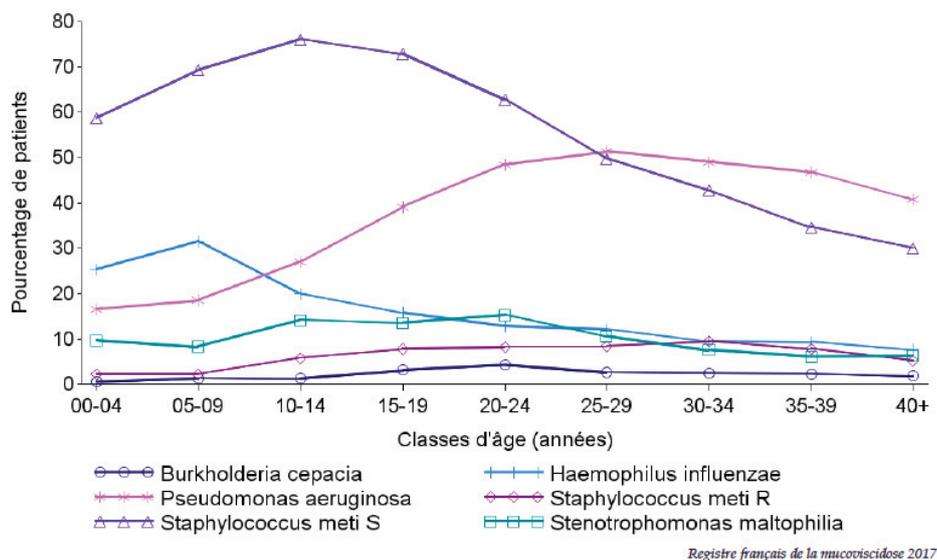


Figure 1.6. Représentation des bactéries cliniquement importante selon l'âge des patients. Données collectées par le Registre français de la mucoviscidose en 2017¹.

En termes de diversité et de richesse, il a été démontré que les patients plus âgés présentaient un microbiote « appauvri », de diversité diminuée³⁴. Cette diminution pourrait être en lien avec le fait que les poumons des patients âgés sont davantage envahis par *Pa*. Une hypothèse serait qu'en s'implantant dans l'environnement pulmonaire des patients MV et en interagissant avec les autres membres du microbiote, *Pa* engendrerait cette réduction de richesse. A noter que ces diminutions de richesse/diversité seraient de ce fait de mauvais pronostic pour le patient.

Certaines études cherchent à démontrer les liens entre les variations des microbiotes et l'état clinique des patients, mais ceux-ci demeurent encore mal connus. En particulier, il est difficile de relier des modifications de ces écosystèmes pulmonaires avec les états d'exacerbation.

¹ Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données. 2017.

³⁴ Cox, M. J.; Allgaier, M.; Taylor, B.; Baek, M. S.; Huang, Y. J.; Daly, R. A.; Karaoz, U.; Andersen, G. L.; Brown, R.; Fujimura, K. E.; et al. Airway Microbiota and Pathogen Abundance in Age-Stratified Cystic Fibrosis Patients. *PLoS One* 2010, 5 (6).

Il semblerait cependant que certaines bactéries anaérobies fermentaires soient préférentiellement présentes lors de ces exacerbations³⁵.

2.2.3. Antibiotiques

Au cours de la vie d'un patient MV, de nombreux antibiotiques sont administrés pour combattre les infections. Des études ont été réalisées pour analyser les effets de ces antibiotiques sur le microbiote MV. Ainsi, selon Carmody *et al.*³⁶, une longue exposition des patients adultes à une antibiothérapie semble en relation avec une diminution de la diversité de la communauté bactérienne³⁶. Ce changement dans la variété et la quantité du microbiote apparait temporaire. En effet, après un mois, la communauté microbienne retrouverait sa composition initiale³⁷. Le comportement du pathogène *Pseudomonas aeruginosa (Pa)* lors de traitements antibiotiques est particulier. En effet, en raison vraisemblablement de ses résistances, l'administration d'antibiotiques peut engendrer une augmentation de l'abondance relative de *Pa*. La quantité des autres espèces diminue par rapport au nombre de *Pa* qui augmente³⁸.

A noter qu'une des conséquences de l'antibiothérapie, non négligeable pour la prise en charge du patient, est l'émergence de résistance bactériennes aux antibiotiques ou la colonisation des poumons par des bactéries ayant déjà de hauts niveaux de résistance aux traitements²⁹.

²⁹ Héry-Arnaud, G.; Boutin, S.; Cuthbertson, L.; Elborn, S. J.; Tunney, M. M. The Lung and Gut Microbiome: What Has to Be Taken into Consideration for Cystic Fibrosis? *J. Cyst. Fibros.* **2019**, *18* (1), 13–21.

³⁵ Quinn, R. A.; Phelan, V. V.; Whiteson, K. L.; Garg, N.; Bailey, B. A.; Lim, Y. W.; Conrad, D. J.; Dorrestein, P. C.; Rohwer, F. L. Microbial, Host and Xenobiotic Diversity in the Cystic Fibrosis Sputum Metabolome. *ISME J.* **2016**, *10* (6), 1483–1498.

³⁶ Carmody, L. A.; Zhao, J.; Schloss, P. D.; Petrosino, J. F.; Murray, S.; Young, V. B.; Li, J. Z.; LiPuma, J. J. Changes in Cystic Fibrosis Airway Microbiota at Pulmonary Exacerbation. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2013**, *10* (3), 179–187.

³⁷ Stressmann, F. A.; Rogers, G. B.; Van Der Gast, C. J.; Marsh, P.; Vermeer, L. S.; Carroll, M. P.; Hoffman, L.; Daniels, T. W. V.; Patel, N.; Forbes, B.; et al. Long-Term Cultivation-Independent Microbial Diversity Analysis Demonstrates That Bacterial Communities Infecting the Adult Cystic Fibrosis Lung Show Stability and Resilience. *Thorax* **2012**, *67* (10), 867–873.

³⁸ Daniels, T. W. V.; Rogers, G. B.; Stressmann, F. A.; van der Gast, C. J.; Bruce, K. D.; Jones, G. R.; Connett, G. J.; Legg, J. P.; Carroll, M. P. Impact of Antibiotic Treatment for Pulmonary Exacerbations on Bacterial Diversity in Cystic Fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2013**, *12* (1), 22–28.

2.2.4. Interactions microbiennes

Parmi les micro-organismes qui constituent le microbiote, de nombreux pathogènes sont présents. Ces pathogènes incluent des bactéries, des champignons et des virus. A leurs côtés se retrouvent tout un ensemble de micro-organismes dont les fonctions et les rôles restent mal identifiés. L'ensemble de ces espèces constituent un environnement polymicrobien dans lequel se développent de nombreuses interactions de type agonistes ou antagonistes. Les interactions établies peuvent être inter- ou intra-espèces. Un des facteurs qui déterminent le type d'interaction entre espèces est la compétition pour les nutriments. Un exemple réside en la compétition entre les bactéries pour la captation des ions fer, disponibles dans l'environnement extracellulaire³⁹.

Parmi les microorganismes qui constituent le « muco-biote » (microbiote MV), *Pa* est sûrement le pathogène le plus fréquemment retrouvé et le plus redouté¹. C'est pourquoi, dans la suite de ce paragraphe, nous présenterons uniquement les interactions que *Pa* établit avec les autres microorganismes. L'établissement de ces interactions débute dès l'implantation de *Pa* dans les poumons et conditionne en partie la physiopathologie des infections respiratoires à *Pa*. De plus, ces interactions sont parfois considérées comme l'une des causes du développement des exacerbations des pneumopathies chez les patients MV. La compréhension de ces interactions pourrait donc permettre une amélioration de la prise en charge des patients. Malheureusement, à l'heure actuelle, les mécanismes par lesquels *Pa* met en place ces interactions ne sont pas clairs.

¹ Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données. **2017**.

³⁹ Barnabie, P. M.; Whiteley, M. Iron-Mediated Control of Pseudomonas Aeruginosa-Staphylococcus Aureus Interactions in the Cystic Fibrosis Lung. *J. Bacteriol.* **2015**, *197* (14), 2250–2251.

2.2.4.1. Interactions *P. aeruginosa* et microorganismes

Dans les poumons de patients MV, il est possible de retrouver des champignons comme *Aspergillus fumigatus* ou des levures comme *Candida albicans*. Ces derniers sont capables d'instaurer des interactions dans la niche pulmonaire avec *Pa*.

Les infections par *Aspergillus fumigatus* sont souvent associées à la présence de *Pa*. En effet, il a été démontré que les deux micro-organismes cohabitent dans cette niche pulmonaire MV. La sécrétion par *Pa* de facteurs de virulence comme les phénazines détermine la réduction des ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} qui sont libérés dans l'environnement pulmonaire et favorisent la croissance du champignon⁴⁰.

Concernant *C. albicans*, *Pa* est capable d'induire un changement du métabolisme de cette levure vers une anaérobiose, ce qui est démontré par une production d'éthanol augmentée, cet éthanol produit par *C. albicans* encourage la formation du biofilm par *Pa*. La virulence et la croissance de *Pa* et *C. albicans* sont donc réciproquement accrues. A noter que l'éthanol qui est produit par *C. albicans* est aussi impliqué dans la stimulation de la croissance et de la virulence de *Pa*. Inversement, *C. albicans* peut déterminer la réduction de la virulence de *Pa* par la production du farnesole. Ce dernier engendre la diminution de la synthèse par *Pa* de molécules appartenant au Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) dont nous reparlerons plus tard et des sidérophores comme la pyoverdine et la pyochéline⁴⁰. Les sidérophores sont des molécules à bas poids moléculaires qui ont une affinité élevée pour l'ion Fe^{3+} . Ils ont un rôle de chélateurs, permettant la capture de Fe^{3+} par les bactéries. Ils sont donc responsables de l'internalisation des ions ferriques dans la cellule microbienne.

Les poumons des patients MV peuvent aussi être infectés par des virus. Les espèces virales appartiennent surtout aux familles des virus à ARN : virus respiratoire syncytial (VRS), rhinovirus (RV) et les virus Influenza A et B. De nombreuses études ont été réalisées afin de

⁴⁰ O'Brien, S.; Fothergill, J. L. The Role of Multispecies Social Interactions in Shaping *Pseudomonas Aeruginosa* Pathogenicity in the Cystic Fibrosis Lung. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364* (15), 1–10.

comprendre si les virus influençaient positivement ou négativement la charge bactérienne⁴¹. Des résultats contradictoires ont été retrouvés. D'un côté, un accroissement de la charge de *Pa* est remarqué en présence des virus⁴². D'un autre côté, Chin *et al.*⁴³ ont montré que la quantité et la densité de *Pa* ne sont pas augmentées pendant les exacerbations associées aux infections virales⁴⁴. En revanche, d'autres études ont montré que les virus VRS et RV peuvent influencer le passage à la chronicité des infections à *Pa*. De plus, la présence des virus engendre une augmentation de biofilm par *Pa*⁴¹.

Un autre exemple d'interactions inter-espèces concernant les bactéries est celui réalisé entre *Pa* et les bactéries *Burkholderia* du complexe *cepacia* (BCC). Les infections causées par le complexe *B. cepacia* chez les patients MV sont associées à un pronostic défavorable, avec une fréquence élevée de décès⁷. Il a été montré que *P. aeruginosa* et le complexe des *B. cepacia* peuvent cohabiter dans la même niche. Le résultat obtenu est la formation d'un biofilm par augmentation de la production d'alginate par *Pa*⁴⁵. Cet alginate permet une protection des bactéries contre la phagocytose par les cellules immunitaires et une réduction de l'activation de la réponse immunitaire^{40,46}.

⁷ Bhagirath, A. Y.; Li, Y.; Somayajula, D.; Dadashi, M.; Badr, S.; Duan, K. Cystic Fibrosis Lung Environment and Pseudomonas Aeruginosa Infection. *BMC Pulm. Med.* **2016**, *16* (1), 1–22.

⁴⁰ O'Brien, S.; Fothergill, J. L. The Role of Multispecies Social Interactions in Shaping Pseudomonas Aeruginosa Pathogenicity in the Cystic Fibrosis Lung. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364* (15), 1–10.

⁴¹ Kiedrowski, M. R.; Bomberger, J. M. Viral-Bacterial Co-Infections in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract. *Front. Immunol.* **2018**, *9*:3067.

⁴² Wark, P. A. B.; Tooze, M.; Cheese, L.; Whitehead, B.; Gibson, P. G.; Wark, K. F.; McDonald, V. M. Viral Infections Trigger Exacerbations of Cystic Fibrosis in Adults and Children. *European Respiratory Journal*. August 1, 2012, 510–512.

⁴³ Chin, M.; De Zoysa, M.; Slinger, R.; Gaudet, E.; Vandemheen, K. L.; Chan, F.; Hyde, L.; Mah, T. F.; Ferris, W.; Mallick, R.; et al. Acute Effects of Viral Respiratory Tract Infections on Sputum Bacterial Density during CF Pulmonary Exacerbations. *J. Cyst. Fibros.* **2015**, *14* (4), 482–489.

⁴⁴ Denes, E.; Ranger-Rogez, S. Main Adult Herpes Virus Infections of the CNS. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2005**, *3* (4), 663–678.

⁴⁵ Eberl, L.; Tümmler, B. Pseudomonas Aeruginosa and Burkholderia Cepacia in Cystic Fibrosis: Genome Evolution, Interactions and Adaptation. *Int. J. Med. Microbiol.* **2004**, *294* (2–3), 123–131.

⁴⁶ Chattoraj, S. S.; Murthy, R.; Ganesan, S.; Goldberg, J. B.; Zhao, Y.; Hershenson, M. B.; Sajjan, U. S. Pseudomonas Aeruginosa Alginate Promotes Burkholderia Cenocepacia Persistence in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Knockout Mice. *Infect. Immun.* **2010**, *78* (3), 984–993.

En revanche, les bactéries BCC ont un effet inhibiteur du Quorum Sensing (QS), qui est un système de communication intra et inter-bactéries de *Pa*, ce qui entraîne une modulation de la virulence de *Pa*⁴⁷. En particulier, la sécrétion d'une molécule, l'acide cis-2-dodécénoïque par les BCC a montré une activité dans la communication avec *P. aeruginosa*⁷. *Pa* a un effet positif sur la croissance des BCC. Les molécules produites par *P. aeruginosa* déterminent une augmentation de la production de sidérophore, de protéases et de lipases chez les BCC^{40,48}.

2.2.4.2. Interactions *P. aeruginosa* et *S. aureus*

Les deux bactéries les plus identifiées dans les poumons des patients MV sont *Pa* et *Sa*. *Sa* est un pathogène retrouvé majoritairement chez les enfants MV, contrairement à *Pa* qui s'implante préférentiellement à partir de l'adolescence¹. Il existe donc une succession entre ces deux germes. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Par exemple, la présence de *Sa* empêcherait l'implantation de *Pa*, la présence du premier « protégeant » contre le second. Il est également possible que *Pa* élimine *Sa* en envahissant les poumons. Ces théories nécessitent toutes des interactions entre les bactéries.

Différentes études ont été réalisées pour comprendre ces interactions mais les mécanismes impliqués restent encore complexes. La « bataille » pour les nutriments, comme le fer, et les mécanismes d'adaptation sont parmi les éléments majeurs qui régulent le

¹ Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données. **2017**.

⁷ Bhagirath, A. Y.; Li, Y.; Somayajula, D.; Dadashi, M.; Badr, S.; Duan, K. Cystic Fibrosis Lung Environment and Pseudomonas Aeruginosa Infection. *BMC Pulm. Med.* **2016**, *16* (1), 1–22.

⁴⁰ O'Brien, S.; Fothergill, J. L. The Role of Multispecies Social Interactions in Shaping Pseudomonas Aeruginosa Pathogenicity in the Cystic Fibrosis Lung. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364* (15), 1–10.

⁴⁷ Deng, Y.; Boon, C.; Chen, S.; Lim, A.; Zhang, L. H. Cis-2-Dodecenoic Acid Signal Modulates Virulence of Pseudomonas Aeruginosa through Interference with Quorum Sensing Systems and T3SS Tracy Raivio. *BMC Microbiol.* **2013**, *13* (1).

⁴⁸ McKenney, D.; Brown, K. E.; Allison, D. G. Influence of Pseudomonas Aeruginosa Exoproducts on Virulence Factor Production in Burkholderia Cepacia: Evidence of Interspecies Communication. *J. Bacteriol.* **1995**, *177* (23), 6989–6992.

développement de ces interactions. Les molécules du QS jouent également un rôle fondamental.

Initialement, les interactions entre ***Pa*** et ***Sa*** étaient décrites comme exclusivement antagonistes, ***Pa*** inhibant la croissance de ***Sa***. Cependant, il apparaît à présent que les deux bactéries peuvent cohabiter dans la même niche, ce qui explique les co-infections de ***Pa*** et ***Sa*** retrouvées chez certains patients MV (35% des cas)⁴⁹. Des interactions agonistes ont ainsi été identifiées.

2.2.4.2.1. *Interactions antagonistes*

Bien que, comme cité précédemment, ces interactions antagonistes ***Pa-Sa*** soient les plus décrites, leur compréhension reste encore complexe en raison de leur multi-factorialité et de la difficulté liée à la diversité des situations, cliniques ou non, dans lesquelles elles peuvent survenir.

⁴⁹ Hubert, D.; Réglie-Poupet, H.; Sermet-Gaudelus, I.; Ferroni, A.; Le Bourgeois, M.; Burgel, P. R.; Serreau, R.; Dusser, D.; Poyart, C.; Coste, J. Association between Staphylococcus Aureus Alone or Combined with Pseudomonas Aeruginosa and the Clinical Condition of Patients with Cystic Fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2013**, *12* (5), 497–503.

De plus, une bactérie n'utilise pas qu'un seul système de compétition, mais plutôt une combinaison de systèmes^{50,51}. La Figure 1.7 met en avant les différents mécanismes que *Pa* exerce pour entrer en compétition avec *Sa*.

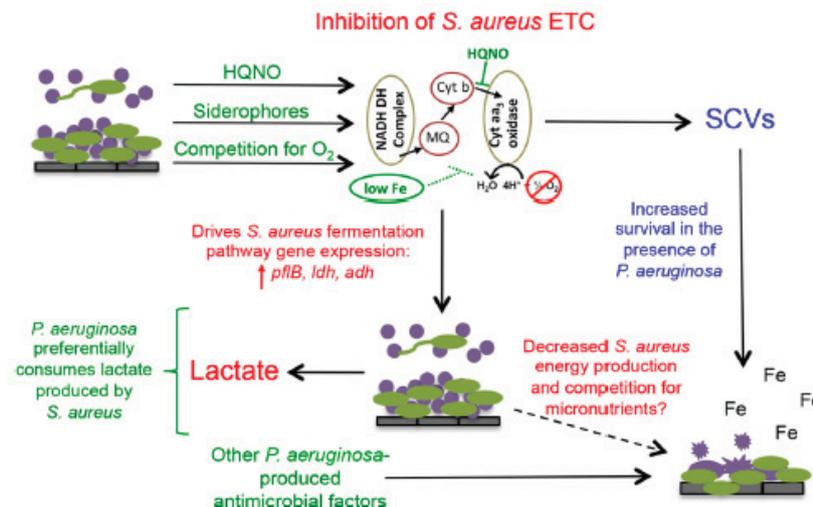


Figure 1.7 Hypothèses des mécanismes utilisés par *P. aeruginosa* dans la compétition avec *S. aureus*⁵⁰.

Filkins *et al.*⁵⁰ ont étudié les interactions entre les deux bactéries lorsqu'elles sont en co-culture. Pour cela, cette équipe a développé des méthodes de culture planctonique (bactéries libres dans le milieu) et sous forme adhérente. Dans les deux cas, les deux bactéries cohabitent initialement, puis une diminution de la croissance de *Sa* est remarquée. Dans ces modèles (Figure 1.7), *Pa* et *Sa* entrent en compétition notamment pour l'oxygène et le fer. *Pa* se met à produire des molécules telles que le 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine *N*-oxyde (HQNO) et des sidérophores (molécules produites pour récupérer le fer de l'environnement) de type pyoverdine et pyochéline. Il a été observé que ces molécules et la compétition pour l'oxygène engendrent une inhibition de la chaîne respiratoire de *Sa*. La réponse de *Sa* à ces conditions est le passage d'un métabolisme respiratoire vers la fermentation. Ce phénomène peut être mis en évidence, entre autres, par l'accumulation de lactate (dosage par HPLC) dans les

⁵⁰ Filkins, L. M.; Graber, J. A.; Olson, D. G.; Dolben, E. L.; Lynd, L. R.; Bhuju, S.; O'Toole, G. A. Coculture of *Staphylococcus Aureus* with *Pseudomonas Aeruginosa* Drives *S. Aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *J. Bacteriol.* **2015**, *197* (14), 2252–2264.

⁵¹ Szamosvári, D.; Rutschlin, S.; Böttcher, T. From Pirates and Killers : Does Metabolite Diversity Drive Bacterial Competition? *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 2814-2819.

surnageants de **Sa**. Le lactate secrété par **Sa** est alors utilisé par **Pa**, pour son propre métabolisme. Le changement de métabolisme de **Sa** implique également un ralentissement dans la croissance de la bactérie. Progressivement, la combinaison de l'inhibition de la chaîne respiratoire, du ralentissement de la croissance et de la compétition pour les nutriments, comme le fer, détermine la mort de **Sa**.

Un autre élément favorisant ce passage de **Sa** vers la voie fermentaire repose sur la production de la pyocyanine, phénazine pigmentée produite par **Pa**.

Le fer est un élément capital à la croissance et à la virulence de **Pa**, ainsi qu'à sa capacité à adhérer à des surfaces. Il représente un élément majeur influant sur les interactions **Sa-Pa**. En l'absence de fer, **Pa** lyserait **Sa** afin de récupérer le fer contenu dans celui-ci. Mashburn *et al.*⁵² ont comparé l'expression génique de **Pa** en présence et en absence de **Sa**. En l'absence de fer et de **Sa**, les gènes de **Pa** impliqués dans la captation du fer sont exprimés. En revanche, lors d'une co-culture **Sa-Pa**, une sous expression de ces gènes est observée. La lyse de **Sa** vient donc compenser l'absence de fer pour **Pa**.

Le mécanisme avec lequel **Pa** induit la lyse de **Sa**, notamment afin de récupérer le fer, est encore incertain. Il reposerait sur une lyse directe de **Sa** par **Pa** ou par l'induction d'une autolyse de **Sa** par **Pa**. Un ensemble de phénomènes sont mis en place, notamment *via* la sécrétion de nombreuses molécules pouvant agir sur **Sa**. Parmi ces molécules se retrouve le composé LasA. Cette endopeptidase aussi appelé l'élastase engendre la lyse de la séquence de pentaglycine présente dans la paroi de **Sa** et, de ce fait, la mort de la bactérie. Le but de cette lyse cellulaire serait, comme nous l'avons vu, une libération du fer contenu dans **Sa** afin de le rendre disponible pour **Pa**. A noter que LasA est l'une des protéines produites lors de l'activation du système de QS, *las*⁵³.

⁵² Mashburn, L. M.; Jett, A. M.; Akins, D. R.; Whiteley, M. Staphylococcus Aureus Serves as an Iron Source for Pseudomonas Aeruginosa during in Vivo Coculture. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (2), 554–566.

⁵³ Hotterbeekx, A.; Kumar-Singh, S.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. In Vivo and In Vitro Interactions between Pseudomonas Aeruginosa and Staphylococcus Spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7* (APR), 1–13.

Nguyen *et al.*⁵⁴ ont démontré que des molécules appartenant à un autre système du QS (système PQS voir plus loin) ont un rôle dans le mécanisme de lyse de *Sa*. En effet, une partie de cette lyse n'est pas retrouvée quand *Sa* est en co-culture avec des souches de *Pa* qui présentent des mutations au niveau des gènes codant la synthèse de ces molécules.

Un autre mécanisme d'antagonisme entre *Pa* et *Sa* est représenté par la dispersion des biofilms. Le biofilm est une communauté microbienne capable d'adhérer à une surface. Il peut être constitué d'une seule espèce microbienne ou de plusieurs bactéries, voir micro-organismes⁵⁵. La formation du biofilm se réalise à partir d'une première adhésion de bactérie sur une surface accompagnée rapidement par la sécrétion d'une matrice extracellulaire polymérique qui renforce cette adhésion⁵⁶.

La dispersion des biofilms est un phénomène qui consiste en la progressive dégradation du biofilm, déjà formé, avec libération des bactéries dans l'environnement. En situation de carence des nutriments, *Pa* détruit une partie du biofilm formé par *Sa*, pour en récupérer les nutriments. Il peut donc être considéré comme un mécanisme de compétition entre deux espèces microbiennes⁵⁷.

Les mécanismes ne sont pas encore parfaitement décrits mais un des facteurs impliqués serait là encore la sécrétion par *Pa* de molécules spécifiques. Par exemple, les rhamnolipides (molécules constituées par une ou deux molécules de rhamnose liées par un ou deux acides gras) favorisent la dispersion des biofilms, principalement ceux réalisés par des bactéries

⁵⁴ Nguyen, A. T.; Jones, J. W.; Ruge, M. A.; Kane, M. A.; Oglesby-Sherrouse, A. G. Iron Depletion Enhances Production of Antimicrobials by *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2015**, *197* (14), 2265–2275.

⁵⁵ Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56* (1), 187–209.

⁵⁶ Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Debeer, D.; Caldwell, D.; Korber, D. Biofilms, the Customized Microniche. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (8), 2137–2142.

⁵⁷ Davies, D. G.; Marques, C. N. H. A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (5), 1393–1403.

à Gram positif (dont **Sa**)^{53,58}. A noter que ces molécules auraient aussi une action dans la diminution des forces permettant l'adhésion initiale de **Sa** à une surface (rôle anti-adhésif). Une autre molécule telle que l'acide cis-2-décénoïque est considérée comme étant un inducteur de la dispersion de biofilm. Une hypothèse est que ces molécules augmenteraient la synthèse des enzymes de dégradation des polymères extracellulaires, qui garantissent l'adhésion cellulaire caractérisant la structure du biofilm⁵⁷.

Les rhamnolipides et l'endopeptidase, LasA sont aussi impliqués dans l'augmentation de l'activité antibiotique de certaines molécules contre **Sa**⁵⁸. Les rhamnolipides s'intercalent au niveau de la membrane de **Sa** engendrant une meilleure action de certains antibiotiques. Par exemple, la perméabilité et la sensibilité de **Sa** à la tobramycine sont augmentées en présence de ces molécules. De la même manière, **Pa** augmente la sensibilité de **Sa** à la vancomycine par la sécrétion de LasA qui agit sur la lyse du peptidoglycane, constituant de la paroi bactérienne⁵⁹.

⁵³ Hotterbeekx, A.; Kumar-Singh, S.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. In Vivo and In Vitro Interactions between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus* Spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7* (APR), 1–13.

⁵⁷ Davies, D. G.; Marques, C. N. H. A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (5), 1393–1403.

⁵⁸ Vandeplassche, E.; Tavernier, S.; Coenye, T.; Crabbé, A. Influence of the Lung Microbiome on Antibiotic Susceptibility of Cystic Fibrosis Pathogens. *Eur. Respir. Rev.* **2019**, *28* (152), 190041.

⁵⁹ Radlinski, L.; Rowe, S. E.; Kartchner, L. B.; Maile, R.; Cairns, B. A.; Vitko, N. P.; Gode, C. J.; Lachiewicz, A. M.; Wolfgang, M. C.; Conlon, B. P. *Pseudomonas Aeruginosa* Exoproducts Determine Antibiotic Efficacy against *Staphylococcus Aureus*. *PLoS Biol.* **2017**, *15* (11), 1–25.

2.2.4.2.2. Interactions agonistes

Les bactéries peuvent répondre différemment aux conditions environnementales⁵⁶. Dans le paragraphe précédant, nous avons décrit le mécanisme de dispersion des biofilms à **Sa** dans des conditions de déplétion en nutriments, subies par **Pa**⁵⁷. Cependant, dans d'autres situations, la formation de biofilm peut aussi être un de mécanisme d'interactions agonistes entre les deux bactéries⁶⁰.

D'une manière générale, certaines conditions de stress (autres que la carence en nutriments) tel que l'administration des antibiotiques sont associées à une formation de biofilms, que ce soit des biofilms mono ou pluri-espèces^{61,62}. En effet, ces structures augmentent la résistance des bactéries à l'activité des antibiotiques *via* différents mécanismes (barrière physique, métabolisme ralenti des bactéries engendrant une efficacité moindre des antibiotiques actifs sur des germes en multiplication). En addition à ces mécanismes, Magalhaes *et al.*⁶³ ont démontré que des biofilms **Sa-Pa** étaient plus « résistants » aux antibiotiques que les biofilms constitués d'une seule de ces bactéries. Ainsi, la viabilité de **Sa** en présence de ciprofloxacine dans un biofilm avec **Pa** est augmentée. Il a été également démontré que la sécrétion de 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline N-Oxide (HQNO) par **Pa** augmente la formation de biofilm à **Sa** en modulant l'activité de la molécule Sigma B (SigB). Ce composé

⁵⁶ Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Debeer, D.; Caldwell, D.; Korber, D. Biofilms , the Customized Microniche. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (8), 2137–2142

⁵⁷ Davies, D. G.; Marques, C. N. H. A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (5), 1393–1403.

⁶⁰ Kumar, A.; Ting, Y. P. Presence of *Pseudomonas Aeruginosa* Influences Biofilm Formation and Surface Protein Expression of *Staphylococcus Aureus*. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17* (11), 4459–4468.

⁶¹ Kaplan, J. B. Antibiotic-Induced Biofilm Formation. *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34* (9), 737–751.

⁶² Stewart, P. S. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* **2002**, *292* (2), 107–113.

⁶³ Magalhães, A. P.; Lopes, S. P.; Pereira, M. O. Insights into Cystic Fibrosis Polymicrobial Consortia: The Role of Species Interactions in Biofilm Development, Phenotype, and Response to in-Use Antibiotics. *Front. Microbiol.* **2017**, *7*: 2146.

est un facteur de transcription impliqué dans différentes voies de signalisation de **Sa**, dont celle menant à l'adhésion de **Sa** et à la formation des biofilms.⁶⁴

Un deuxième type d'interaction agoniste **Pa/Sa** repose sur l'apparition des variants à petites colonies (small colony variants, SCVs) par **Sa**. Ces morphotypes peuvent être observés parmi les Gram- et Gram+, souvent suite à des stimulations issues de l'environnement (notamment des situations de stress)⁶⁵. D'une manière générale, les SCVs représentent des morphotypes bactériens ayant des phénotypes différents de ceux classiquement observés. Les SCVs se présentent souvent sous la forme de colonies plus petites, brillantes et parfaitement rondes⁵³. Ces colonies sont caractérisées par une diminution de la pigmentation, par une réduction de la fonction de la chaîne respiratoire ou par une inhibition totale de celle-ci et une auxotrophie de certaines molécules caractéristiques du métabolisme aérobie. Par conséquent, la production d'ATP est diminuée et la croissance est ralentie⁶⁶.

Sa est un exemple de bactérie pouvant générer des SCVs (Figure 1.8). Alors que les souches « sauvages » présentent une pigmentation dorée, caractéristique de cette espèce, les souches SCVs apparaissent de petite taille et de coloration blanchâtre.

⁵³ Hotterbeekx, A.; Kumar-Singh, S.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. In Vivo and In Vitro Interactions between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus* Spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7* (APR), 1–13.

⁶⁴ Mitchell, G.; Séguin, D. L.; Asselin, A. E.; Déziel, E.; Cantin, A. M.; Frost, E. H.; Michaud, S.; Malouin, F. *Staphylococcus Aureus* Sigma B-Dependent Emergence of Small-Colony Variants and Biofilm Production Following Exposure to *Pseudomonas Aeruginosa* 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline-N-Oxide. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 1–15.

⁶⁵ Sendi, P.; Proctor, R. A. *Staphylococcus Aureus* as an Intracellular Pathogen: The Role of Small Colony Variants. *Trends Microbiol.* **2009**, *17* (2), 54–58.

⁶⁶ Proctor, R. A.; von Eiff, C.; Kahl, B. C.; Becker, K.; McNamara, P.; Herrmann, M.; Peters, G. Small Colony Variants: A Pathogenic Form of Bacteria That Facilitates Persistent and Recurrent Infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (4), 295–305.

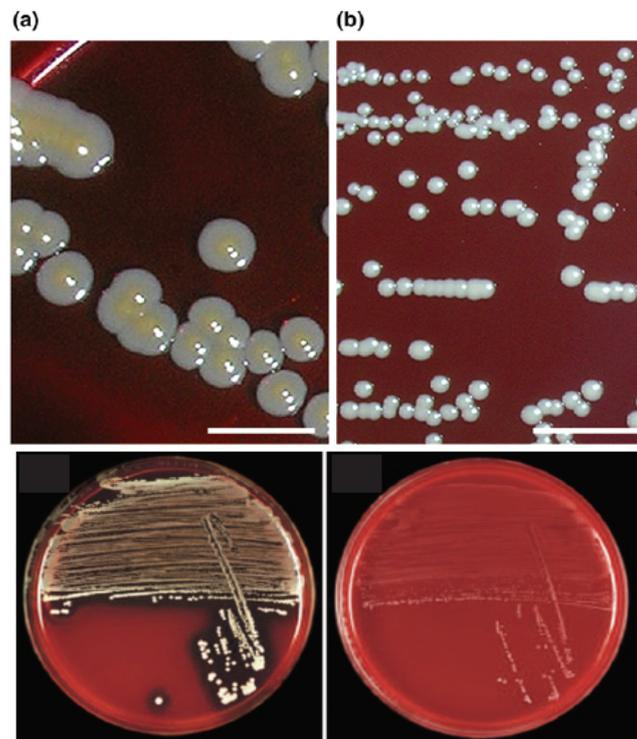


Figure 1.8 Colonies de *Sa* (a) souches sauvages avec une pigmentation dorée (b) variants à petites colonies (SCVs)^{65,66}.

Les SCVs de *Sa* se développent suite à des mutations spontanées ou induites par des stress environnementaux⁶⁷. Par exemple, des traitements prolongés avec les antibiotiques peuvent induire chez *Sa* la formation de ces SCVs⁶⁸.

⁶⁵ Sendi, P.; Proctor, R. A. Staphylococcus Aureus as an Intracellular Pathogen: The Role of Small Colony Variants. *Trends Microbiol.* **2009**, *17* (2), 54–58.

⁶⁶ Proctor, R. A.; von Eiff, C.; Kahl, B. C.; Becker, K.; McNamara, P.; Herrmann, M.; Peters, G. Small Colony Variants: A Pathogenic Form of Bacteria That Facilitates Persistent and Recurrent Infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (4), 295–305.

⁶⁷ Melter, O.; Radojevič, B. Small Colony Variants of Staphylococcus Aureus - Review. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2010**, *55* (6), 548–558.

⁶⁸ Massey, R. C.; Buckling, A.; Peacock, S. J. Phenotypic Switching of Antibiotic Resistance Circumvents Permanent Costs in Staphylococcus Aureus. *Curr. Biol.* **2001**, *11* (22), 1810–1814.

Dans le cadre des interactions ***Pa-Sa***, l'apparition de SCVs de ***Sa*** est décrite suite à des co-cultures avec ***Pa***. Comme vu précédemment, des molécules émises par ***Pa*** (pyocyanine ou HQNO) engendrent, entre autre, une inhibition de la chaîne respiratoire de ***Sa***.

Par conséquent, le métabolisme de ***Sa*** devient fermentatif ce qui entraîne une croissance ralentie des bactéries et donc la formation de cellules plus petites et rondes que sont les SCVs⁵³.

Les deux exemples d'interactions agonistes cités ici (biofilm/SCVs) déterminent une augmentation de la résistance aux antibiotiques de ***Sa*** par rapport aux phénotypes normaux^{60,62}. Ils confèrent donc un « avantage » à ***Sa***, celui-ci pouvant persister plus longtemps au niveau pulmonaire notamment, où les xénobiotiques sont nombreux. Par exemple, Kumar and Ting⁶⁰ ont ainsi démontré que l'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les SCV est la conséquence de l'augmentation du rejet par la cellule elle-même des xénobiotiques, tels que les aminoglycosides.

⁵³ Hotterbeekx, A.; Kumar-Singh, S.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. In Vivo and In Vitro Interactions between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus* Spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7* (APR), 1–13.

⁶⁰ Kumar, A.; Ting, Y. P. Presence of *Pseudomonas Aeruginosa* Influences Biofilm Formation and Surface Protein Expression of *Staphylococcus Aureus*. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17* (11), 4459–4468.

⁶² Stewart, P. S. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* **2002**, *292* (2), 107–113.

Les interactions agonistes ou antagonistes sont liées en partie à l'activité des molécules sécrétées par les bactéries (Figure 1.9). Il est bien connu que *Pa* sécrète énormément de molécules qui sont notamment responsables de la communication intra- et intercellulaire, le quorum sensing (QS). Chaque bactérie peut présenter plusieurs systèmes de QS avec des structures différentes⁶⁹.

Le système de QS le plus connu parmi les bactéries à Gram -, dont *Pa*, est celui des *N*-Acyl Homosérine Lactones (AHL). Ce système comprend deux classes de molécules, le système Las et le système Rhl, qui sont impliqués dans la communication inter et intra cellulaire et comme nous l'avons vu précédemment dans les interactions bactériennes. Les deux systèmes sont impliqués dans la régulation de la synthèse de facteurs de virulence de *Pa*. Le système Las contrôle la production de molécules telles que LasA et le système Rhl est responsable de la synthèse, entre autres, des rhamnolipides. La pyocyanine est aussi liée à ce système.

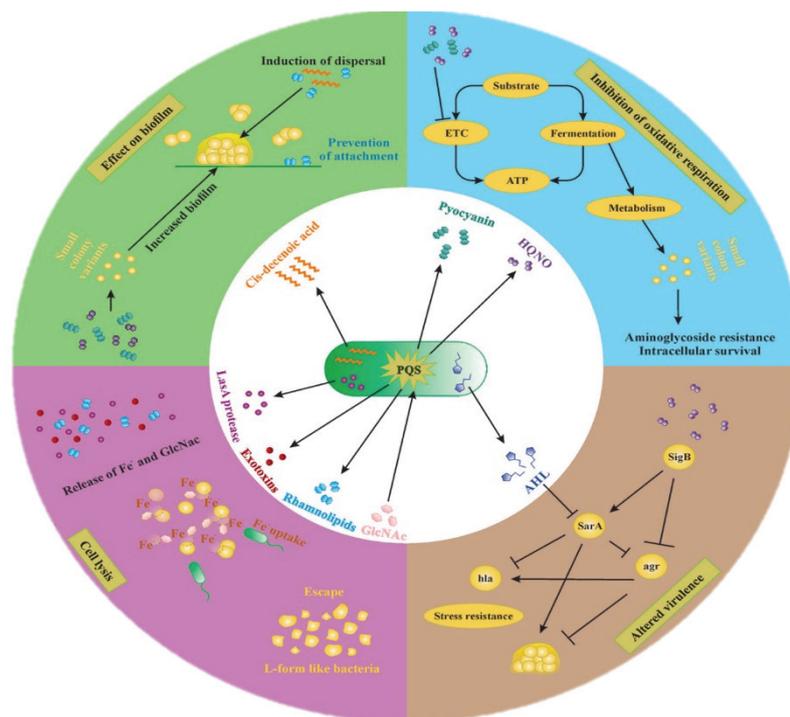


Figure 1.9 Ensemble de molécules du quorum sensing sécrétées par *Pa*⁵³.

⁵³ Hotterbeekx, A.; Kumar-Singh, S.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. In Vivo and In Vitro Interactions between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus* Spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*:1–13.

⁶⁹ Miller, M. B.; Bassler, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **2001**, *55*(1), 165–199

Dans le prochain paragraphe, nous développerons un autre des systèmes de communication de *Pa* : le Système Pseudomonas Quinolone Signal (PQS)⁷⁰. Les molécules décrites dans cette thèse sont en effet liées à ce système.

3. SYSTEME PSEUDOMONAS QUINOLONE SIGNAL

Le système Pseudomonas Quinolone Signal est constitué par des molécules qui sont des dérivés de la 2-alkyl-4-hydroxyquinoléine (AQ) ou 2-alkyl-4-hydroxyquinoléine-*N*-oxyde (AQNO). Ces molécules sont des métabolites de *Pa*. Déziel *et al.*⁷⁰ ont analysé par LC-MS le surnageant des cultures bactériennes de *Pa*. Ils ont identifié diverses molécules appartenant à ce système PQS, possédant différentes activités selon leur structure. En Figure 1.10 les quatre principales molécules de ce système PQS sont présentées : 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine (HHQ) ; 2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoléine (Pseudomonas Quinolone Signal ou PQS) ; 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine *N*-oxyde (HQNO) ; 2,4-dihydroxyquinoléine (DHQ).

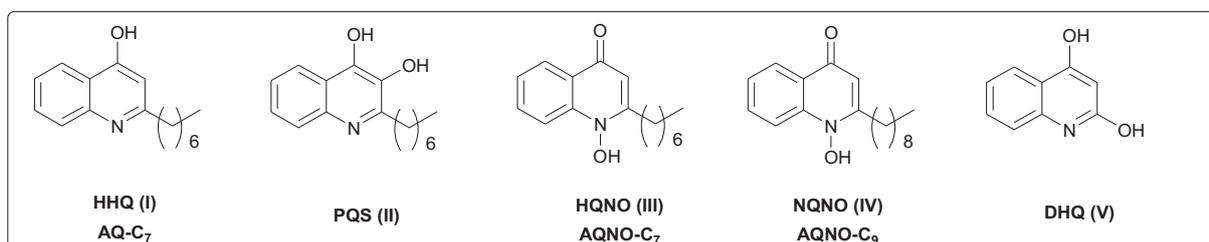


Figure 1.10 Molécules principales du système PQS

Dans la prochaine section, nous exposons la biosynthèse de ces molécules. Les fonctions de ces composés seront exposées dans le chapitre 2 (c.f. page 90), à la suite de la présentation des synthèses et aspects chimiques de ces molécules.

⁷⁰ Lépine, F.; Milot, S.; Déziel, E.; He, J.; Rahme, L. G. Electrospray/Mass Spectrometric Identification and Analysis of 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines (HAQs) Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15* (6), 862–869.

3.1. Biosynthèse de molécules 2-alkyl-4-hydroxyquinolèines

La production des molécules de type AQ par *Pa* est souvent liée à une activité auto-inductrice des molécules elles-mêmes. Ces molécules se lient aux récepteurs et sont capables d'induire la transcription génétique permettant leur synthèse.

L'ensemble de gènes responsables de la synthèse des molécules du PQS est regroupé au sein de l'opéron *pqsABCDE* (Figure 1.11). Deux autres gènes, *pqsH* et *pqsL*, sont délocalisés sur le chromosome et sont eux aussi impliqués dans la synthèse des AQs ⁷¹. L'opéron *pqsABCDE* est de plus responsable de la synthèse de l'antranilate coenzyme A ligase (*pqsA*) et de trois β -ketoacyl-acyl carrier protéine synthase III. Ces enzymes sont impliquées dans la synthèse des précurseurs tels que les acides gras.



Figure 1.11 Représentation de l'opéron PQS, ainsi que des gènes *pqsH* et *pqsL* (image modifiée de Ha *et al.*)⁷².

La biosynthèse des molécules AQs est schématisée en Figure 1.12. Les molécules AQs ont comme précurseur l'antranilate qui peut être synthétisé par deux voies différentes. La première voie implique l'acide shikimique et la PnhB antranilate synthétase. La deuxième voie est celle qui implique la kynurénine produite en trois étapes à partir du substrat tryptophane^{71,73}. Trois enzymes sont impliquées dans cette biosynthèse à partir du

⁷¹ Farrow, J. M.; Pesci, E. C. Two Distinct Pathways Supply Anthranilate as a Precursor of the Pseudomonas Quinolone Signal. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (9), 3425–3433.

⁷² Ha, D. G.; Merritt, J. H.; Hampton, T. H.; Hodgkinson, J. T.; Janecek, M.; Spring, D. R.; Welch, M.; O'Toole, G. A. 2-Heptyl-4-Quinolone, a Precursor of the Pseudomonas Quinolone Signal Molecule, Modulates Swarming Motility in Pseudomonas Aeruginosa. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (23), 6770–6780.

⁷³ Heeb, S.; Fletcher, M. P.; Chhabra, S. R.; Diggle, S. P.; Williams, P.; Cámara, M. Quinolones: From Antibiotics to Autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35* (2), 247–274.

tryptophane KynA, KynB et KynU. KynA est une tryptophane 2,3-dioxygénase, responsable de la conversion du tryptophane en *N*-formylkynurénine. Ce substrat est ensuite transformé en kynurénine par la kynurénine formamidase, KynB. La dernière étape est la conversion de la kynurénine en anthranilate par KynU^{71,74}.

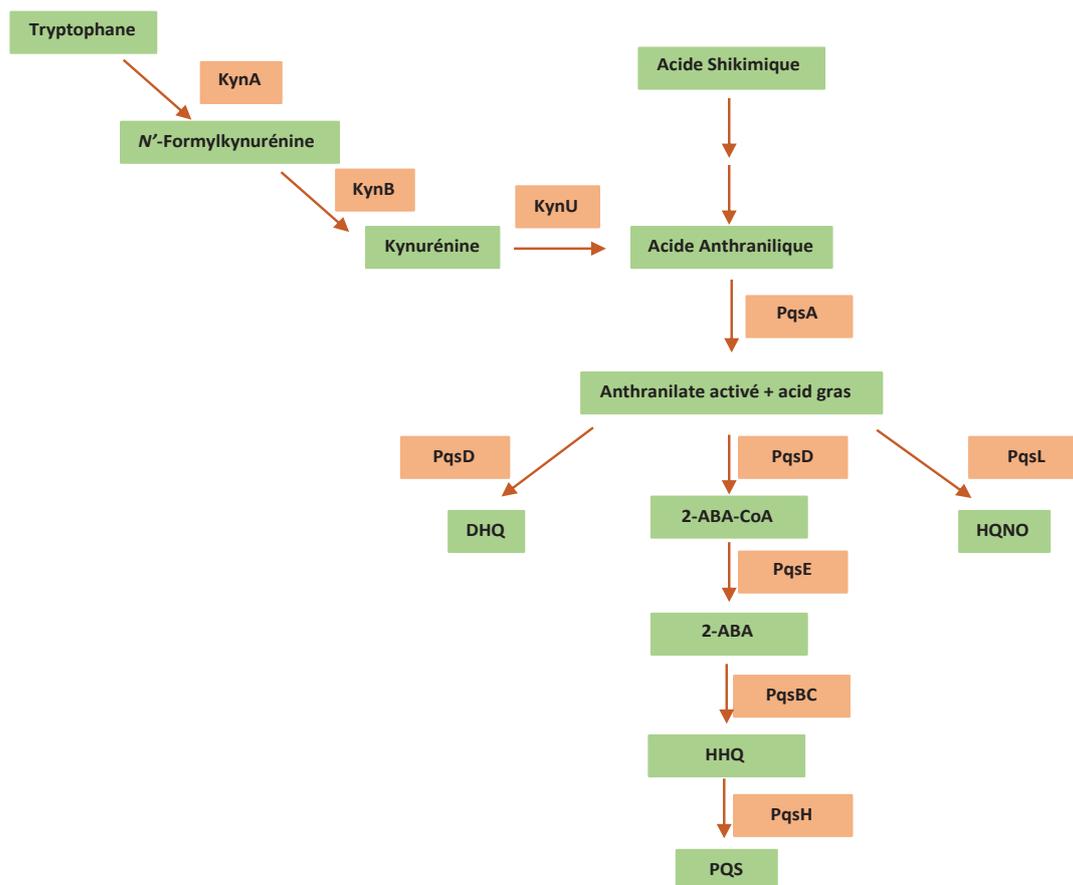


Figure 1.12 Biosynthèse complète des molécules AQs chez la bactérie *P. aeruginosa*.

⁷¹ Farrow, J. M.; Pesci, E. C. Two Distinct Pathways Supply Anthranilate as a Precursor of the Pseudomonas Quinolone Signal. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (9), 3425–3433.

⁷⁴ Dubern, J. F.; Diggle, S. P. Quorum Sensing by 2-Alkyl-4-Quinolones in Pseudomonas Aeruginosa and Other Bacterial Species. *Mol. Biosyst.* **2008**, *4* (9), 882–888.

L'antranilate est ensuite activé par la PqsA (l'antranilate coenzyme A ligase) pour former l'antraniloïl-CoA. Ce dernier réagit avec un β -keto acide gras par la condensation de Claisen^{73,75}. La réaction entre l'antraniloïl-CoA et le malonyl-CoA est catalysée par le facteur PqsD. Les molécules qui en dérivent sont instables. Elles constituent les substrats pour PqsE et permettent la formation du 2-aminobenzoylacetate (2-ABA)⁷⁶.

Drees *et al.*⁷⁶ ont supposé que le 2-ABA pouvait alors prendre deux parcours différents : (i) la décarboxylation pour former le 2-aminoacétophénone, un métabolite secondaire, responsable de l'activation de la réponse immunitaire et (ii) la formation de la molécule 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine (HHQ) par PqsBCD.

Récemment, il a été découvert que PqsE est impliqué dans la synthèse de HHQ en tant que thioestérase, pour l'hydroxylation de 2-ABA-CoA en 2-ABA (Figure 1.13). PqsE est aussi impliqué dans le contrôle de la synthèse de la pyocyanine, des lectines, des rhamnolipides et dans la production de cyanure d'hydrogène. A noter que ces composés sont des facteurs de virulence et sont impliqués dans le développement de l'inflammation et de la toxicité⁷⁷.

⁷³ Heeb, S.; Fletcher, M. P.; Chhabra, S. R.; Diggle, S. P.; Williams, P.; Cámara, M. Quinolones: From Antibiotics to Autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35* (2), 247–274.

⁷⁵ Pistorius, D.; Ullrich, A.; Lucas, S.; Hartmann, R. W.; Kazmaier, U.; Müller, R. Biosynthesis of 2-Alkyl-4(1H)-Quinolones in *Pseudomonas Aeruginosa*: Potential for Therapeutic Interference with Pathogenicity. *ChemBioChem* **2011**, *12* (6), 850–853.

⁷⁶ Drees, S. L.; Li, C.; Prasetya, F.; Saleem, M.; Dreveny, I.; Williams, P.; Hennecke, U.; Emsley, J.; Fetzner, S. PqsBC, a Condensing Enzyme in the Biosynthesis of the *Pseudomonas Aeruginosa* Quinolone Signal: Crystal Structure, Inhibition, and Reaction Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (13), 6610–6624.

⁷⁷ Chan, K. G.; Liu, Y. C.; Chang, C. Y. Inhibiting N-Acyl-Homoserine Lactone Synthesis and Quenching *Pseudomonas* Quinolone Quorum Sensing to Attenuate Virulence. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*:1173.

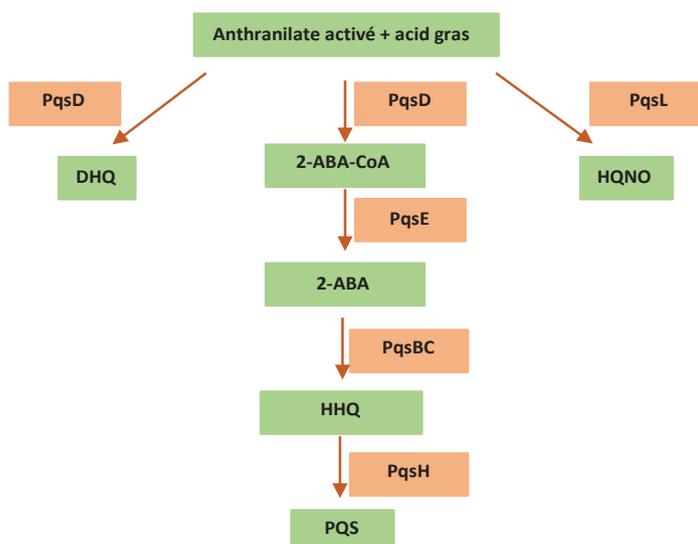


Figure 1.13 Dernières étapes de la biosynthèse des molécules AQ et AQNOs chez *P. aeruginosa*.

Le gène *pqsH* est responsable de la synthèse de l'enzyme monooxygénase FAD-dépendante qui est responsable de l'hydroxylation de HHQ en 2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoléine (Pseudomonas Quinolone Signal ou PQS) en position 3 du noyau

quinoléine⁷³. La réaction de conversion est réalisée dans le cytoplasme, suite à la pénétration de HHQ à travers la paroi cellulaire de *Pa*⁷⁴.

Le gène *pqsL* code une autre monooxygénase, qui est responsable de la N-oxydation du cycle quinoléine pour la formation de 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine N-oxyde (HQNO)⁷³. PqsA et PqsD, *in vitro* sont responsables de la synthèse de 2,4-dihydroxyquinoléine (DHQ).

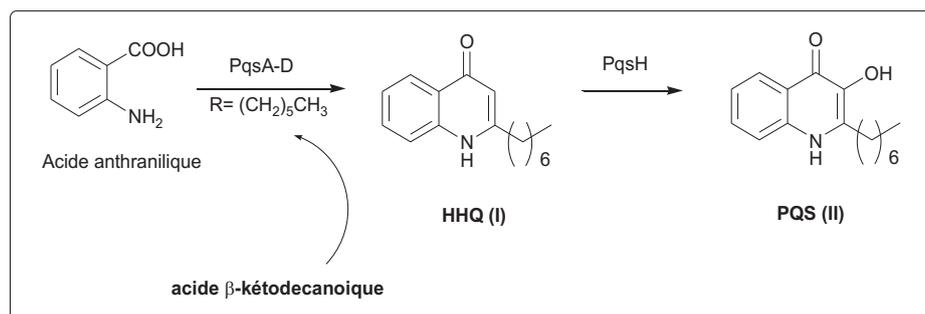


Schéma 1.1 Mécanisme de biosynthèse proposée par Pistorius *et al.*^{71 75}(schéma adapté).

Pistorius *et al.*⁷⁵ ont démontré que HHQ peut être synthétisé à l'aide de PqsD. Cette équipe a réalisé la synthèse de HHQ *in vitro* par l'utilisation de PqsD recombinant et de dérivés des β-keto acides (Schéma 1.1). De plus, ces chercheurs ont montré que PqsD en présence de différentes β-keto acides est capable de synthétiser plusieurs molécules AQs avec des chaînes latérales de différentes longueurs^{75,77}.

⁷³ Heeb, S.; Fletcher, M. P.; Chhabra, S. R.; Diggle, S. P.; Williams, P.; Cámara, M. Quinolones: From Antibiotics to Autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, 35 (2), 247–274.

⁷⁴ Dubern, J. F.; Diggle, S. P. Quorum Sensing by 2-Alkyl-4-Quinolones in *Pseudomonas Aeruginosa* and Other Bacterial Species. *Mol. Biosyst.* **2008**, 4 (9), 882–888.

⁷⁵ Pistorius, D.; Ullrich, A.; Lucas, S.; Hartmann, R. W.; Kazmaier, U.; Müller, R. Biosynthesis of 2-Alkyl-4(1H)-Quinolones in *Pseudomonas Aeruginosa*: Potential for Therapeutic Interference with Pathogenicity. *ChemBioChem* **2011**, 12 (6), 850–853.

⁷⁷ Chan, K. G.; Liu, Y. C.; Chang, C. Y. Inhibiting N-Acyl-Homoserine Lactone Synthesis and Quenching *Pseudomonas* Quinolone Quorum Sensing to Attenuate Virulence. *Front. Microbiol.* **2015**, 6: 1173.

3.2. Le récepteur des 2-alkyl-4-hydroxyquinoléines

Afin d'accomplir ses fonctions de molécule du QS, PQS se lie au récepteur type Lys-R, PqsR (Figure 1.14). Ce récepteur est responsable de l'activation de l'opéron *pqsABCDE* et probablement de l'opéron *phnAB*⁷⁸.

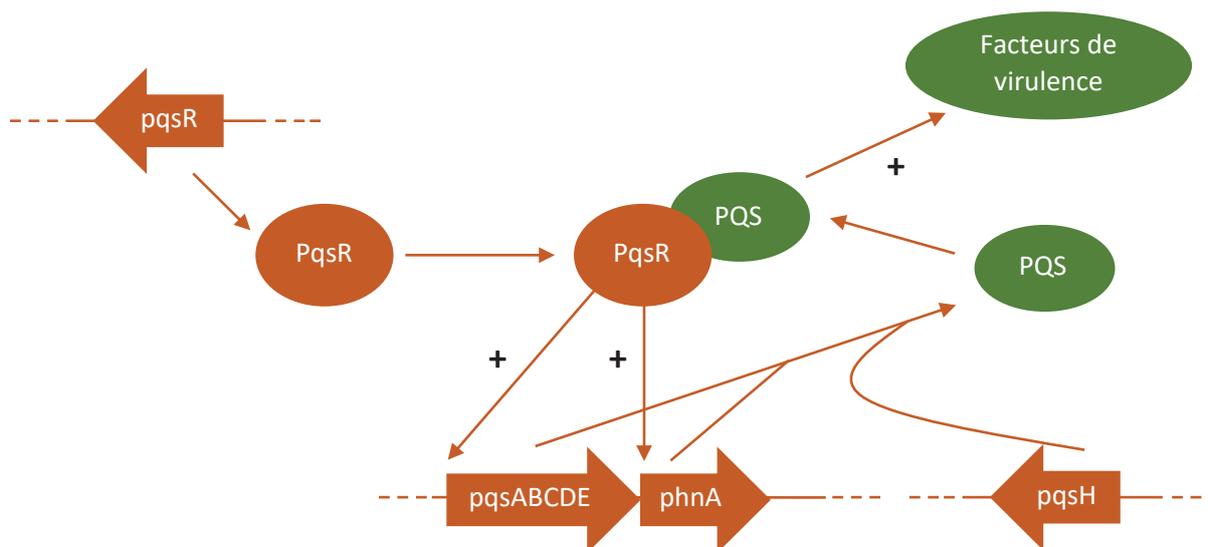


Figure 1.14 PQS se lie au récepteur PqsR, suite à l'activation le complexe favorise la transcription génique des operons *pqsABCDE* et *phnA*.

PqsR est un régulateur transcriptionnel. Il active directement la région promotrice de *pqsABCDE*. Le HHQ peut aussi activer le récepteur PqsR, mais de façon 100 fois moins intense que PQS. PQS est considéré comme un auto-inducteur. De ce fait, une fois atteinte une concentration seuil extracellulaire, PQS active PqsR. Le complexe PQS-PqsR, ainsi formé, se lie au promoteur de *pqsA*. La synthèse de PQS est, ainsi, induite⁷⁹. L'opéron responsable de la synthèse de PqsR est influencé par les deux autres systèmes du QS positivement par *las* et

⁷⁸ Lu, C.; Kirsch, B.; Zimmer, C.; De Jong, J. C.; Henn, C.; Maurer, C. K.; Müsken, M.; Häussler, S.; Steinbach, A.; Hartmann, R. W. Discovery of Antagonists of PqsR, a Key Player in 2-Alkyl-4-Quinolone- Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (3), 381–390.

⁷⁹ Nadal Jimenez, P.; Koch, G.; Thompson, J. A.; Xavier, K. B.; Cool, R. H.; Quax, W. J. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, *76* (1), 46–65.

négativement par *rhl*⁸⁰. L'interaction de HHQ avec le récepteur PqsR conduit à une augmentation de plusieurs facteurs de virulence comme pyocyanine, LecA et l'élastase⁸¹.

4. CONCLUSIONS

Les interactions de ***Pa*** avec les autres microorganismes, dont ***Sa***, sont dépendantes de plusieurs facteurs qui déterminent la dynamique de compétition ou de synergie entre les deux bactéries. Ces interactions sont souvent liées à la sécrétion des molécules du QS, parmi lesquelles les alkenylquinolèines ont un rôle important. Nous avons centré nos travaux de recherche sur ces composés afin de déterminer leur rôle dans les interactions antagonistes ***Sa-Pa***.

Si on considère que les infections par ***Pa*** sont une des causes majeures de mortalité et de morbidité des patients atteints de MV, il est important de connaître la possible implication de ces molécules chez ces patients. Cette connaissance pourrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie de ces infections et d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques et diagnostiques.

Dans ce dernier cadre, les molécules du QS faisant partie de la classe de AQ pourraient présenter un intérêt dans l'identification des infections par ***Pa***. Barr *et al.*⁸² ont conduit des études sur le dosage de AQs dans les expectorations, urine et plasma des patients. Ainsi, cette équipe a montré qu'une corrélation existe entre ces molécules et la survenue d'infections à ***Pa***⁸³. Des premiers résultats ont notamment permis de mettre en évidence l'intérêt du dosage

⁸⁰ Wade, D. S.; Calfee, M. W.; Rocha, E. R.; Ling, E. A.; Engstrom, E.; Coleman, J. P.; Pesci, E. C. Regulation of Pseudomonas Quinolone Signal Synthesis in Pseudomonas Aeruginosa. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (13), 4372–4380.

⁸¹ Baker, Y. R.; Hodgkinson, J. T.; Florea, B. I.; Alza, E.; Galloway, W. R. J. D.; Grimm, L.; Geddis, S. M.; Overkleeft, H. S.; Welch, M.; Spring, D. R. Identification of New Quorum Sensing Autoinducer Binding Partners in: Pseudomonas Aeruginosa Using Photoaffinity Probes. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (11), 7403–7411.

⁸² Barr, H. L.; Halliday, N.; Barrett, D. A.; Williams, P.; Forrester, D. L.; Peckham, D.; Williams, K.; Smyth, A. R.; Honeybourne, D.; L. Whitehouse, J.; et al. Diagnostic and Prognostic Significance of Systemic Alkyl Quinolones for P. Aeruginosa in Cystic Fibrosis: A Longitudinal Study. *J. Cyst. Fibros.* **2017**, *16* (2), 230–238.

⁸³ Camara, M.; Williams, P.; Barrett, D. A.; Halliday, N.; Knox, A. J.; Smyth, A. R.; Fogarty, A. W.; Barr, H. L.; Forrester, D. Alkyl quinolones as biomarkers of pseudomonas aeruginosa infection and uses there of qssm, **2014**.

des molécules HHQ et HQNO. Les deux molécules pourraient ainsi être envisagées comme des biomarqueurs de l'infection par *Pa*. Plus particulièrement, HHQ pourrait être considéré comme un marqueur précoce de l'infection.

Sur la base de ces nouvelles découvertes, il est important de comprendre les mécanismes de sécrétion et d'activité de ces molécules, pour permettre de mieux comprendre les interactions microbiennes, dont *Pa-Sa*, au sein des poumons MV.

Chapitre 2.
MOLECULES AQs : données
bibliographiques

Chapitre 2. MOLECULES AQs : données bibliographiques

Les molécules identifiées dans le chapitre précédent possèdent toutes un motif commun de type 4-hydroxyquinoléine. Dans ce chapitre, nous passerons en revue les synthèses connues des quinoléines en général en décrivant plus particulièrement les modes de préparation des 4-hydroxyquinoléines alkylées ou non en position 2.

1. LE NOYAU QUINOLEINE

La quinoléine (Figure 2.1) a été découverte en 1834 par Friedlieb Rougè⁸⁴ après distillation du goudron de houille. La quinoléine est une base tertiaire faible, (pKa 4,80 dans l'eau⁸⁵) également utilisée comme réactif nucléophile ou électrophile. Les quinoléines ont été identifiées dans différents organismes naturels comme des plantes⁸⁶ et des bactéries⁸⁷.

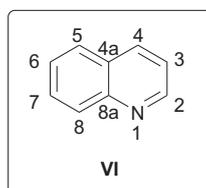


Figure 2.1 Quinoléine et numérotation IUPAC.

Les propriétés physicochimiques et biologiques intéressantes montrées par cet hétérobicyclic azoté, ont entraîné la synthèse d'une grande diversité de composés dérivés de

⁸⁴ Nainwal, L. M.; Tasneem, S.; Akhtar, W.; Verma, G.; Khan, M. F.; Parvez, S.; Shaquiquzzaman, M.; Akhter, M.; Alam, M. M. Green Recipes to Quinoline: A Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *164*, 121–170.

⁸⁵ Chawla, B.; Mehta, S. K. Hydrogen-Bonded Species of Pyridinium Halogenoacetates. 2. Thermometric Behavior in Aprotic Solvents. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (12), 2650–2655.

⁸⁶ Michael, J. P. Quinoline, Quinazoline and Acridone Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21* (5), 650–668.

⁸⁷ Hays, B. Y. E. E.; Wells, I. C.; Jacobs, F. A.; Thayer, S. A.; Wade, J. Antibiotic Substances Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Development* **1945**, *159*(3), 725–750.

la quinoléine. Les voies de synthèse sont nombreuses selon les substituants présents sur le noyau⁸⁸. Pour ce travail, les modes de préparation les plus classiques ont été sélectionnés :

- (i) la synthèse de Combes,
- (ii) la cyclisation de Conrad-Limpach et la synthèse de Knorr,
- (iii) la synthèse de Doebner et von Miller,
- (iv) la cyclisation de Camps.

Ces quatre synthèses permettent d'obtenir des dérivés de la quinoléine à partir d'arylamines substituées ou non et sont décrites dans le livre de René Milcent « Chimie Organique Hétérocyclique »⁸⁹.

La synthèse de Combes (Schéma 2.1) consiste à condenser une arylamine avec un composé 1,3-dicarbonylé, tel qu'une β -dicétone ou un aldéhyde- β -cétonique. La réaction est réalisée à 100 °C, en milieu acide fort, pour former intermédiairement une imine qui conduit au cycle quinoléine substitué en 2 et 4 après substitution électrophile aromatique intramoléculaire et déshydratation.

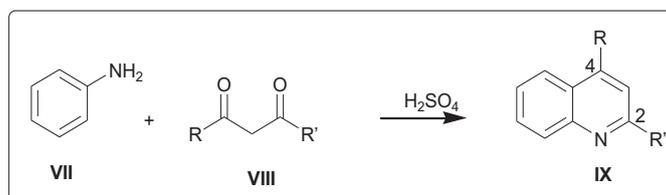


Schéma 2.1 Synthèse de quinoléines substituées en positions 2 et 4 selon Combes.

La cyclisation de Conrad-Limpach (Schéma 2.2) permet, quant à elle, d'obtenir un dérivé de quinoléin-4-one par condensation d'une arylamine avec un β -cétoester. Une première étape aboutit à la formation du β -arylaminoacrylate qui conduit à la quinoléin-4-one substituée en position 2 après cyclisation à haute température. Si cette dernière étape est

⁸⁸ Marella, A.; Tanwar, O. P.; Saha, R.; Ali, M. R.; Srivastava, S.; Akhter, M.; Shaquiquzaman, M.; Alam, M. M. Quinoline: A Versatile Heterocyclic. *Saudi Pharm. J.* **2013**, 21 (1), 1–12.

⁸⁹ Milcent, R. *Chimie Organique Hétérocyclique*, EDP Scienc. **2003**, 415-419.

réalisée à plus basse température, le produit final sera la quinoléin-2-one substituée en position 4 (synthèse de Knorr, Schéma 2.3).

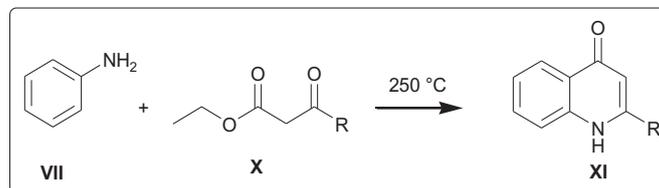


Schéma 2.2 Préparation de quinoléin-4-ones *via* la synthèse de Conrad-Limpach.

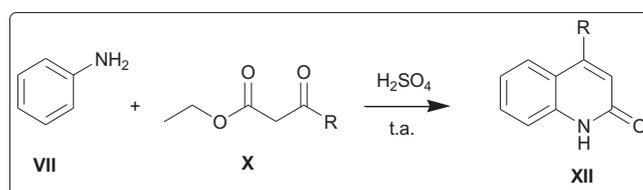


Schéma 2.3 : Préparation de quinoléin-2-ones *via* la synthèse de Knorr.

La synthèse décrite par Doebner et von Miller (Schéma 2.4) consiste à condenser une arylamine et un composé carbonylé α,β -insaturé. Cette méthode est intéressante puisqu'elle permet d'accéder à une plus vaste diversité de substituants sur la quinoléine finale.

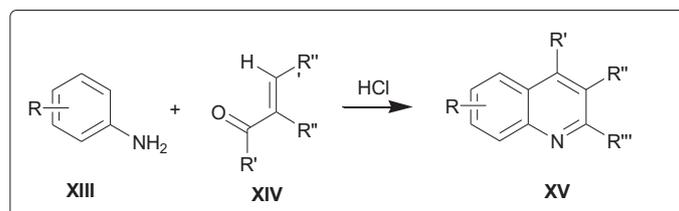


Schéma 2.4 : Synthèse de quinoléines selon la méthode de Doebner et von Miller.

Enfin, la cyclisation de Camps (Schéma 2.5) permet d'obtenir les dérivés 2- ou 4-hydroxyquinoléines à partir de *N*-acylarylamines substituées en *ortho* par un groupement acyle, alcoxycarbonyle ou nitrile. La réaction est menée en milieu basique (OH⁻, triéthylamine, pyridine ou pipéridine) et peut conduire selon le cas à une 2-hydroxy ou 4-hydroxyquinoléine.

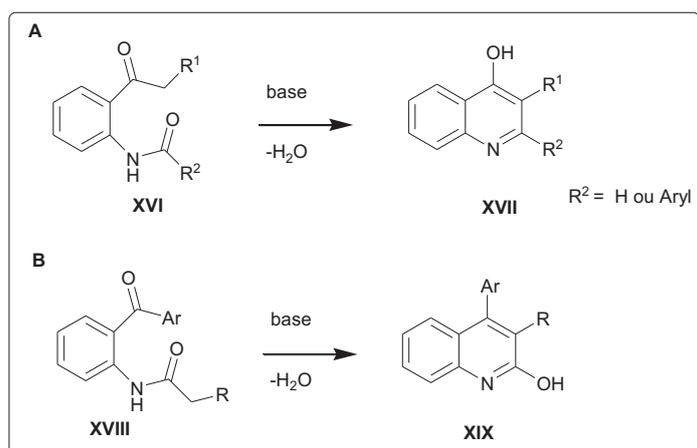


Schéma 2.5 Synthèse de dérivés 2- ou 4-hydroxyquinoléines par cyclisation de Camps.

2. LES 4-HYDROXYQUINOLEINES

2.1. Structure

Les hydroxyquinoléines (HQ) constituent une des familles les plus importantes des dérivés de la quinoléine. Ces composés sont constitués d'un noyau quinoléine, substitué par un groupement hydroxyle le plus souvent en position 2, 4 ou 8 (Figure 2.2).

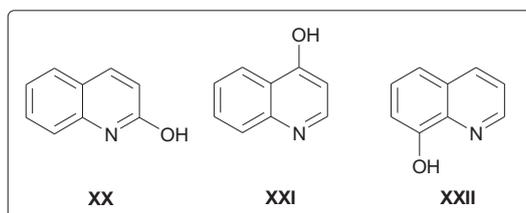


Figure 2.2 : Structures chimiques des différents isomères de l'hydroxyquinoléine.

Parmi celles-ci, les 8-hydroxyquinoléines (**XXII**) présentent de nombreuses activités biologiques⁹⁰ notamment anti-tumorales et antimicrobiennes⁹¹, anti-oxydantes^{92,93}, anti-fongiques⁹⁴, anti-virales⁹⁵, anti-convulsivantes et anti-inflammatoires⁹⁶. Cette vaste gamme d'activités pharmacologiques montrée par des dérivés de la 8-hydroxyquinoléine s'explique du fait de la grande diversité moléculaire offerte par cette plateforme chimique et par sa capacité à complexer des métaux⁹¹ comme le zinc (II), le cuivre (II), l'aluminium (III) ou le ruthénium (II).

La 4-hydroxyquinoléine (4-HQ, **XXI**) présente des caractéristiques chimiques et biologiques similaires à la 8-hydroxyquinoléine. Les dérivés de la 4-hydroxyquinoléine présentent donc un potentiel thérapeutique important.

⁹⁰ Song, Y.; Xu, H.; Chen, W.; Zhan, P.; Liu, X. 8-Hydroxyquinoline: A Privileged Structure with a Broad-Ranging Pharmacological Potential. *Medchemcomm* **2015**, *6* (1), 61–74.

⁹¹ dos Santos Chagas, C.; Fonseca, F. L. A.; Bagatin, I. A. Quinoline-Derivative Coordination Compounds as Potential Applications to Antibacterial and Antineoplastic Drugs. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *98* (January), 1043–1052.

⁹² Supong, K.; Thawai, C.; Supothina, S.; Auncharoen, P.; Pittayakhajonwut, P. Antimicrobial and Anti-Oxidant Activities of Quinoline Alkaloids from *Pseudomonas Aeruginosa* BCC76810. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 100–106.

⁹³ Cherdtrakulkiat, R.; Boonpangrak, S.; Sinthupoom, N.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. Derivatives (Halogen, Nitro and Amino) of 8-Hydroxyquinoline with Highly Potent Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Biochem. Biophys. Reports* **2016**, *6*, 135–141.

⁹⁴ Pippi, B.; Lopes, W.; Reginatto, P.; Silva, F. É. K.; Joaquim, A. R.; Alves, R. J.; Silveira, G. P.; Vainstein, M. H.; Andrade, S. F.; Fuentefria, A. M. New Insights into the Mechanism of Antifungal Action of 8-Hydroxyquinolines. *Saudi Pharm. J.* **2019**, *27* (1), 41–48.

⁹⁵ Shah, P.; Naik, D.; Jariwala, N.; Bhadane, D.; Kumar, S.; Kulkarni, S.; Bhutani, K. K.; Singh, I. P. Synthesis of C-2 and C-3 Substituted Quinolines and Their Evaluation as Anti-HIV-1 Agents. *Bioorg. Chem.* **2018**, *80*, 591–601.

⁹⁶ Oliveri, V.; Vecchio, G. 8-Hydroxyquinolines in Medicinal Chemistry: A Structural Perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 252–274.

2.2. La tautomérie

Une importante caractéristique des hydroxyquinoléines est la tautomérie (Schéma 2.6).

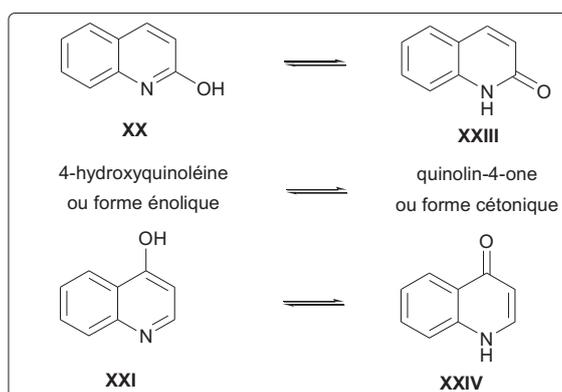


Schéma 2.6 Tautomérie des dérivés de 2- et 4-hydroxyquinoléines

L'équilibre tautomérique peut être modifié en milieu acide ou par excitation photochimique⁹⁷ (Schéma 2.7).

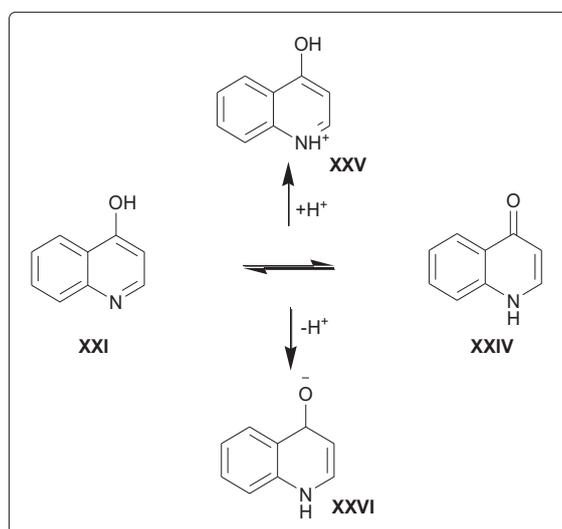


Schéma 2.7 Etude sur la tautomérie de la 4-hydroxyquinoléine⁹⁷.

⁹⁷ Sherin, P. S.; Gritsan, N. P.; Tsentlovich, Y. P. Experimental and Quantum Chemical Study of Photochemical Properties of 4-Hydroxyquinoline. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, 8 (11), 1550–1557.

Chaque tautomère possède des caractéristiques physico-chimiques différentes, leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques peuvent donc varier. Il est donc important d'associer une forme tautomère précise à l'activité biologique identifiée. Des études d'amarrage peuvent être mises en place pour prévoir quelle est la meilleure forme tautomère pour obtenir l'activité biologique recherchée⁹⁸.

Des études bien précises ont été réalisées sur la tautomérie de la 2-hydroxypyridine utilisée comme modèle. En effet, plusieurs facteurs influencent la tautomérie céto-énolique : (i) le pH du milieu ; (ii) l'état solide, liquide ou gazeux ; (iii) les substituants du cycle aromatique. Une étude de la tautomérie en phase gazeuse, réalisée par spectroscopie UV et IR, montre que la plupart des composés présentant un cycle pyridine existent prioritairement sous la forme énolique⁹⁹.

Pour les 4-hydroxyquinoléines, le phénomène de tautomérie est surtout influencé par le solvant, en particulier par sa constante d'acidité ou pKa qui va déterminer la prévalence d'une des deux formes tautomères. Une étude RMN a montré que le tautomère énolique de la 4-hydroxyquinoléine est prédominant en solution dans le DMSO-d₆, et, à l'inverse, la forme cétonique est surtout présente dans des solvants tels que le chloroforme ou le méthanol deutérés⁹⁹.

Ces résultats ont été confirmés par une étude menée par l'équipe de M. Bolte et H. Schwalbe¹⁰⁰ qui a montré que le tautomère cétonique était la forme principale de la 4-hydroxyquinoléine tant en phase solide (diffraction des rayons X et FT-IR) qu'en solution (RMN 1D et 2D dans DMSO-d₆ ou D₂O) par comparaison avec le dérivé *O*-méthylé en position 4 (Figure 2.3).

⁹⁸ Horta, P.; Kuş, N.; Henriques, M. S. C.; Paixão, J. A.; Coelho, L.; Nogueira, F.; O'Neill, P. M.; Fausto, R.; Cristiano, M. L. S. Quinolone-Hydroxyquinoline Tautomerism in Quinolone 3-Esters. Preserving the 4-Oxoquinoline Structure To Retain Antimalarial Activity. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (24), 12244–12257.

⁹⁹ Stanovnik, B.; Tišler, M.; Katritzky, A. R.; Denisko, O. V. The Tautomerism of Heterocycles: Substituent Tautomerism of Six-Membered Ring Heterocycles. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2006**, *91* (64), 1–134.

¹⁰⁰ Nasiri, H. R.; Bolte, M.; Schwalbe, H. Tautomerism of 4-hydroxy-4(1h) quinolon. *Heterocycl. Commun.* **2006**, *12* (5), 319–322.

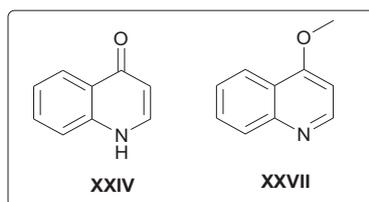


Figure 2.3 Représentation de la quinoléin-4-one et de son dérivé *O*-méthylé en position 4.

La structure cristalline par diffraction des rayons X de la quinoléin-4-one met en évidence un dimère stabilisé par des liaisons hydrogène intramoléculaires entre l'hydrogène de la fonction amine et le groupement carbonyle^{100,101}.

¹⁰⁰ Nasiri, H. R.; Bolte, M.; Schwalbe, H. Tautomerism of 4-hydroxy-4(1h) quinolon. *Heterocycl. Commun.* **2006**, *12* (5), 319–322.

¹⁰¹ Monastyrskiy, A.; Kyle, D. E.; Manetsch, R. 4(1H)-Pyrdione and 4(1H)-Quinolone Derivatives as Antimalarials with Erythrocytic, Exoerythrocytic, and Transmission Blocking Activities. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14* (14), 1693–1705.

Tableau 2.1 : Déplacements chimiques enregistrés en RMN ^1H (250 MHz) et ^{13}C (62,5 MHz) dans le DMSO- d_6 pour la quinoléin-4-one **XXIV** et la 4-méthoxyquinoléine **XXVII**.

Quinoléine-4-one (XXIV)		4-Méthoxyquinoléine (XXVII)	
RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
11,78 (NH)	-	-	-
-	176,8 (C4)	-	161,4 (C4)
8,1 (H5)	124,9(C5)	8,77 (H2)	151,5 (C2)
7,9 (H2)	139,3 (C2)	8,18 (H5)	121,3 (C5)
7,6 (H6)	131,5 (C6)	8,01 (H8)	128,4 (C8)
7,5 (H8)	118,2 (C8)	7,79 (H6)	129,9 (C6)
7,3 (H7)	123,0 (C7)	7,60 (H7)	125,6 (C7)
6,0 (H3)	108,6 (C3)	7,07 (H3)	100,9 (C3)
-	125,7 (C8a)	-	120,5 (C8a)
-	140,0 (C4a)	-	148,4 (C4a)
-	-	4,03 (CH ₃)	56,0 (CH ₃)

Cependant, il reste difficile de connaître avec certitude la forme tautomérique adoptée par les 4-hydroxyquinoléines¹⁰². En effet, des études plus anciennes ont mis en évidence des résultats contradictoires tels qu'une prévalence de la forme énolique de ces composés par analyse IR en solution¹⁰³ ou la co-existence de leurs deux tautomères montrée par UV-Vis en

¹⁰² Karpińska, G.; Mazurek, A. P.; Dobrowolski, J. C. Hydroxyquinolines: Constitutional Isomers and Tautomers. *Comput. Theor. Chem.* **2011**, 972 (1–3), 48–56.

¹⁰³ Zaitsev, B. E.; Andronova, N. A.; Dyumaev, K. M.; Smirnov, L. D. IR Spectra and Structures of 3-Hydroxyquinoline, 4-Hydroxyisoquinoline, and Their Derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1971**, 7 (11), 1429–1432.

milieu polaire¹⁰⁴. De plus, il a été établi que la forme cétonique des 4-hydroxyquinoléines prévaut souvent dans les tests physiques comme la spectrométrie d'absorption UV visible ; ceci en raison de la stabilité de cette forme qui constitue un vinylogue d'une fonction amide. Cependant, le caractère phénolique de ces composés reste présent, comme mis en évidence dans certaines réactions telles que la bromation ou l'ortho-formylation en position 3 du noyau 4-hydroxyquinoléine ainsi que la chloration par POCl₃ en position 4¹⁰⁵.

D'autres études relatives à la tautomérie des quinoléines ont été réalisées sur l'acide kynurénique pour connaître les différentes espèces en présence. Ce composé est un dérivé de la 4-hydroxyquinoléine qui présente une fonction acide carboxylique en position 2. Cette molécule est commercialement disponible sous la forme hydratée. Pogoda *et al.*¹⁰⁶ ont montré que, à l'état solide, ce composé pouvait adopter trois formes tautomériques (Figure 2.4) différentes en fonction du solvant de recristallisation : tautomère cétonique (**XXVIII**), énolique (**XXIX**) ou la forme zwitterionique du précédent (**XXX**).

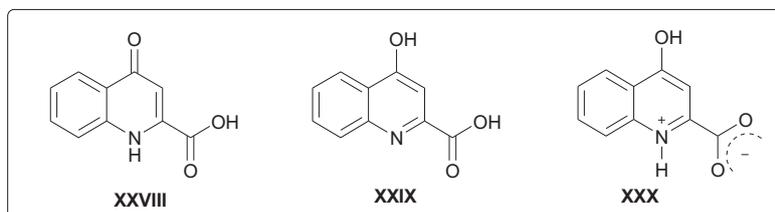


Figure 2.4 Représentation des différents tautomères de l'acide kynurénique.

Le tautomère énolique a été mis en évidence après recristallisation dans l'eau ou l'acétate d'éthyle. Il s'agit également de la forme prédominante dans le produit hydraté commercial. Le tautomère cétonique est, quant à lui, formé après recristallisation dans le DMSO¹⁰⁶. Enfin, cette étude montre comment la présence de substituants et l'état d'hydratation de la molécule peuvent également modifier la prédominance d'un tautomère par rapport à l'autre.

¹⁰⁴ Bryson, A. The Ionization Constants of 3-Substituted Pyridines, 3-Substituted Quinolines and 4-Substituted Isoquinolines. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (18), 4871–4877.

¹⁰⁵ Reitsema, R. H. The Chemistry of 4-Hydroxyquinoleines. *Synthesis (Stuttg.)*. **1947**, *111*, 43–68.

¹⁰⁶ Pogoda, D.; Janczak, J.; Pawlak, S.; Zaworotko, M.; Videnova-Adrabinska, V. Tautomeric Polymorphism of the Neuroactive Inhibitor Kynurenic Acid. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2019**, *75*, 793–805.

Les quinoléines sont des composés aromatiques dont les substituants vont influencer (i) la basicité de l'atome d'azote ; (ii) la délocalisation des électrons π , (iii) la stabilité des tautomères et enfin (iv) la contribution de l'azote dans les établissements des interactions intermoléculaires¹⁰⁷. La présence de substituants sur le noyau quinoléine influe donc grandement l'équilibre tautomérique de la 4-hydroxyquinoléine. En présence d'une fonction acide carboxylique en position 3, la forme hydroxyquinoléine apparaît être celle plus stable grâce à la formation de liaisons hydrogène entre le proton phénolique et la fonction carbonyle de l'acide. Par exemple, l'analyse UV de la forme neutre de l'acide 4-hydroxyquinoléine-3-carboxylique montre une prépondérance de la forme cétonique par rapport à la forme énolique en solution. Cette prépondérance est confirmée par l'analyse par RMN ¹³C du solide en comparaison avec un dérivé d'acide 4-oxoquinoléine-3-carboxylique *N*-benzylé¹⁰⁸. Enfin, l'équilibre tautomérique de dérivés de type 2-aryl-4-hydroxyquinoléine a été étudié en phase gazeuse par GC-MS, en phase liquide par RMN et en phase solide par IR et diffraction des rayons X en comparaison avec les résultats obtenus avec une quinoléin-4-one *N*-méthylée (Schéma 2.8)¹⁰⁹.

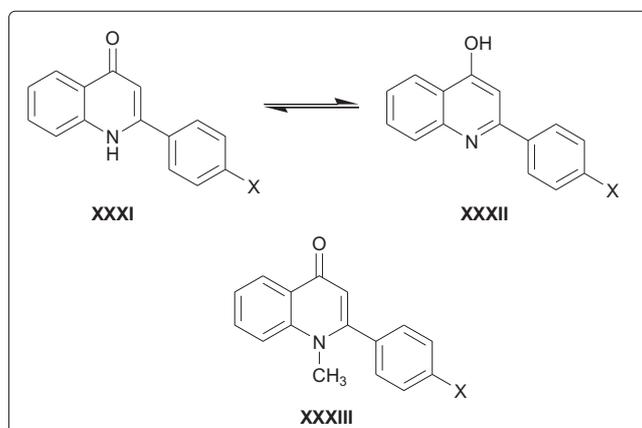


Schéma 2.8 Etude sur la tautomérie des 2-aryl-4-hydroxyquinoléines ¹⁰⁹.

¹⁰⁷ Szatyłowicz, H.; Stasyuk, O. A.; Krygowski, T. M. *Substituent Effects in Heterocyclic Systems*; Elsevier Ltd, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2015**, *116*, 137–192

¹⁰⁸ de la Cruz, A.; Elguero, J.; Goya, P.; Martínez, A.; Pfeleiderer, W. Tautomerism and Acidity in 4-Quinolone-3-Carboxylic Acid Derivatives. *Tetrahedron* **1992**, *48* (29), 6135–6150.

¹⁰⁹ Mphahlele, M. J.; El-Nahas, A. M. Tautomeric 2-Arylquinolin-4(1H)-One Derivatives- Spectroscopic, X-Ray and Quantum Chemical Structural Studies. *J. Mol. Struct.* **2004**, *688* (1–3), 129–136.

A l'état solide ou liquide, toutes les données obtenues indiquent la prévalence de la forme cétonique. Par contre, en phase gazeuse les deux tautomères sont en équilibre.

Dans le cadre de la conception et du développement d'un principe actif en hydroxyquinoléine, l'activité biologique est souvent liée à la forme tautomérique en présence. Un des exemples illustrant le mieux cette influence est celui des fluoroquinolones, molécules antibactériennes (Figure 2.5).

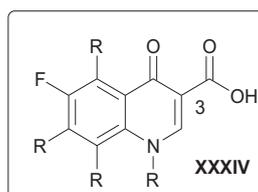


Figure 2.5 Structure générale des composés fluoroquinolones.

Ces molécules se trouvent principalement sous forme cétonique. La fonction carbonyle en position 4 ainsi que le groupement acide carboxylique en position 3 sont fondamentales d'une part, pour la liaison avec la gyrase, et d'autre part, dans le transport de bactéries¹¹⁰. En effet, ces deux groupements C=O sont indispensables à la chélation des métaux et à la formation des liaisons hydrogènes avec les bases de l'ADN^{111,112}.

Par ailleurs, une étude a été réalisée sur les différentes formes tautomères de dérivés 5- ou 7-alkylés de la 4-hydroxyquinoléine, susceptibles de présenter un effet sur *Plasmodium falciparum* (Schéma 2.9)⁹⁸.

Les auteurs ont alors synthétisé deux isomères **XXXV** et **XXXVI**, chacun représentatif d'une forme tautomère et présentant des différences de déplacements chimiques en RMN du

⁹⁸ Horta, P.; Kuş, N.; Henriques, M. S. C.; Paixão, J. A.; Coelho, L.; Nogueira, F.; O'Neill, P. M.; Fausto, R.; Cristiano, M. L. S. Quinolone-Hydroxyquinoline Tautomerism in Quinolone 3-Esters. Preserving the 4-Oxoquinoline Structure To Retain Antimalarial Activity. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (24), 12244–12257.

¹¹⁰ Andersson, M. I.; MacGowan, A. P. Development of the Quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51* (90001), 1–11.

¹¹¹ Sissi, C.; Palumbo, M. The Quinolone Family: From Antibacterial to Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2003**, *3* (6), 439–450.

¹¹² Emami, S.; Shafiee, A.; Alirez, F. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. *Iran. J. Pharm. Res.* **2005**, *4* (3), 123–136.

proton. Comme indiqué dans le schéma 2.9, deux méthodes ont été suivies pour préparer ces deux quinoléines en 3 étapes à partir du 3-nitrotoluène *via* un précurseur commun **XXXIV** dérivé de diéthylmalonate. Ce dernier composé a été cyclisé 1) dans des conditions à haute température pour conduire à la 7-méthyl-4-oxoquinoléine-3-carboxylate d'éthyle **XXXV**, 2) en présence de POCl₃ à reflux pour obtenir la 5-méthyl-4-hydroxyquinoléine-3-carboxylate d'éthyle **XXXVI**.

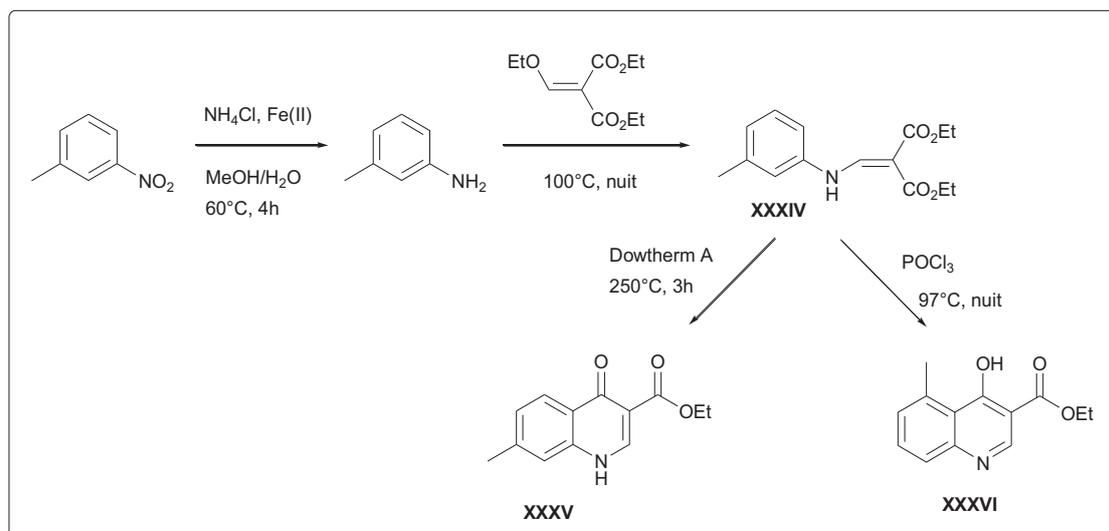


Schéma 2.9 Etude de tautomérie sur des dérivés 5- ou 7-alkylés de la 4-hydroxyquinoléine⁹⁸.

L'activité antiplasmodiale a été évaluée *in vitro* pour ces deux dérivés sur des souches de *P. falciparum* Dd2 résistantes à la chloroquine et à la méfloquine. Par ailleurs des études d'amarrage avaient montré que le dérivé 4-oxo devait présenter un meilleur profil pharmacologique que le dérivé 4-hydroxy, du fait d'interactions plus nombreuses dans le site actif de l'enzyme. Cependant, les composés **XXXV** et **XXXVI** ont tous les deux montré une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) micromolaire (3,03 μ M pour **XXXV** et 5,89 μ M pour **XXXVI**). Les auteurs expliquent ce résultat en invoquant d'une part, une biodisponibilité du dérivé 4-oxo plus faible ($\text{clogP}(\mathbf{XXXV})=1,9 \pm 0,4$ vs $\text{clogP}(\mathbf{XXXVI})=2,8 \pm 0,5$) et d'autre part, une action du composé 4-hydroxy dans une autre poche de l'enzyme. Ceci confirme l'importance de la tautomérie pour comprendre l'activité biologique des composés de type hydroxyquinoléine.

⁹⁸ Horta, P.; Kuş, N.; Henriques, M. S. C.; Paixão, J. A.; Coelho, L.; Nogueira, F.; O'Neill, P. M.; Fausto, R.; Cristiano, M. L. S. Quinolone-Hydroxyquinoline Tautomerism in Quinolone 3-Esters. Preserving the 4-Oxoquinoline Structure To Retain Antimalarial Activity. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (24), 12244–12257.

2.3. Synthèses des 4-hydroxyquinoléines

Les 4-HQ sont synthétisées par les voies classiques de formation du noyau quinoléique (voir paragraphe 1, page 60), en particulier les cyclisations de Conrad-Limpach et de Camps. Voici d'autres exemples de synthèses alternatives.

Des structures comme les 4-hydroxyquinoléine-2,3-dicarboxylates de diméthyles peuvent être synthétisées selon différents schémas réactionnels. Une méthode décrite récemment par Çelik *et al.*¹¹³ permet notamment d'obtenir les dérivés **XXXIX** avec d'excellents rendements à partir de *N*-(2-aminobenzoyl)benzotriazole (**XXXVII**) en présence d'acétylènedicarboxylate de diméthyle (**XXXVIII**) *via* une addition de Michael (Schéma 2.10).

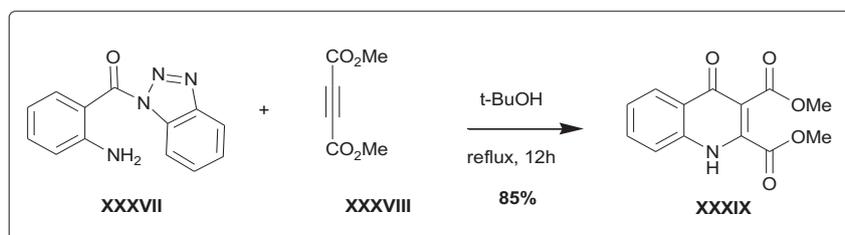


Schéma 2.10 Synthèse de la 4-hydroxyquinoléine-2,3-dicarboxylate de diméthyle **XXXIX** à partir d'un dérivé de benzotriazole¹¹³.

Les composés **XXXIX** peuvent également être préparés à partir de dérivés de l'indole en deux étapes : (i) ouverture du cycle indole suivie de (ii) réarrangement du cycle en quinoléine. Witkop *et al.*¹¹⁴ ont été les premiers à décrire, en 1953, l'ouverture du cycle indole par oxydation (Schéma 2.11). Plus récemment, Balci *et al.*¹¹⁵ ont, quant à eux, mis au point la formation de 4-hydroxyquinoléine-2,3-dicarboxylates de méthyles **XXXIX** par ozonolyse de

¹¹³ Çelik, İ.; Yıldız, F. Synthesis of 4-Hydroxyquinoline-2,3-Dicarboxylates Using *N*-(2-Aminobenzoyl)Benzotriazoles. *Tetrahedron* **2017**, 73 (27–28), 3878–3882.

¹¹⁴ Witkop, B.; Goodwin, S. The Conversion of Tetrahydroharman Alkaloids into Derivatives of Linear Pyrroquinolones. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75 (14), 3371–3376.

¹¹⁵ Kapti, T.; Dengiz, C.; Balci, M. The Chemistry of Ethyl 3-(2-Ethoxy-2-Oxoethyl)-1 H -Indole-2-Carboxylate: Synthesis of Pyrimido[4,5- b]Indoles and Diethyl 4-Hydroxyquinoline-2,3-Dicarboxylate via Intramolecular Cyclizations. *Synth.* **2017**, 49 (8), 1898–1904.

l'indole **XL** à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec hydrolyse en milieu réducteur, suivie de la cyclisation en milieu basique du composé intermédiaire **XLI**.

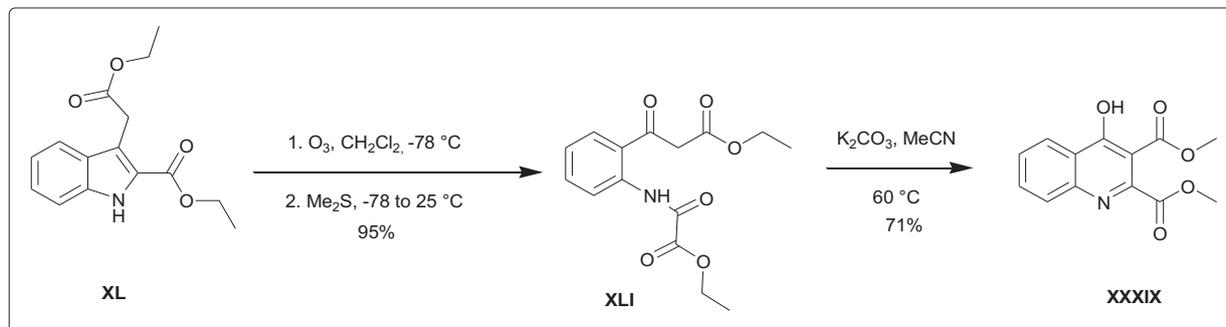


Schéma 2.11 Synthèse du dérivé 4-hydroxyquinoléine-2,3-dicarboxylate de diméthyle à partir d'un dérivé d'indole¹¹⁵.

Une autre voie de synthèse (Schéma 2.12) permet de préparer, les dérivés de 3-éthoxycarbonyl-4-hydroxyquinoléine *N*-oxyde **XLV** avec d'excellents rendements, en présence d'acide trifluoroacétique et à partir des alcools allyliques **XLIV**, issus d'une réaction d'addition de Baylis-Hillman entre des dérivés d'*ortho*-nitrobenzaldéhydes **XLII** et de l'acrylate d'éthyle **XLIII**¹¹⁶.

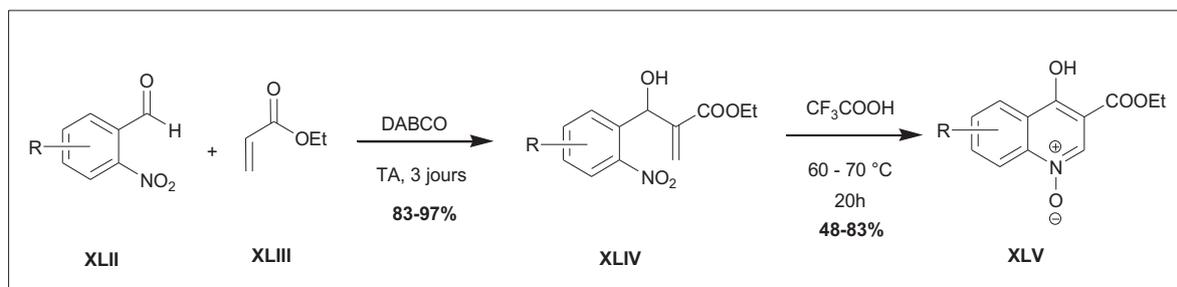


Schéma 2.12 Synthèse de dérivés *N*-oxyde 3-éthoxycarbonyl-4-hydroxyquinoléine à partir d'un produit d'addition de Baylis-Hillman¹¹⁶.

¹¹⁵ Kapti, T.; Dengiz, C.; Balci, M. The Chemistry of Ethyl 3-(2-Ethoxy-2-Oxoethyl)-1 H -Indole-2-Carboxylate: Synthesis of Pyrimido[4,5- b]Indoles and Diethyl 4-Hydroxyquinoline-2,3-Dicarboxylate via Intramolecular Cyclizations. *Synth.* **2017**, 49 (8), 1898–1904.

¹¹⁶ Kim, J. N.; Lee, K. Y.; Kim, H. S.; Kim, T. Y. Synthesis of *N*-Oxides from the Baylis – Hillman Adducts of *o*-Nitrobenzaldehydes. *Org. Lett.* **2000**, 2(3), 343-345.

Koskinen *et al.*¹¹⁷ ont développé une synthèse en deux étapes conduisant à des 4-HQ, substituées en position 6 et/ou 7 (Schéma 2.13). La première étape consiste en la formation de l'énamine **XLVI** à partir d'*ortho*-nitroacétophénones substituées **XLII** et de diméthylformamide diméthylacétal (DMF-DMA). Une deuxième étape de cyclisation en conditions réductrices conduit à la 4-HQ **XLVII** par transfert catalytique de dihydrogène à partir du cyclohexène.

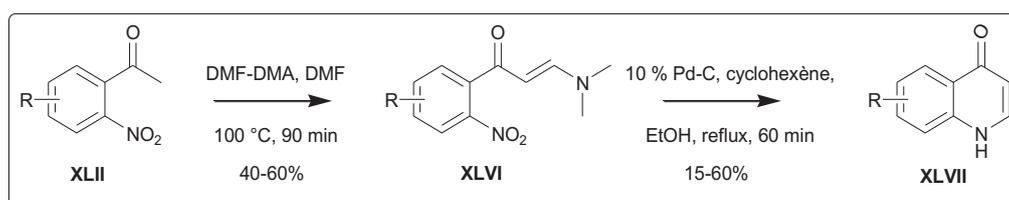


Schéma 2.13 Synthèse de dérivés de la 4-hydroxyquinoléine substitués en 6 ou 7¹¹⁷.

2.4. Activités biologiques

Les dérivés 4-HQ possèdent un vaste spectre d'activités biologiques sur de nombreuses cibles identifiées. Dans ce paragraphe, des exemples d'activité de dérivés 4-HQ sont montrés.

Des dérivés de 4-hydroxyquinoléine-3-carbohydrazide (**XLIX** et **L**) ont montré une activité anti-VIH (Schéma 2.14)¹¹⁸. L'activité biologique des composés en tant qu'antagonistes de l'intégrase du VIH-1 a été évaluée. Les composés **XLIX** et **L** montrent une activité anti-VIH-1 plus faible (5-32% d'effet inhibiteur sur le virus) que celle de l'agent antiviral de référence, l'azidothymidine (100% d'effet inhibiteur sur le virus). Cependant, du fait de leur cytotoxicité moins importante, ils constituent des chassis moléculaires de choix pour de futures investigations.

¹¹⁷ Tois, J.; Vahermo, M.; Koskinen, A. Novel and Convenient Synthesis of 4(1H)Quinolones. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (5), 735–737.

¹¹⁸ Hajimahdi, Z.; Zabihollahi, R.; Aghasadeghi, M. R.; Vahabpour, R.; Zarghi, A. Design, Synthesis, and Docking Studies of New 2-Benzoxazolinone Derivatives as Anti-HIV-1 Agents. *Med. Chem. Res.* **2013**, *63*, 192–197.

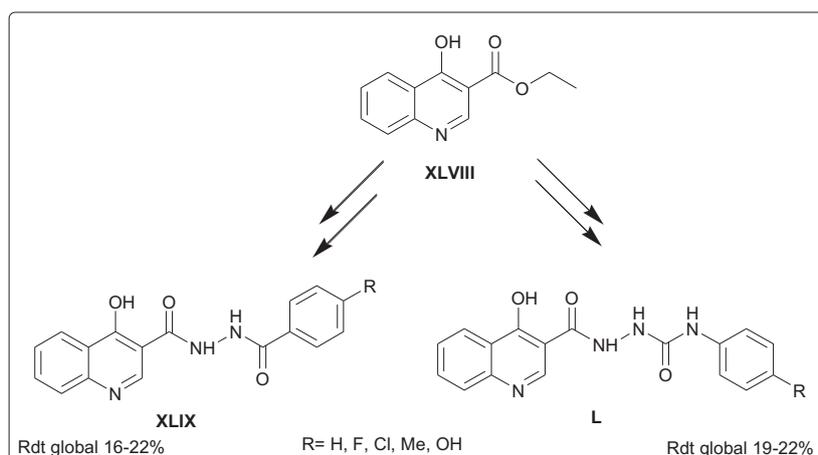


Schéma 2.14 Résumé de la synthèse de dérivés de 4-hydroxyquinoléine-3-carbohydrazides¹¹⁸.

Des analogues azotés du Diflunisal (Figure 2.6) ont montré une activité anti-inflammatoire en inhibant la synthèse de prostaglandines. De plus, ces molécules, testées en association avec des antibiotiques, ont permis d'améliorer l'activité anti bactérienne de ces derniers contre les bactéries à Gram +¹¹⁹.

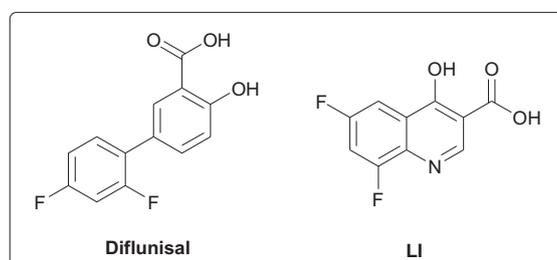


Figure 2.6 Structures du Diflunisal et de son analogue azoté (LI)¹¹⁹.

¹¹⁸ Hajimahdi, Z.; Zabihollahi, R.; Aghasadeghi, M. R.; Vahabpour, R.; Zarghi, A. Design, Synthesis, and Docking Studies of New 2-Benzoxazolinone Derivatives as Anti-HIV-1 Agents. *Med. Chem. Res.* **2013**, *63*, 192–197.

¹¹⁹ Carta, D.; Brun, P.; Dal Pra, M.; Bernabè, G.; Castagliuolo, I.; Ferlin, M. G. Synthesis and Preliminary Anti-Inflammatory and Anti-Bacterial Evaluation of Some Diflunisal Aza-Analogs. *Med. Chem. Commun.* **2018**, *9* (6), 1017–1032.

Le linomide est un exemple d'une autre classe très intéressante de 4-HQ, les 4-hydroxyquinoléine-3-carboxamides (Figure 2.7). Shi *et al.*¹²⁰ ont développé des dérivés du linomide montrant une activité angiogénique.

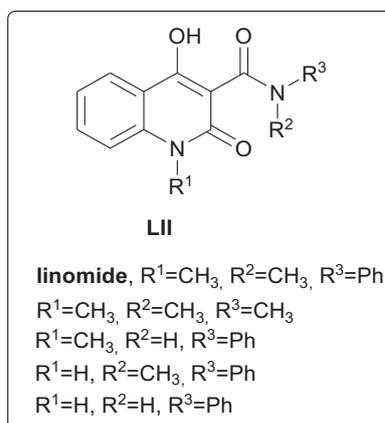


Figure 2.7 Dérivés du linomide montrant une activité angiogénique¹²⁰.

L'étude de Shi *et al.*¹²⁰ a mis en évidence que quelques représentants de cette famille de 4-HQ carboxamides montraient une activité anti-angiogénique supérieure à celle du linomide, notamment son métabolite *in vivo* avec R¹=H.

En outre, bien que l'essai clinique du linomide pour le traitement de la sclérose en plaque ait été interrompu en phase III pour cause de toxicité trop importante, d'autres études de pharmacomodulation ont permis de développer le laquinimod (Figure 2.8), analogue du linomide, dont l'activité immunomodulatrice s'est avérée supérieure à celle du chef de file, avec un profil de toxicité plus favorable¹²¹.

¹²⁰ Shi, J.; Xiao, Z.; Ihnat, M. A.; Kamat, C.; Pandit, B.; Hu, Z.; Li, P. K. Structure-Activity Relationships Studies of the Anti-Angiogenic Activities of Linomide. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (6), 1187–1189.

¹²¹ Jönsson, S.; Andersson, G.; Fex, T.; Fristedt, T.; Hedlund, G.; Jansson, K.; Abramo, L.; Fritzon, I.; Pekarski, O.; Runström, A.; et al. Synthesis and Biological Evaluation of New 1,2-Dihydro-4-Hydroxy-2-Oxo-3-Quinolinecarboxamides for Treatment of Autoimmune Disorders: Structure-Activity Relationship. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (8), 2075–2088.

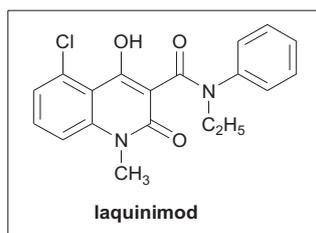


Figure 2.8 Structure du laquinimod ayant une activité immunomodulatrice¹²¹.

Deux autres dérivés carboxamides, H1521 et Y27 (Figure 2.9), ont été identifiés comme ayant une action importante dans la régulation de l'état inflammatoire. Ces deux composés sont capables de réduire le développement du lupus érythémateux disséminé chez les souris en agissant sur les cytokines^{122,123}.

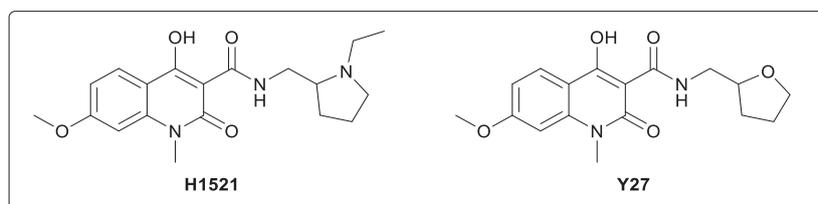


Figure 2.9 Deux structures de dérivés de HQ ayant une activité antinflammatoire^{122,123}

3. 2-ALKYL-4-HYDROXYQUINOLEINES

3.1. Synthèse et extraction

Parmi les 4-HQ, les dérivés de type 2-alkyl-4-hydroxyquinoléine (AQs) constituent une famille de molécules de plus en plus étudiée. Hays *et al.*⁸⁷ ont décrit pour la première fois en 1945 des composés antibactériens produits et isolés à partir de cultures de *P. aeruginosa*. Quelques années plus tard, la synthèse de trois de ces composés montrés en Figure 2.10 a été

⁸⁷ Hays, B. Y. E. E.; Wells, I. C.; Jacobs, F. A.; Thayer, S. A.; Wade, J. Antibiotic Substances Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Development* **1945**, *159*(3), 725–750.

¹²² Xiao, Z. Y.; Chen, S. H.; Zhou, W. X.; Zhang, Y. X.; Cheng, J. P.; Yang, R. F. H1521, a Novel Derivative of 4-Hydroxyquinoline-3-Carboxamide, Suppresses the Development of Lupus in Mice by Inducing Th1 Cytokine Profile in T Cells. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11* (4), 435–443.

¹²³ Xiao, Z. Y.; Chen, S. H.; Cheng, J. P.; Zhou, W. X.; Zhang, Y. X.; Yang, R. F.; Yun, L. H. Y27, a Novel Derivative of 4-Hydroxyquinoline-3-Formamide, Prevents the Development of Murine Systemic Lupus Erythematosus-like Diseases in MRL/Lpr Autoimmune Mice and BDF1 Hybrid Mice. *Arthritis Res. Ther.* **2012**, *14* (6), 1–13.

décrite. L'élucidation structurale a été montrée par caractérisation chimique, analyse centésimale et spectrométrie UV¹²⁴.

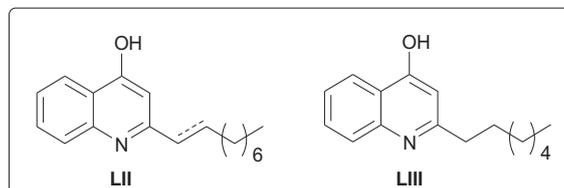


Figure 2.10 Premières structures AQ identifiées par Hays et Wells en 1945⁸⁷.

Les AQ présentent une structure générale présentée en Figure 2.11

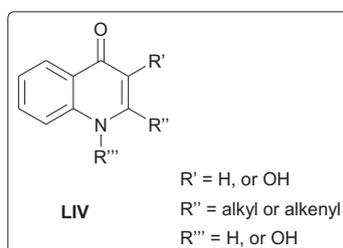


Figure 2.11 Structure générale des dérivés de type 2-alkyl ou 2-alkényl-4-hydroxyquinoléine.

Pa est un des principaux pathogènes opportunistes qui produit une large gamme de métabolites secondaires (Figure 2.12). Parmi ces derniers, cinquante AQs peuvent être dénombrés qui ne diffèrent que par (i) la présence ou l'absence d'une fonction hydroxyle en position 3, (ii) la longueur de la chaîne alkyle ou alkényle en position 2 et (iii) la présence d'un groupe *N*-oxyde sur l'azote du cycle quinoléine (dérivés AQNO)¹²⁵.

⁸⁷ Hays, B. Y. E. E.; Wells, I. C.; Jacobs, F. A.; Thayer, S. A.; Wade, J. Antibiotic Substances Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Development* **1945**, 159(3), 725–750.

¹²⁴ Wells, I. C. Antibiotic Substances Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*; Syntheses of Pyo Ib, Pyo Ic, and Pyo III. *J. Biol. Chem.* **1952**, 196 (1), 331–340.

¹²⁵ Fetzner, S.; Drees, S. L. Old Molecules, New Biochemistry. *Chem. Biol.* **2013**, 20 (12), 1438–1440.

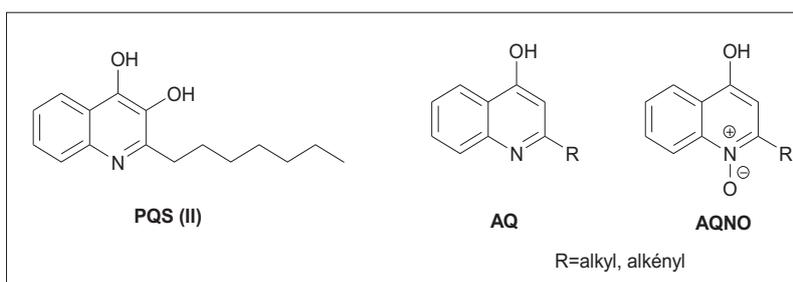


Figure 2.12 Principaux métabolites de *P. aeruginosa*.

Les AQs et AQ *N*-oxydes sont donc des composés essentiellement produits par *Pa* que la bactérie utilise comme molécules signalétiques dits « auto-inducteurs » dans un système de régulation de type « Quorum Sensing » (QS), contrôlant des facteurs de virulence comme la biosynthèse de la pyocyanine ou la formation de biofilms¹²⁶.

Il faut noter que ces molécules sont également produites par d'autres bactéries comme *Pseudonocardia sp.*^{127,128}, *Burkholderia sp.*¹²⁹ ou *Streptomyces*¹³⁰. Les molécules AQs peuvent être obtenues par synthèse chimique ou par extraction des souches bactériennes. De ce fait, les dérivés de type 2-alkyl-4-hydroxyquinoléine représentent un formidable potentiel pharmacologique et constituent une thématique d'étude qu'il est important d'explorer au vu des enjeux de lutte contre l'antibiorésistance.

La littérature relative à la synthèse chimique des AQs ou de leurs dérivés est abondante. Comme vu précédemment (cf. Schéma 2.2, paragraphe 1, page 62), la réaction de

¹²⁶ Witzgall, F.; Depke, T.; Hoffmann, M.; Empting, M.; Brönstrup, M.; Müller, R.; Blankenfeldt, W. The Alkylquinolone Repertoire of *Pseudomonas Aeruginosa* Is Linked to Structural Flexibility of the Fabh-like 2-Heptyl-3-Hydroxy-4(1h)-Quinolone (Pqs) Biosynthesis Enzyme Pqsbc. *ChemBioChem* **2018**, *19* (14), 1531–1544.

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from *Pseudonocardia Sp.* *European J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (35), 5799–5802.

¹²⁸ Geddis, S. M.; Coroama, T.; Forrest, S.; Hodgkinson, J. T.; Welch, M.; Spring, D. R. Synthesis and Biological Evaluation of 1,2-Disubstituted 4-Quinolone Analogues of *Pseudonocardia Sp.* Natural Products. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 2680–2688.

¹²⁹ Li, D.; Oku, N.; Hasada, A.; Shimizu, M.; Igarashi, Y. Two New 2-Alkylquinolones, Inhibitory to the Fish Skin Ulcer Pathogen *Tenacibaculum Maritimum*, Produced by a Rhizobacterium of the Genus *Burkholderia Sp.* *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 1446–1451.

¹³⁰ Kim, H.; Hwang, J. Y.; Chung, B.; Cho, E.; Bae, S.; Shin, J.; Oh, K. B. 2-Alkyl-4-Hydroxyquinolines from a Marine-Derived *Streptomyces Sp.* Inhibit Hyphal Growth Induction in *Candida Albicans*. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (133).

Conrad-Limpach impliquant la condensation d'une aniline et d'un β -cétoester, reste encore une méthode de choix. Cependant, d'autres approches mettant en œuvre des conditions de température plus douces, ont également été développées. En particulier des réactions pallado-catalysées, par exemple de type couplage de Sonogashira (Schéma 2.15)¹³¹. Les conditions réactionnelles de ce couplage ont été mises au point pour obtenir des rendements moyens à excellents en quinoléin-4-ones substituées en position 2 (**LVIII**) et permettre une plus grande chimio-compatibilité avec les substituants présents sur la 2-iodoaniline **LV** tels que les groupements nitro ou bromo. La réaction de couplage a donc été réalisée à température ambiante en présence du système catalytique Pd(OAc)₂, Mo(CO)₆ et [HP(*t*-Bu)₃]BF₄ suivie par l'addition de diéthylamine pour induire la cyclisation de l'intermédiaire arylalkynone **LVII** (Schéma 2.15)¹³².

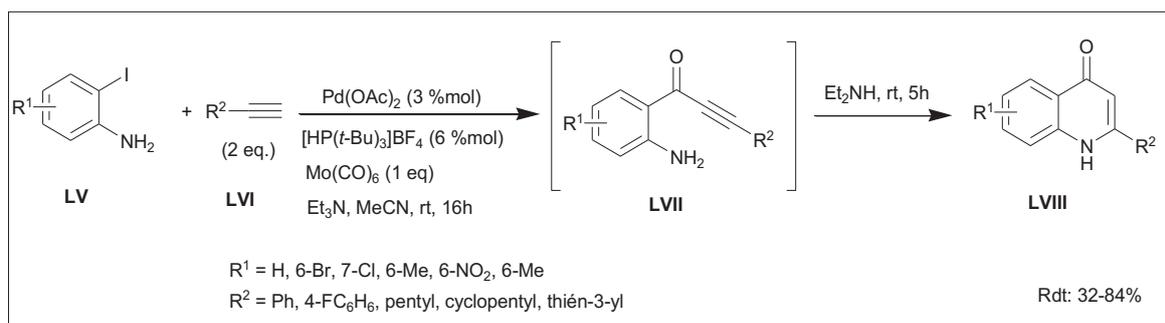


Schéma 2.15 Synthèse de dérivés 2-alkyl-4-hydroxyquinoléines par couplage de Sonogashira¹³².

Un autre exemple de synthèse chimique de dérivés AQs concerne la préparation de molécules dérivant du PQS. McGlacken *et al.*¹³³ ont exploré la synthèse du HHQ (**I**), précurseur biologique du PQS, et d'analogues halogénés en position 3 du cycle aromatique (Schéma 2.16). La synthèse initiale du noyau quinoléine est réalisée par la réaction de cyclisation de Conrad-Limpach avec une chaîne latérale à 7 carbones, conduisant à la formation de HHQ (**I**).

¹³¹ Silva, V. L. M.; Silva, A. M. S. Palladium-Catalysed Synthesis and Transformation of Quinolones. *Molecules* **2019**, *24*(228).

¹³² Åkerbladh, L.; Nordeman, P.; Wejdemar, M.; Odell, L. R.; Larhed, M. Synthesis of 4-Quinolones via a Carbonylative Sonogashira Cross-Coupling Using Molybdenum Hexacarbonyl as a Co Source. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (3), 1464–1471.

¹³³ McGlacken, G. P.; McSweeney, C. M.; O'Brien, T.; Lawrence, S. E.; Elcoate, C. J.; Reen, F. J.; O'Gara, F. Synthesis of 3-Halo-Analogues of HHQ, Subsequent Cross-Coupling and First Crystal Structure of Pseudomonas Quinolone Signal (PQS). *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (45), 5919–5921.

Ensuite, une fonction aldéhyde est introduite en position 3 selon une variante de la formylation de Duff et ensuite transformée en alcool par oxydation de Baeyer-Villiger suivie d'une hydrolyse basique pour finalement obtenir le PQS (II). A partir du composé I, des réactions de chlorination (LXII), bromination (LXIII) et iodation (LXIV) ont également été réalisées pour obtenir les dérivés halogénés correspondants (Schéma 2.16).

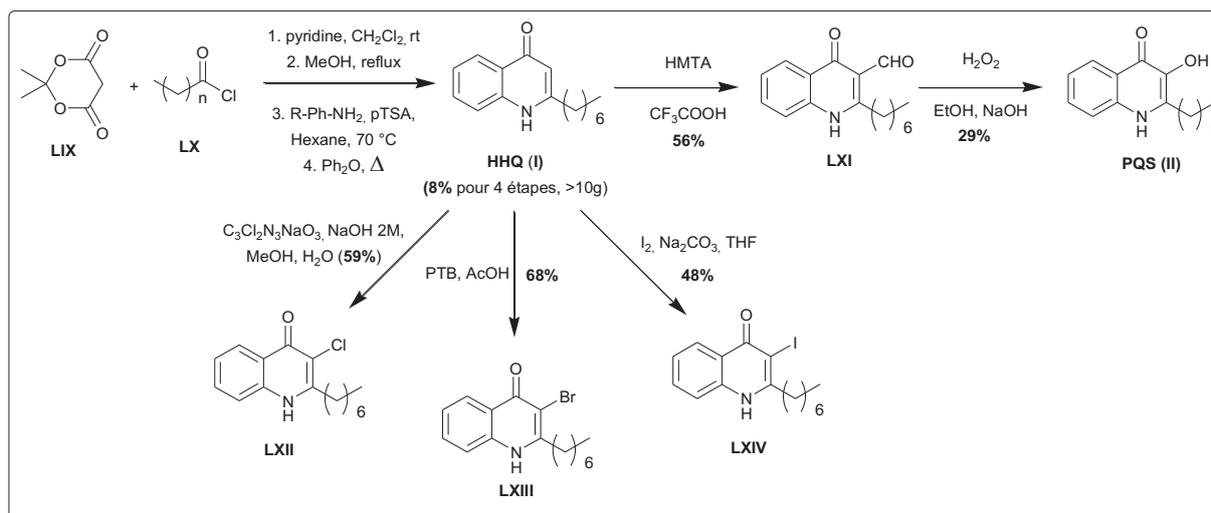


Schéma 2.16 Synthèse de dérivés de HHQ substitués en position 3¹³³.

Thierbach *et al.*¹³⁴ ont développé une synthèse de dérivés de HHQ *N*- ou *O*-méthylés qui présentent également une chaîne latérale saturée avec 7 carbones en position 2 de la quinoléine (Schéma 2.17). Le HHQ (I) est obtenu par cyclisation de Conrad-Limpach comme précédemment décrit. La méthylation de HHQ peut alors être réalisée soit sur l'azote en position 1 (LXV), soit sur l'oxygène en position 4 (LXVI). La *N*-méthylation est réalisée en présence de *n*-butyllithium comme base, à 0 °C et de sulfate de diméthyle comme agent électrophile. La *O*-méthylation est menée en présence d'une base plus faible (K₂CO₃) et de iodométhane. Dans ce cas, on note la formation d'un produit secondaire (LXVII) issu des réactions de méthylation de l'azote et du carbone en α du noyau quinoléine.

¹³³ McGlacken, G. P.; McSweeney, C. M.; O'Brien, T.; Lawrence, S. E.; Elcoate, C. J.; Reen, F. J.; O'Gara, F. Synthesis of 3-Halo-Analogues of HHQ, Subsequent Cross-Coupling and First Crystal Structure of Pseudomonas Quinolone Signal (PQS). *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (45), 5919–5921.

¹³⁴ Thierbach, S.; Wienhold, M.; Fetzner, S.; Hennecke, U. Synthesis and Biological Activity of Methylated Derivatives of the Pseudomonas Metabolites HHQ, HQNO and PQS. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 187–193.

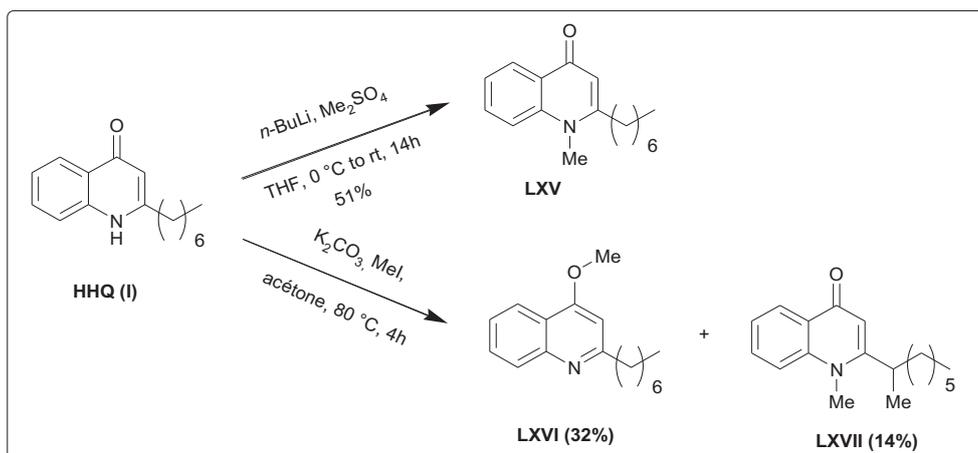


Schéma 2.17 Synthèse de dérivés *O*- ou *N*-méthylés de HHQ¹³⁴.

La 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine *N*-oxyde (**III** ou HQNO) est une des molécules produites par *Pa* et d'autres bactéries. Une des méthodes pour synthétiser ce composé passe par une voie multi-étape décrite dans le schéma 2.18¹³⁵. HHQ est modifié par protection de OH en position 4 (**LXVIII**) par un groupement carbonate par réaction avec le chloroformiate d'éthyle suivie d'une réaction de *N*-oxydation avec le MCPBA pour obtenir le composé **LXIX**. Les auteurs ont alors mis en évidence un réarrangement intermoléculaire inattendu du carbonate qui se mettait en place spontanément pour conduire à la quinoléin-4-one **LXX**. Ce phénomène a été vérifié par études RMN et diffraction des rayons X sur le composé **LXX**. Le composé **HQNO** (**III**) est finalement obtenu par déprotection avec KOH dans l'éthanol.

¹³⁴ Thierbach, S.; Wienhold, M.; Fetzner, S.; Hennecke, U. Synthesis and Biological Activity of Methylated Derivatives of the Pseudomonas Metabolites HHQ, HQNO and PQS. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 187–193.

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1H)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline N-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1H)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg.)* **2007**, *4* (10), 1517–1522.

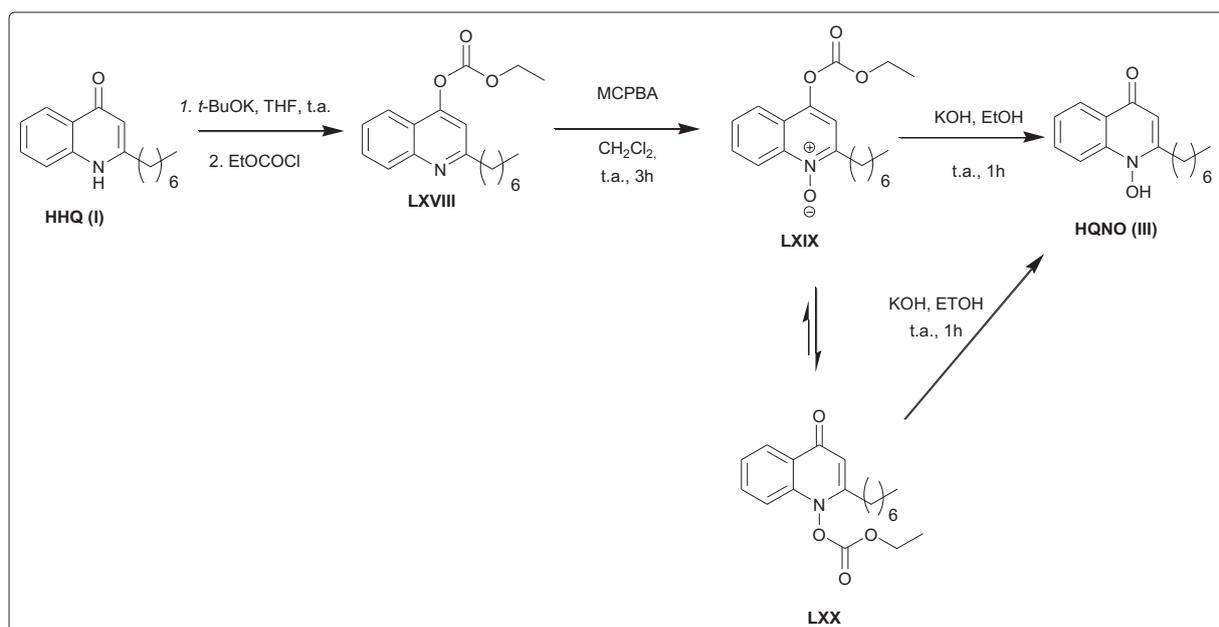


Schéma 2.18 Schéma pour la synthèse de HQNO (III)¹³⁵.

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1H)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline N-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1H)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg)*. **2007**, 4 (10), 1517–1522.

Spring *et al.*¹²⁷ ont décrit une synthèse de AQs de la famille de métabolites de *Pseudonocardia sp* (Schéma 2.19). Ces composés possèdent une chaîne latérale en position 2 présentant plusieurs motifs géranyle (**LXXV**). La 4-hydroxyquinoléine (**LXXI**) avec une fonction ester en position 2 est préalablement synthétisée selon une cyclisation de Conrad-Limpach¹²⁷.

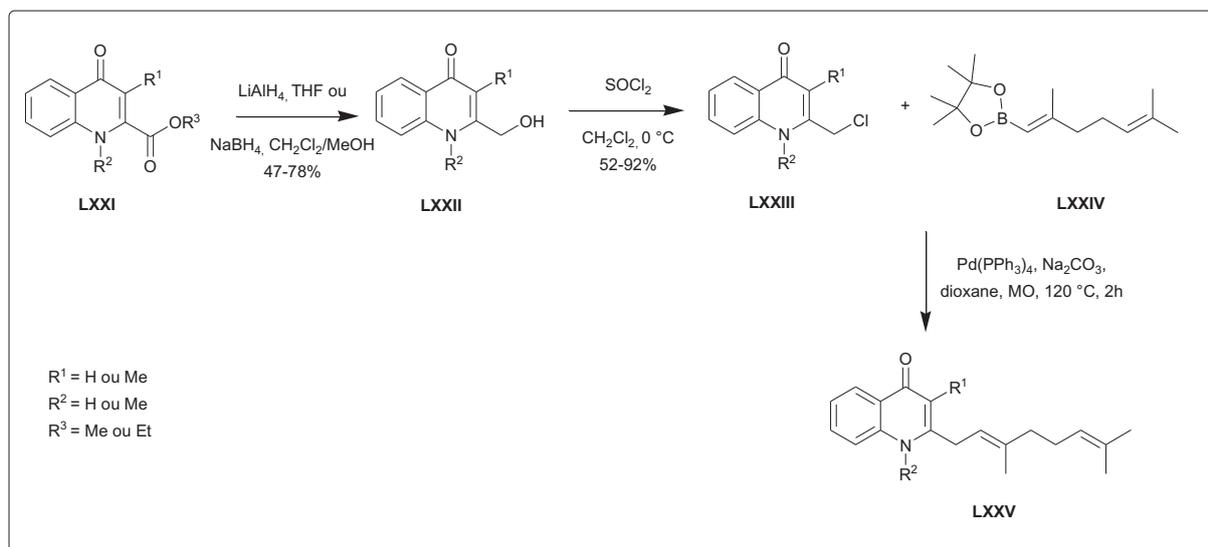


Schéma 2.19 Synthèse de dérivés AQ d'origine naturelle avec motif géranyle en position 2¹²⁷.

L'ester est ensuite réduit en alcool primaire (**LXXII**) suivie d'une chloration par SOCl_2 pour former la quinoléine chlorée (**LXXIII**). Celle-ci est finalement mise en œuvre dans une dernière étape de réaction de Suzuki avec l'ester boronique (**LXXIV**), sous irradiation micro-onde pour obtenir la 2-alkyl-4-hydroxyquinoléine (**LXXV**) avec un motif géranyle en position 2^{127,128}.

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from *Pseudonocardia Sp*. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

¹²⁸ Geddis, S. M.; Coroama, T.; Forrest, S.; Hodgkinson, J. T.; Welch, M.; Spring, D. R. Synthesis and Biological Evaluation of 1,2-Disubstituted 4-Quinolone Analogues of *Pseudonocardia Sp*. Natural Products. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, 14, 2680–2688.

Dernièrement, un brevet¹³⁶ a été déposé concernant des dérivés AQs, présentant un motif *N*-oxyde ou non, avec une chaîne latérale de différentes longueurs, insaturées ou non. Ces molécules ont fait l'objet d'une évaluation biologique vis-à-vis de souches de *Sa*. Quelques exemples des dérivés AQs sont présentés dans la Figure 2.13.

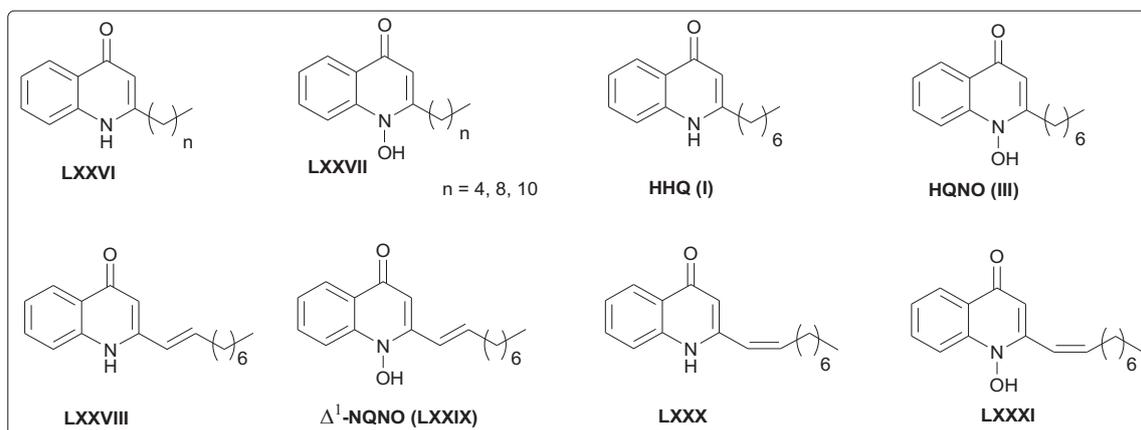


Figure 2.13 Résumé de molécules d'origine naturelle et synthétique identifiées par Böttcher *et al.*¹³⁷

La préparation de ces molécules est décrite dans le Schéma 2.20. Trois voies de synthèse différentes sont mises en œuvre selon le type de molécules.

La première voie (Voie A) permet d'obtenir les dérivés saturés de AQs (**LXXXVI** dont **HHQ**) par cyclisation de Conrad-Limpach en présence d'aniline et d'un ester méthylique d'acide 3-oxoalcanoïque **LXXXII** préparé extemporanément. Les dérivés *N*-oxydes correspondants (**LXXVII** dont **HQNO**) sont ensuite synthétisés en deux étapes.

La deuxième voie (Voie B) permet de synthétiser le composé **LXXVIII** avec une double liaison en configuration *E* en position 1 de la chaîne latérale et le *N*-oxyde correspondant (**LXXIX**). **LXXVIII** est préparé en trois étapes *via* le (*E*)-*N*-(2-acétylphényl)hept-2-énamide (**LXXXV**) qui subit une cyclisation de Camps pour former le cycle quinoléine.

¹³⁶ Böttcher, T.; Szamosvári, D.; Reichle, V. F. Compounds for Use as Anti Bacterial or Anti Fungal Agent and as a Zinc Sensor, 2016.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone *N*-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (25), 7271–7275.

La dernière voie (Voie C) conduit à la formation du composé (**LXXX**) avec la double liaison en configuration Z en position 1 de la chaîne latérale. Le produit de départ, l'acide déc-2-ynoïque (**LXXXVI**), obtenu par oxydation de Jones de l'alcool correspondant, est utilisé pour former le *N*-(2-acétylphényl)-déc-2-ynamide (**LXXXVII**) par réaction de couplage. L'énamide **LXXXVIII**, obtenu par réduction partielle *via* une hydrogénation catalytique en présence de palladium Lindlar, est cyclisé selon la méthode de Camps pour préparer le dérivé AQs **LXXX**. Une réaction de *N*-oxydation conduit à la formation du composé **LXXXI**¹³⁷.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (25), 7271–7275.

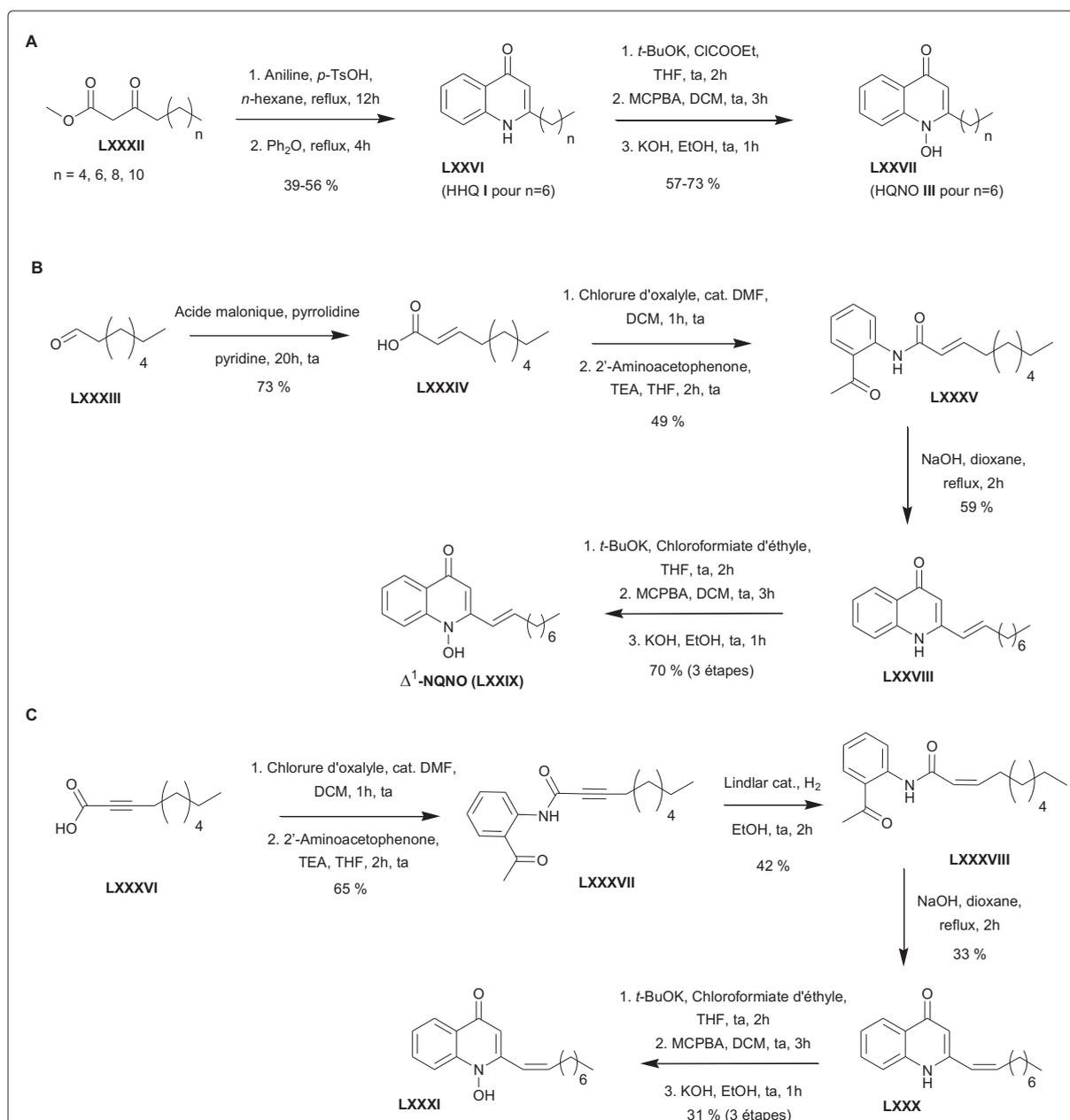


Schéma 2.20 Trois voies de synthèse pour l'obtention de nouvelles structures de type AQ.¹³⁷

Il existe donc de nombreuses études concernant les AQs et leurs dérivés, tant sur leur voie d'accès synthétique, leur mode de production par les microorganismes ou leur activité dans le *Quorum Sensing* (QS) ou vis-à-vis d'autres agents infectieux.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (25), 7271–7275

Ainsi, ces études utilisent le motif structural des AQ comme chassis moléculaires de base pour la mise au point d'inhibiteurs du QS et le développement de nouveaux antibiotiques, mais aussi pour la conception d'antiparasitaires, d'antifongiques ou d'agents antioxydants.

Un dernier exemple de dérivés de AQ sont les molécules qui présentent une insaturation non conjuguée au cycle, en particulier en position 2 de la chaîne latérale. Tatsuta et Tamura¹³⁸ décrivent la synthèse du composé **XCII** à partir du précurseur chloré **XC** en deux étapes. Le composé **XCIII** est obtenu par oxydation avec le MCPBA à partir de **XCI**.

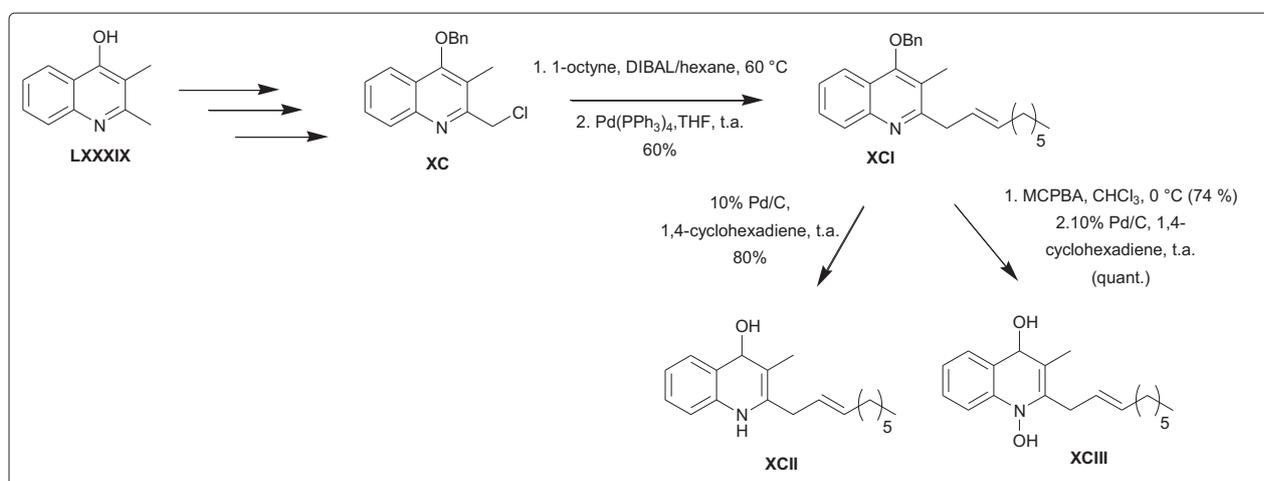


Schéma 2.21 Synthèse d'un dérivé AQ avec une chaîne latérale insaturée non conjuguée et du dérivé *N*-oxyde correspondant¹³⁸.

3.2. Activités biologiques des molécules 2-alkyl-4-hydroxyquinolènes

Nous avons présenté la synthèse de nombreuses molécules dérivés de la 2-alkyl-4-hydroxyquinoléine dont certaines sont d'origine naturelle. Dans la section 3 du chapitre 1 (page 51) nous avons exposé la biosynthèse de molécules du système PQS impliquées dans les interactions *Pa/Sa*. Les molécules de la famille des AQ sont nombreuses et peuvent être classifiées selon (i) leur intervention dans la communication cellule-cellule ou Quorum Sensing (QS), (ii) leur action en tant que sidérophore et (iii) leur action comme inhibiteur de la

¹³⁸ Tatsuta, K.; Tamura, T. Novel Synthesis and Structural Elucidation of Quinolone Antibiotics PC-3 (SF2420B) and YM-30059. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2000**, 53 (4), 418–421.

croissance d'autres espèces. Un aperçu des activités et des fonctions de ces molécules naturelles ou synthétiques est présenté dans ce paragraphe.

3.2.1. Activités anti-*Pa*

Selon Lu *et al.*⁷⁸, la mise au point d'inhibiteurs du QS pourrait constituer une approche alternative aux antibiothérapies conventionnelles. Des études sur ces composés a permis l'identification de trois molécules antagonistes de PqsR (Figure 2.14). Les composés **XCIV-XCVI** montrent une CI_{50} de 259-19 nM. En effet, une action sur la pathogénicité des bactéries sans effet sur leur croissance pourrait réduire le phénomène de sélection naturelle des lignées et donc retarder, voire éviter, le développement de résistance. Or, le facteur de transcription PqsR régule l'expression de près de 200 gènes dont de nombreux en lien avec des facteurs de virulence. Il a été montré par ailleurs, que le PQS (**II**) et, dans une moindre mesure, son précurseur la 4-hydroxy-2-heptylquinoléine (HHQ - **I**) activent PqsR qui, lui-même, régule la biosynthèse de HHQ. Cette boucle d'auto-induction va donc entraîner une augmentation rapide de la concentration extracellulaire de PQS¹³⁹. De ce fait, PqsR est apparu une cible d'intérêt pour développer des inhibiteurs du QS, antagonistes de ce récepteur, dérivés de HHQ (Figure 2.14) diminuant la sécrétion de métabolites et les facteurs de virulence comme la pyocyanine⁷⁸¹³⁹¹⁴⁰.

⁷⁸ Lu, C.; Kirsch, B.; Zimmer, C.; De Jong, J. C.; Henn, C.; Maurer, C. K.; Müsken, M.; Häussler, S.; Steinbach, A.; Hartmann, R. W. Discovery of Antagonists of PqsR, a Key Player in 2-Alkyl-4-Quinolone- Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (3), 381–390.

¹³⁹ Ilangovan, A.; Fletcher, M.; Rampioni, G.; Pustelny, C.; Rumbaugh, K.; Heeb, S.; Cámara, M.; Truman, A.; Chhabra, S. R.; Emsley, J.; et al. Structural Basis for Native Agonist and Synthetic Inhibitor Recognition by the *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing Regulator PqsR (MvfR). *PLoS Pathog.* **2013**, *9* (7).

¹⁴⁰ Soheili, V.; Tajani, A. S.; Ghodsi, R.; Bazzaz, B. S. F. Anti-PqsR Compounds as next-Generation Antibacterial Agents against *Pseudomonas Aeruginosa*: A Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *172*, 26–35.

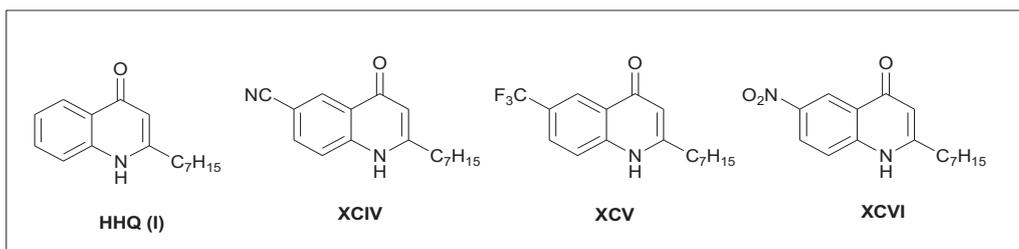


Figure 2.14 Structure de dérivés AQ ligands de PqsR dans l'étude de réduction de la virulence de *P. aeruginosa*⁷⁸.

3.2.2. Activités anti-Sa

Parmi les composés AQNOs, trois molécules présentent un rôle important dans la virulence de *Pa* : la 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine *N*-oxyde (HQNO) et la 2-nonyl-4-hydroxyquinoléine *N*-oxyde (NQNO) et la Δ^1 -2-nonyl-4-hydroxyquinoléine *N*-oxyde (Δ^1 -NQNO) (Figure 2.15).

HQNO était décrite en 1956 comme une des molécules principales de sécrétion de *Pa*. Initialement, elle était décrite comme inhibitrice de la chaîne respiratoire de *Sa*, par la suite il a été démontré que la présence de HQNO conduit à la formation de SCVs. Malouin et collaborateurs⁶⁴ ont montré que le développement de SCVs est aussi lié à l'activation du facteur de transcription (SigB), dont l'activation est régulée par l'HQNO.

Dans le mécanisme d'installation de *Pa*, le fer a sûrement un rôle dans l'augmentation de l'impact des AQNOs sur *Sa*. De plus, il a été étudié par spectroscopie de masse l'influence d'ion fer sur la synthèse de molécules AQNOs, il a été remarqué que la dépendance de la synthèse par le fer était liée à la longueur de la chaîne alkyle.

⁶⁴ Mitchell, G.; Séguin, D. L.; Asselin, A. E.; Déziel, E.; Cantin, A. M.; Frost, E. H.; Michaud, S.; Malouin, F. Staphylococcus Aureus Sigma B-Dependent Emergence of Small-Colony Variants and Biofilm Production Following Exposure to Pseudomonas Aeruginosa 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline-N-Oxide. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 1–15.

⁷⁸ Lu, C.; Kirsch, B.; Zimmer, C.; De Jong, J. C.; Henn, C.; Maurer, C. K.; Müsken, M.; Häussler, S.; Steinbach, A.; Hartmann, R. W. Discovery of Antagonists of PqsR, a Key Player in 2-Alkyl-4-Quinolone- Dependent Quorum Sensing in Pseudomonas Aeruginosa. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (3), 381–390.

HQNO est diminué par la réduction du fer, contrairement à NQNO dont la synthèse est augmentée en absence de fer¹⁴¹.

De plus, ce composé a montré une activité antibactérienne en particulier contre *Sa*¹⁴². *Pa* compète avec *Sa* pour l'oxygène, ce phénomène avec la sécrétion de HQNO conduit au blocage de la chaîne respiratoire de *Sa*. L'absence de fonctionnement de la chaîne respiratoire amène *Sa* à incrémenté la voie de la fermentation, et une augmentation de la production de lactate qu'est de préférence utilisé par *Pa*^{50,137}.

Szamosvari *et al.* décrivent que le mécanisme d'interaction antagoniste entre *Pa* et *Sa* est médié par la sécrétion de Δ^1 -NQNO par *Pa* (Figure 1.15). Ce composé a deux rôles, le premier est une action directe sur *Sa* par inhibition de la chaîne respiratoire. Le second est qu'il peut agir de sidérophore pour la capture de l'ion ferrique, et par conséquent priver *Sa* du fer¹³⁷. La formation de SCVs est, aussi, incrémentée par l'exposition réitérée à trans- Δ^1 -NQNO, ou par mutations des certaines oxydases et par exposition à la pyocyanine⁵¹. Le mécanisme d'action de *CIV* a été identifié sur deux différents substrats : (a) la chaîne respiratoire et en particulier un cytochrome b (cyt b) en conditions d'aérobie et (b) la nitrate réductase en conditions d'anaérobie¹³⁷ (Figure 2.15).

⁵⁰ Filkins, L. M.; Graber, J. A.; Olson, D. G.; Dolben, E. L.; Lynd, L. R.; Bhujji, S.; O'Toole, G. A. Coculture of Staphylococcus Aureus with Pseudomonas Aeruginosa Drives S. Aureus towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *J. Bacteriol.* **2015**, 197 (14), 2252–2264.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of Pseudomonas Aeruginosa Modulates Growth and Virulence of Staphylococcus Aureus. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (25), 7271–7275.

¹⁴¹ Nguyen, A. T.; Jones, J. W.; Cámara, M.; Williams, P.; Kane, M. A.; Oglesby-Sherrou, A. G. Cystic Fibrosis Isolates of Pseudomonas Aeruginosa Retain Iron-Regulated Antimicrobial Activity against Staphylococcus Aureus through the Action of Multiple Alkylquinolones. *Front. Microbiol.* **2016**, 7, 1–13.

¹⁴² Déziel, E.; Lépine, F.; Milot, S.; He, J.; Mindrinos, M. N.; Tompkins, R. G.; Rahme, L. G. Analysis of Pseudomonas Aeruginosa 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines (HAQs) Reveals a Role for 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline in Cell-to-Cell Communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101 (5), 1339–1344.

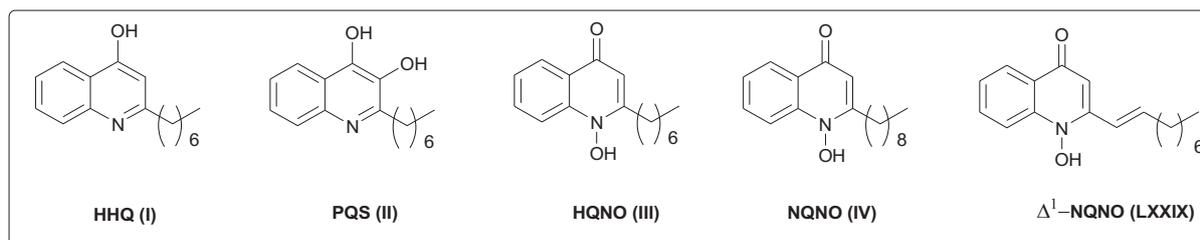


Figure 2.15 Structures des molécules issues du métabolisme de *P. aeruginosa*.

Les molécules **LXXV** agissent en ralentissant la croissance de *Sa* et *E. coli* (Figure 2.16). Les composés ne sont pas considérés comme antibactériens mais ils sont capables de prolonger la phase de latence de deux bactéries^{127,128}. Salvaggio *et al.*¹²⁷ ont supposé que l'activité de ces molécules naturelles était assez importante pour perturber la croissance des bactéries en compétition dans une communauté complexe telle que le microbiote pulmonaire.

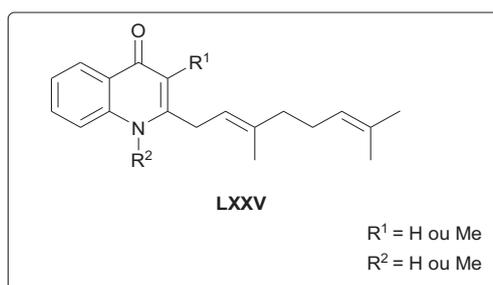


Figure 2.16 Structure de dérivés AQ présentant une activité de ralentissement de la croissance de *S. aureus*¹²⁷.

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from *Pseudonocardia* Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

¹²⁸ Geddis, S. M.; Coroama, T.; Forrest, S.; Hodgkinson, J. T.; Welch, M.; Spring, D. R. Synthesis and Biological Evaluation of 1,2-Disubstituted 4-Quinolone Analogues of *Pseudonocardia* Sp. Natural Products. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, 14, 2680–2688.

D'autres molécules synthétisées (Figure 2.17) par Thierbach *et al.*¹³⁴ ont montré une activité bactérienne contre *Sa*. Les résultats montrent que les dérivés **XCVII** et **XCVIII** sont plus actifs par rapport aux précurseurs **HQNO** et **LXVI**¹³⁴.

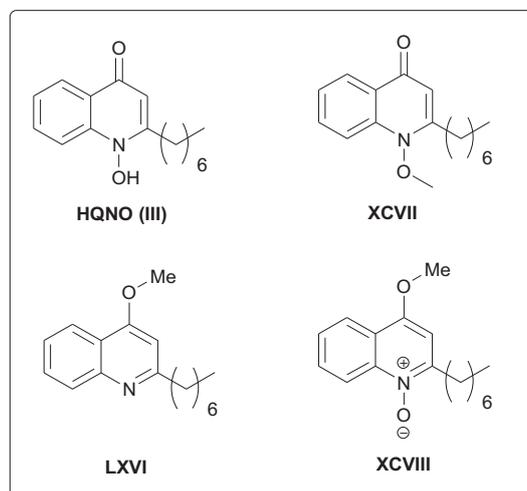


Figure 2.17 Structures de dérivés AQ présentant une activité contre *S. aureus*¹³⁴.

Reen *et al.*¹⁴³ ont réalisé des études structure-activité sur la position 3 du noyau quinoléique pour comparer ces molécules à l'activité de composés connus, comme PQS et son précurseur HHQ. La production des phénazines par *Pa* est diminuée en présence des composés halogénés **LXII**, **LXIII**, **LXVIV**. En revanche, une modification des positions de 5 à 8 du noyau quinoléine apporte une amélioration sur l'activité par rapport au précurseur HHQ (Figure 2.18).

¹³⁴ Thierbach, S.; Wienhold, M.; Fetzner, S.; Hennecke, U. Synthesis and Biological Activity of Methylated Derivatives of the Pseudomonas Metabolites HHQ, HQNO and PQS. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 187–193.

¹⁴³ Reen, F. J.; Clarke, S. L.; Legendre, C.; McSweeney, C. M.; Eccles, K. S.; Lawrence, S. E.; O'Gara, F.; McGlacken, G. P. Structure-Function Analysis of the C-3 Position in Analogues of Microbial Behavioural Modulators HHQ and PQS. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (44), 8903–8910.

En particulier deux composés **XCIX a-b** ont montré une activité significative sur le « swarming motility » du *Bacillus atrophaeus*¹⁴⁴.

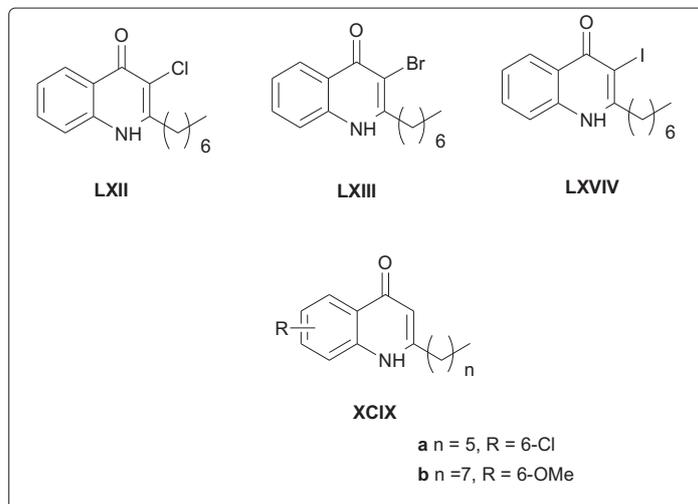


Figure 2.18 Structures de dérivés de HHQ : **XCIX** présentent une activité sur *Bacillus atrophaeus*^{143,144}.

Enfin, des molécules AQs **C a-b** et **Cl a-b** (Figure 2.19) alkylées ou non en position 3, présentant dans certains cas une mono-insaturation non conjuguée sur la chaîne en position 2, ont été extraites de milieux de culture de *Burkholderia*. Ces composés ont montré une activité inhibitrice contre le pathogène, *Tenacibaculum maritimum*, connu pour provoquer des ulcères de la peau chez les poissons. Ces résultats offrent donc de nouvelles opportunités de développement de traitement antibactérien en aquaculture¹²⁹.

¹²⁹ Li, D.; Oku, N.; Hasada, A.; Shimizu, M.; Igarashi, Y. Two New 2-Alkylquinolones, Inhibitory to the Fish Skin Ulcer Pathogen *Tenacibaculum Maritimum*, Produced by a Rhizobacterium of the Genus *Burkholderia* Sp. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 1446–1451.

¹⁴³ Reen, F. J.; Clarke, S. L.; Legendre, C.; McSweeney, C. M.; Eccles, K. S.; Lawrence, S. E.; O’Gara, F.; McGlacken, G. P. Structure-Function Analysis of the C-3 Position in Analogues of Microbial Behavioural Modulators HHQ and PQS. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (44), 8903–8910.

¹⁴⁴ Reen, F. J.; Shanahan, R.; Cano, R.; O’Gara, F.; McGlacken, G. P. A Structure Activity-Relationship Study of the Bacterial Signal Molecule HHQ Reveals Swarming Motility Inhibition in *Bacillus Atrophaeus*. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (19), 5537–5541.

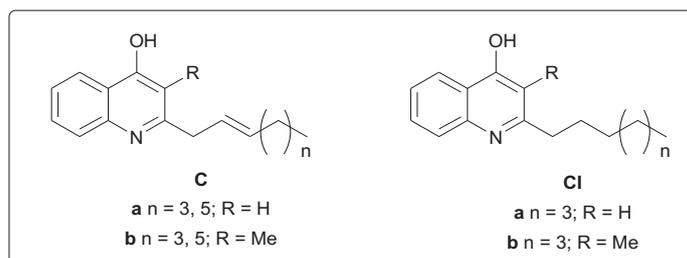


Figure 2.19 Structures de dérivés AQ présentant une activité contre le pathogène *Tenacibaculum maritimum*¹²⁹.

3.2.3. Activités diverses

Les molécules HHQ et PQS sont impliquées dans la communication intra- et inter-cellulaire. Elles sont considérées des molécules auto-inductrices. L'activation du récepteur PqsR détermine l'augmentation de la transcription génique de molécules mêmes⁸⁰. HHQ est secrété par une cellule de *Pa* dans le milieu extracellulaire ensuite elle subit une internalisation cellulaire et à l'intérieur d'une autre cellule, HHQ est converti en PQS, qu'il est ensuite secrété pour accomplir le rôle de messenger¹⁴².

⁸⁰ Wade, D. S.; Calfee, M. W.; Rocha, E. R.; Ling, E. A.; Engstrom, E.; Coleman, J. P.; Pesci, E. C. Regulation of Pseudomonas Quinolone Signal Synthesis in Pseudomonas Aeruginosa Dana. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (13), 4372–4380.

¹²⁹ Li, D.; Oku, N.; Hasada, A.; Shimizu, M.; Igarashi, Y. Two New 2-Alkylquinolones, Inhibitory to the Fish Skin Ulcer Pathogen *Tenacibaculum Maritimum*, Produced by a Rhizobacterium of the Genus *Burkholderia* Sp. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 1446–1451.

¹⁴² Déziel, E.; Lépine, F.; Milot, S.; He, J.; Mindrinos, M. N.; Tompkins, R. G.; Rahme, L. G. Analysis of Pseudomonas Aeruginosa 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines (HAQs) Reveals a Role for 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline in Cell-to-Cell Communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (5), 1339–1344.

HHQ est impliqué dans les mécanismes d'interaction entre *Pa* et *Sa*. La co-culture des deux bactéries montre que *Pa* peut induire la lyse de *Sa* par sécrétion de HHQ conduisant à la libération de fer¹⁴¹. Au même temps dans les monocultures de *Pa* les concentrations élevées de fer déterminent une diminution de la synthèse de HHQ⁵⁴.

D'autres dérivés AQ et AQNO ont également montré d'autres activités biologiques intéressantes. Supong *et al.*⁹² ont démontré que les AQs LXXVI (dont HHQ) et LXXVIII avec une chaîne latérale saturée ou mono-insaturée entre 7 et 11 carbones et les AQNO LXXVII (dont HQNO) avec une chaîne latérale saturée entre 7 et 9 carbones agissaient sur le *Plasmodium falciparum* avec une CI_{50} entre 0,25 et 2,07 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 2.20). Les dérivés *N*-oxydes LXXVII et HQNO possédaient d'autre part un pouvoir anti-radicalaire selon le test DPPH (capacité à réduire le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle par transfert d'un hydrogène).

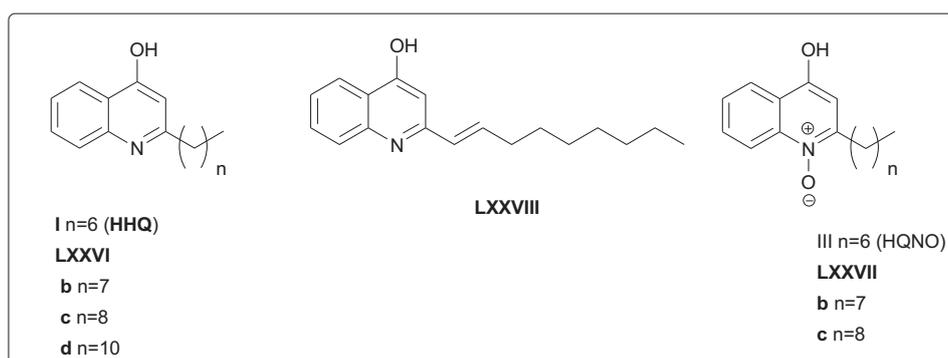


Figure 2.20 Structures de dérivés AQ présentant une activité mixte : antimalariale, antioxydant et antifongique^{92,130,145}.

⁵⁴ Nguyen, A. T.; Jones, J. W.; Ruge, M. A.; Kane, M. A.; Oglesby-Sherrouse, A. G. Iron Depletion Enhances Production of Antimicrobials by *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2015**, *197* (14), 2265–2275.

⁹² Supong, K.; Thawai, C.; Supothina, S.; Auncharoen, P.; Pittayakhajonwut, P. Antimicrobial and Anti-Oxidant Activities of Quinoline Alkaloids from *Pseudomonas Aeruginosa* BCC76810. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 100–106.

¹³⁰ Kim, H.; Hwang, J. Y.; Chung, B.; Cho, E.; Bae, S.; Shin, J.; Oh, K. B. 2-Alkyl-4-Hydroxyquinolines from a Marine-Derived *Streptomyces* Sp. Inhibit Hyphal Growth Induction in *Candida Albicans*. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (133).

¹⁴¹ Nguyen, A. T.; Jones, J. W.; Cámara, M.; Williams, P.; Kane, M. A.; Oglesby-Sherrouse, A. G. Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Retain Iron-Regulated Antimicrobial Activity against *Staphylococcus Aureus* through the Action of Multiple Alkylquinolones. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–13.

¹⁴⁵ Martínez-Luis, S.; Cherigo, L.; Spadafora, C.; Gutiérrez, M. Antiparasitic Compounds from the Panamanian Marine Bacterium *Pseudomonas Aeruginosa*. *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14* (1), 31–32.

D'autre part, l'équipe de M. Gutiérrez¹⁴⁵ a montré que les AQ **I** et **LXXVIc** produits par la souche GL0334 de *P. aeruginosa*, isolée à partir de sédiment marin collecté sur la côte pacifique de Panama, ont également montré une activité sur *P. falciparum* (CI₅₀ 2,57-3,47 µg/ml) ainsi que sur *T. cruzi* (CI₅₀ 3,66-3,99 µg/ml). Bien que ces dérivés AQs se soient avérés moins actifs que les traitements de référence pour ces deux parasites (chloroquine, CI₅₀=80-100 mM pour *P. falciparum* et nifurtimox, CI₅₀=0,15-13,4 µM pour *T. Cruzii*), ils ne montrent qu'une toxicité faible à modérée vis-à-vis de cellules saines.

Plus récemment, une activité antifongique des dérivés AQs **I** et **LXXVIb** et **III** (Figure 2.20) a été démontré contre *Candida albicans*. Ces composés, isolés à partir de cultures de *Streptomyces sp*, un actinomycète marin, limitent la croissance mycélienne du champignon en inhibant la formation des filaments (CI₅₀=11,4 µg/ml)¹³⁰.

¹³⁰ Kim, H.; Hwang, J. Y.; Chung, B.; Cho, E.; Bae, S.; Shin, J.; Oh, K. B. 2-Alkyl-4-Hydroxyquinolines from a Marine-Derived Streptomyces Sp. Inhibit Hyphal Growth Induction in Candida Albicans. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (133).

¹⁴⁵ Martínez-Luis, S.; Cherigo, L.; Spadafora, C.; Gutiérrez, M. Antiparasitic Compounds from the Panamanian Marine Bacterium Pseudomonas Aeruginosa. *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14* (1), 31–32.

Chapitre 3.
**MOLECULES AQs : Travaux
personnels**

Chapitre 3. SYNTHÈSES DES COMPOSÉS DE TYPE AQs : Travaux personnels

1. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

Nous avons décrit dans l'introduction générale les principales raisons qui nous ont conduits à nous intéresser aux composés de type AQs. Trois séries chimiques ont été identifiées suite aux travaux préliminaires de fractionnements bio-guidés dont les structures sont représentées en Figure 3.1.

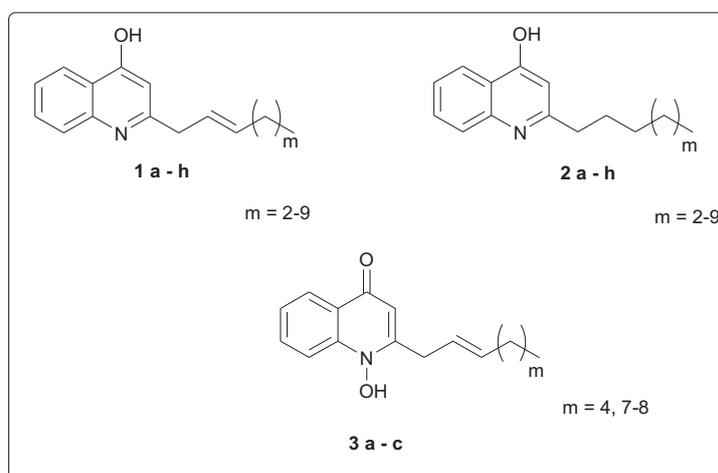
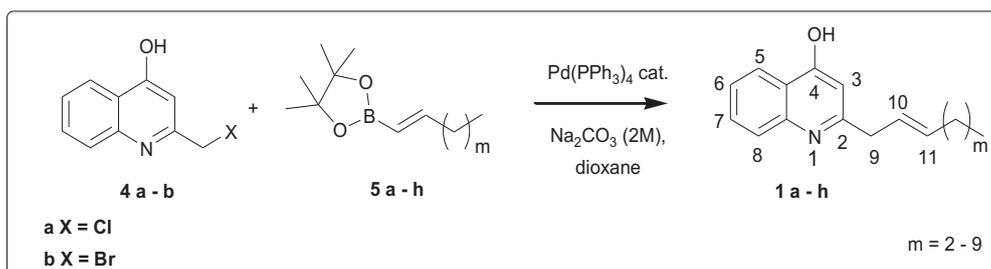


Figure 3.1 Structures de dérivés AQ obtenus dans les travaux personnels

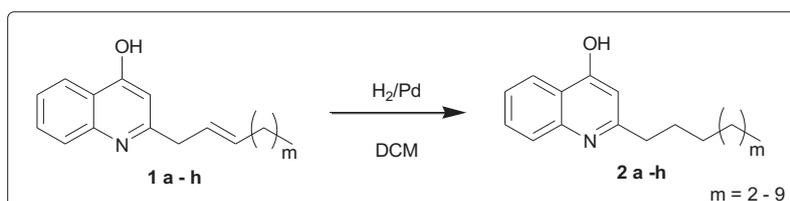
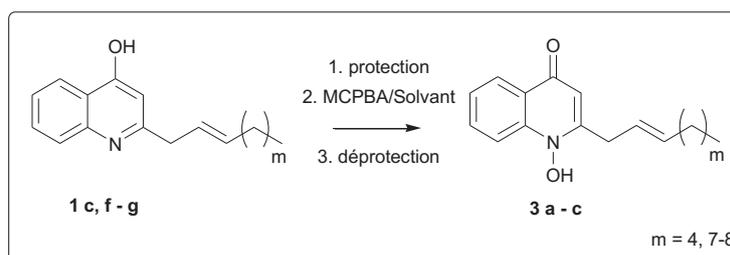
Pour la synthèse de dérivés AQs, nous avons choisi une stratégie de synthèse polyvalente pouvant conduire, *via* un couplage de Suzuki-Miyaura (SM), à des composés différents ; ceci en quantité suffisante pour la caractérisation structurale et les tests biologiques. Ce couplage pallado-catalysé devait nous permettre de varier la chaîne latérale en partant d'un unique précurseur de type 4-hydroxyquinoléine halogénée (**4**). La préparation de ce composé selon une synthèse « robuste » est donc essentielle pour pouvoir mener à bien l'enchaînement réactionnel prévu. Nous avons appliqué la méthode, décrite par Spring *et al.*¹²⁷ (c.f. Chapitre 2, page 86), pour obtenir les composés **1a-h** de la famille Δ^2 -AQ-C_n (Schéma 3.1).

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from Pseudonocardia Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

Schéma 3.1 Couplage de Suzuki-Miyaura pour la synthèse des dérivés Δ^2 -AQ- C_n .

Ce couplage de SM nous a permis d'obtenir huit composés de type 2-alcényl-4-hydroxyquinoléines (**1 a-h**) de la famille de Δ^2 -AQ- C_n avec une longueur de chaîne comprise entre 6 et 13 atomes de carbone.

Les molécules Δ^2 -AQ- C_n pourront ensuite être transformées (i) par hydrogénation pallado-catalytique (Schéma 3.2) ou (ii) par *N*-oxydation de l'azote en position 2 (Schéma 3.3) pour obtenir respectivement les composés de la famille AQ- C_n et Δ^2 -AQNO- C_n .

Schéma 3.2 Synthèse des composés AQ- C_n par réduction par hydrogénation catalytiqueSchéma 3.3 Synthèse de composés Δ^2 -AQNO- C_n

Le couplage de Suzuki-Miyaura est réalisé à partir des 2-halogénométhyl-4-hydroxyquinoléines (**4 a-b**) et un ester alcénylboronique (**5 a-h**). Dans un premier temps, la synthèse des dérivés **4 a-b** sera décrite puis nous exposerons la synthèse des composés **5 a-h** et finalement, les conditions de couplage de Suzuki-Miyaura.

2. SYNTHÈSE DES 2-(HALOGÉNOMÉTHYL)-4-HYDROXYQUINOLÉINES

La voie de synthèse des dérivés 2-(halogénométhyl)-4-hydroxyquinoléines **4a-b** devait i) mettre en œuvre des produits de départ commercialement disponibles, ii) permettre l'obtention de bons rendements afin de faciliter la poursuite de la synthèse vers les molécules cibles AQ.

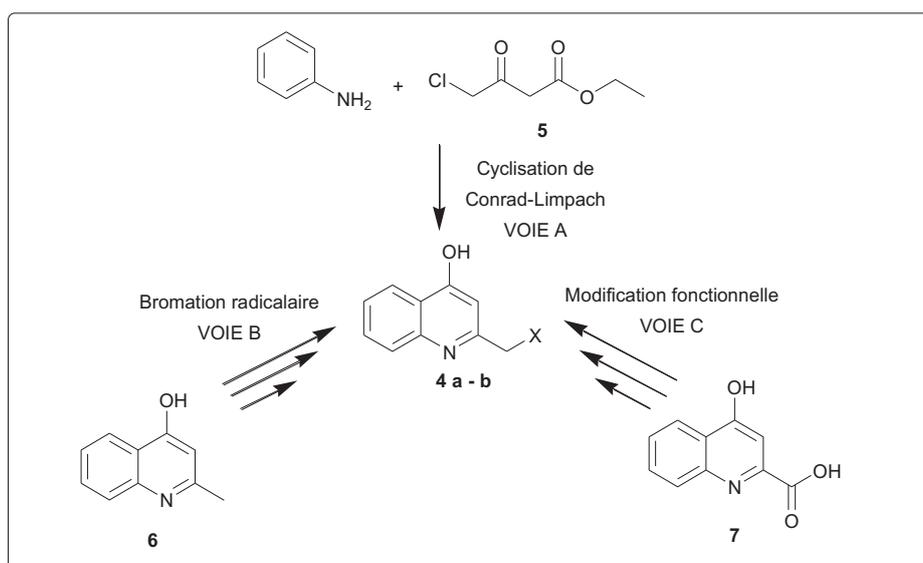


Schéma 3.4 Voies de synthèse envisagées conduisant aux composés **4a-b**.

Nous présentons dans un premier temps l'obtention des 2-halogénométhyl-4-hydroxyquinoléines selon trois voies de synthèse. Dans un second temps nous exposerons la synthèse des esters boroniques qui nous a conduit à développer une nouvelle méthode d'obtention de ces composés.

Trois différentes synthèses (Schéma 3.4) ont été développées successivement pour obtenir les composés halogénés **4a-b** avec les meilleurs rendements possibles: (i) la cyclisation de Conrad-Limpach (VOIE A) pour obtenir la 2-(chlorométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4a**) ; (ii) la bromation radicalaire de 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine (VOIE B) pour obtenir la 2-(bromométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4b**) ; et (iii) la chloration par SOCl₂ de la 2-(hydroxyméthyl)-4-hydroxyquinoléine (VOIE C) pour obtenir le dérivé (**4a**).

2.1. Utilisation de la cyclisation de Conrad-Limpach (VOIE A)

Dans le chapitre précédent, nous avons identifié que l'une des voies d'accès privilégiée au noyau quinoléine était la cyclisation de Conrad-Limpach. Dans un premier temps, nous avons donc privilégié cette méthode pour accéder à la 2-(chlorométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4a**) (Schéma 3.5). Les conditions utilisées pour la synthèse de ce composé avaient récemment été décrites par Liu *et al.*¹⁴⁶.

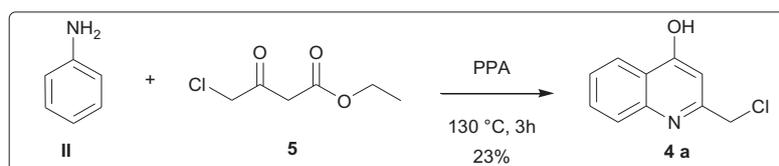


Schéma 3.5 Synthèse de **4a** par réaction de cyclisation de Conrad-Limpach

La réaction a été réalisée à partir d'aniline et du 4-chloroacétoacétate d'éthyle **5**, en présence d'acide polyphosphorique (PPA), qui favorise la cyclisation par chauffage, pendant 3h à 130 °C. Selon la littérature¹⁴⁶, le composé **4a** devait être obtenu par précipitation avec un excellent rendement de 80% sans purification supplémentaire, après neutralisation basique, avec NaOH, du PPA à basse température.

Cependant, nous avons rencontré d'importantes difficultés avec cette voie de synthèse. La manipulation du mélange réactionnel s'est avérée difficile en raison de la formation d'une masse très visqueuse et collante rendant le traitement en fin de réaction malaisé. Par conséquent, une purification du produit **4a** par colonne sur gel de silice s'est avérée nécessaire après filtration. Néanmoins, malgré plusieurs tentatives, le dérivé **4a** n'a jamais pu être obtenu avec une pureté satisfaisante. Le rendement maximal en composé **4a** dans ces conditions réactionnelles a été de 23%.

A la vue de de ces résultats, nous avons tenté de modifier les conditions décrites par Liu *et al.*¹⁴⁶.

¹⁴⁶ Liu, J.; Liu, W.; Ge, H.; Gao, J.; He, Q.; Su, L.; Xu, J.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S.; Li, D. Syntheses and Characterization of Non-Bisphosphonate Quinoline Derivatives as New FPPS Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, *1840* (3), 1051–1062.

Tout d'abord, des essais de neutralisation basique du PPA ont été menés avec une solution aqueuse de NaOH (4M) ou une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. Malheureusement ces deux tentatives n'ont pas abouti : **4a** n'a pu être isolé qu'avec un rendement de 14% suite au traitement avec NaOH (4M), alors que le traitement avec NaHCO₃ n'a conduit à aucun composé (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 Résumé de conditions pour la cyclisation de Conrad-Limpach

PPA (g)	Aniline (mmol)	4-chloroacétoacétate d'éthyle (mmol)	Base/T(°C)/temps (h)	Rendement (%)
34	5	5	NaOH aq. (2M)/130°/2	23
23.9	18	18	NaHCO ₃ aq. (sat.)/130°/3	-
7.23	10	10	NaOH aq. (4M)/130°/2	14

Ensuite, nous avons remplacé le PPA par l'acide sulfurique dans un solvant à haut point d'ébullition (le diphenyléther) pour simplifier le traitement de la réaction. Quelques gouttes de H₂SO₄ ont donc été ajoutées à une solution d'aniline (1eq) et de 4-chloroacétoacétate d'éthyle (2,5eq.) dans le diphenyléther puis le mélange a été porté au reflux (259°C) pendant 1h^{135,137}. Après une heure aucun nouveau produit n'était formé.

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1H)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline N-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1H)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg)*. **2007**, 4 (10), 1517–1522.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (25), 7271–7275

La réaction de Conrad-Limpach est décrite comme un procédé séquentiel « one-pot »^{146,147}. Suite aux résultats obtenus nous avons décidé de mener la réaction en deux étapes : formation de l'énamine suivie de sa cyclisation. L'énamine est ensuite engagée dans la réaction de cyclisation pour laquelle nous avons utilisé deux solvants différents. Un premier essai a été réalisé avec le toluène sous irradiation MO à 270 °C pendant 5 min. Un essai par chauffage thermique dans le diphényl'éther à 250 °C pendant 6h a également été réalisé en parallèle. Dans les deux cas, aucun produit de cyclisation n'a été isolé. Dans le Tableau 3.3, les deux essais réalisés pour la synthèse du composé **4a**.

Tableau 3.3 Différentes conditions pour la synthèse de **4a**.

Solvant	Enamine (mmol/g)	T (°C)/ temps (min)	Chauffage
Toluène	5.8/1.38	270/5	Microondes
Diphényl'éther	11/2.62	259/360	Thermique

En conclusion, la réaction de Conrad-Limpach ne s'est pas avérée une méthode efficace pour obtenir le produit **4a** qui n'a pu être isolé qu'avec de très faibles rendements (14% et 23%). Cette voie de synthèse est le plus souvent décrite pour des dérivés non halogénés du β -cétoester (**5**). Nous avons alors supposé que les difficultés rencontrées lors de cette synthèse étaient dues à la présence de l'atome de chlore en position 4 du β -cétoester (**5**)¹²⁷. Considérant ces résultats, nous avons décidé d'explorer d'autres voies de synthèse des 2-(halogénométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4**) à partir de dérivés de quinoléine commerciaux.

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from Pseudonocardia Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

¹⁴⁶ Liu, J.; Liu, W.; Ge, H.; Gao, J.; He, Q.; Su, L.; Xu, J.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S.; Li, D. Syntheses and Characterization of Non-Bisphosphonate Quinoline Derivatives as New FPPS Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, 1840 (3), 1051–1062.

¹⁴⁷ Wang, X. Q.; Xia, C. L.; Chen, S. Bin; Tan, J. H.; Ou, T. M.; Huang, S. L.; Li, D.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 2-Arylethenylquinoline Derivatives as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 89, 349–361.

2.2. Utilisation de la bromation radicalaire (VOIE B)

La deuxième voie de synthèse envisagée pour obtenir la 2-(bromométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4b**) passait par une bromation radicalaire de la 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine **6** (Schéma 3.6).

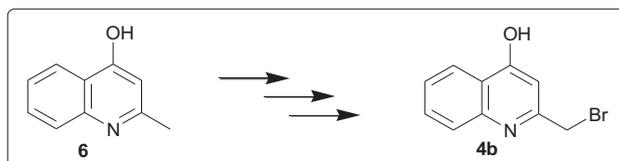


Schéma 3.6 Séquence réactionnelle *via* une bromation radicalaire

Dans un premier temps, nous avons directement appliqué les conditions de bromation radicalaire sur la 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine (**6**). L'essai a conduit à la formation d'un dérivé **9**, bromé en position 3 du cycle aromatique, avec un rendement de 85% (Schéma 3.7). En effet, l'effet mésomère donneur du groupe OH active la position ortho pour la bromation.

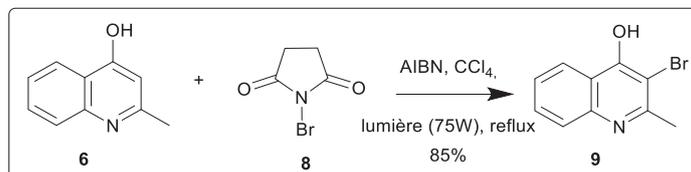


Schéma 3.7 Réaction de bromation radicalaire sur la position 3 de la quinoléine

Suite au résultat obtenu après le premier essai de bromation, la protection du groupement OH en position 4, par une fonction ester (benzoate ou acétate) a été réalisée (Schéma 3.8). Dans les deux cas, les réactions de protection sont réalisées dans le DCM à 0 °C en présence de *N*-méthylmorpholine (NMM) et du chlorure d'acyle correspondant. Les quinoléines protégées **10a** et **10b** sont isolées, respectivement, avec 80% et 52% de rendement.

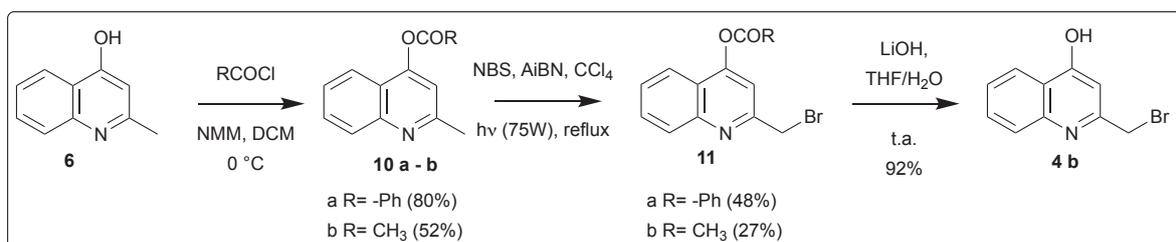


Schéma 3.8 Séquence réactionnelle pour l'obtention du composé 2-bromométhyl-4-hydroxyquinoléine **4b**

Une fois la *O*-protection effectuée les produits (**10a-b**) sont traités avec NBS, AIBN dans le chloroforme. La réaction est menée sous la lumière d'une lampe 75W durant 15 minutes, pour favoriser l'initiation de la réaction radicalaire puis chauffée, toujours sous irradiation, à reflux pendant 5h. Après traitement et purification par chromatographie flash le produit **11 a-b** est obtenu avec un rendement de 27 et de 48%, respectivement. La bromation sur le méthyl en position 2 est confirmée par analyse RMN.

La dernière étape pour obtenir le composé **4b** est la déprotection de l'ester par LiOH dans un mélange de THF/H₂O à 0 °C. La purification par chromatographie flash nous a permis d'obtenir la 2-bromométhyl-4-hydroxyquinoléine (**4b**) avec un rendement de 92%. Le rendement global de réaction est de 36% à partir de la quinoléine de départ, pour les composés qui sont synthétisés *via* la benzylation et de 23% pour les composés synthétisés *via* l'acétylation.

2.3. Utilisation de la chloration par SOCl₂ (VOIE C)

La bromation radicalaire n'ayant donné que des rendements moyens, nous avons envisagé une troisième voie de synthèse pour obtenir le dérivé halogéné *via* la modification fonctionnelle de l'acide kynurénique. Cette voie de synthèse est réalisée en trois étapes (Schéma 3.9) : (i) l'estérification de l'acide kynurénique (**7**), (ii) la réduction de l'ester méthylique (**12**) en alcool primaire (**13**) ; et (iii) la chloration par substitution nucléophile de l'alcool (**13**) pour obtenir le composé **4a**.

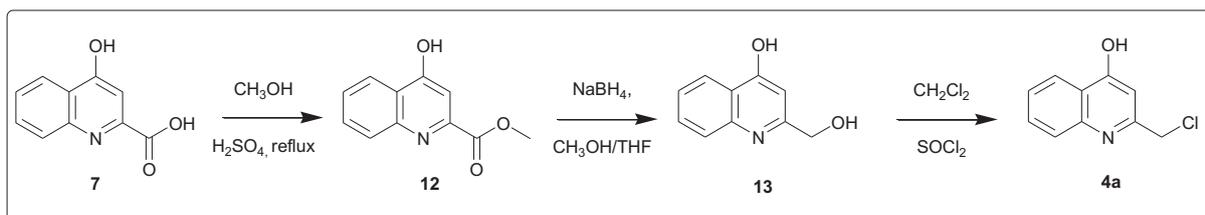


Schéma 3.9 Schéma réactionnel pour l'obtention du composé 2-(chlorométhyl)-4-hydroxyquinoléine

4a

2.3.1. Estérification de l'acide kynurénique

La première réaction est l'estérification de l'acide kynurénique (**7**). Les conditions appliquées, pour cette réaction, ont été décrites par l'équipe de Dalpiaz en 2002¹⁴⁸. Nous avons apporté quelques modifications concernant le traitement et la purification de l'ester (Schéma 3.10). La réaction d'estérification est réalisée, à 0°C, dans une solution méthanolique d'acide sulfurique. La suspension est chauffée à reflux (64°C) pendant la nuit. Le produit **12** est obtenu après traitement basique de la réaction et extraction par AcOEt sans purification supplémentaire.

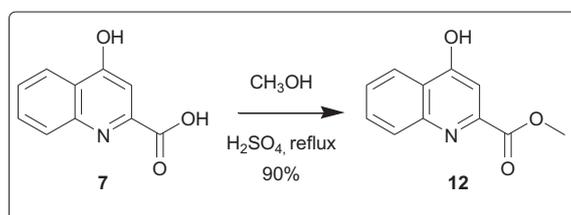


Schéma 3.10 Estérification de l'acide kynurénique

L'acide kynurénique est commercialement disponible sous forme hydratée. Par conséquent, un dosage de l'eau par analyse de Karl-Fisher a été réalisé pour déterminer le taux de H_2O présent (soit 18%) avant de calculer le rendement d'estérification (90%).

¹⁴⁸ Manfredini, S.; Pavan, B.; Vertuani, S.; Scaglianti, M.; Compagnone, D.; Biondi, C.; Scatturin, A.; Tanganelli, S.; Ferraro, L.; Prasad, P.; et al. Design, Synthesis and Activity of Ascorbic Acid Prodrugs of Nipicotnic, Kynurenic and Diclophenamic Acids, Liable to Increase Neurotropic Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (3), 559–562.

2.3.2. Réduction de l'ester en alcool

Une fois le composé **12** obtenu, la synthèse est poursuivie par la réduction de l'ester en alcool (**13**). Cette réaction a été menée selon la méthode décrite par Saeed et Ashraf¹⁴⁹, par action du borohydrure de sodium dans le méthanol à chaud (Schéma 3.11).

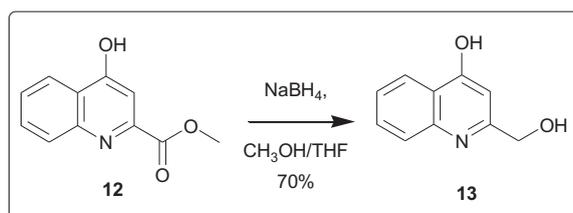


Schéma 3.11 Réduction de la fonction ester méthylique en alcool primaire

Toutefois, nous avons apporté quelques modifications par rapport au mode opératoire de référence, au niveau du traitement en fin de réaction afin de remédier à un problème d'hydro-solubilité de l'alcool **13** trop importante lors des lavages acides par une solution aqueuse de HCl (2N) prévus dans la méthode décrite. Par conséquent, après refroidissement en fin de réaction, le mélange a simplement été concentré et le résidu purifié par chromatographie flash sur gel de silice pour obtenir le dérivé **13** avec un rendement de 70%.

2.3.3. Chloration de l'alcool

La troisième étape de cette voie de synthèse est la formation de la 2-(chlorométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4a**) par chloration de l'alcool **13** en présence de chlorure de thionyle (Schéma 3.12)¹²⁷.

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from Pseudonocardia Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

¹⁴⁹ Saeed, A.; Ashraf, Z. Sodium Borohydride Reduction of Aromatic Carboxylic Acids via Methyl Esters. *J. Chem. Sci.* **2006**, 118 (5), 419–423.

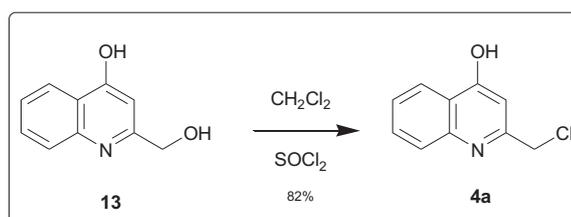


Schéma 3.12 Synthèse du composé clé 2-chlorométhyl-4-hydroxyquinoléine

Il est à noter, qu'en raison d'un problème identique d'hydro-solubilité du produit chloré, nous avons été amenés à modifier le traitement décrit par Spring *et al.*¹²⁷. Après hydrolyse de l'excès de SOCl_2 par addition de méthanol à 0°C, les composés volatils sont évaporés et le résidu est directement purifié par chromatographie flash sur gel de silice pour obtenir **4a** avec un excellent rendement de 82%. Le rendement global en dérivé **4a** à partir de l'acide kynurénique est de 52% pour trois étapes.

En conclusion, cette dernière voie de synthèse présente différents avantages par rapport aux deux autres voies d'accès. Elle permet d'atteindre le meilleur rendement global et sa mise en œuvre est simple. De plus, la toxicité des réactifs est plus faible comparée à ceux utilisés lors de la bromation radicalaire. Enfin, cette voie de synthèse nous a permis d'obtenir le produit **4a** à l'échelle de plusieurs dizaines de grammes, afin de facilement poursuivre les synthèses des AQs.

3. SYNTHÈSE DES ESTERS BORONIQUES

L'étape-clé de la séquence réactionnelle envisagée pour atteindre les 2-alcényl-4-hydroxyquinoléines est un couplage de Suzuki-Miyaura. Bien que de nombreux boronates soient commercialement disponibles, nous voulions avoir accès à des esters alcényl boroniques avec des chaînes carbonées de longueurs variées. Nous nous sommes donc intéressés à la mise au point de la synthèse d'esters pinacoliques d'acides alcényl boroniques par hydroboration directe des alcynes.

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from Pseudonocardia Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

La première synthèse d'esters boroniques a été reportée en 1960 par Herbert Brown¹⁵⁰ qui a obtenu le prix Nobel en 1979 pour sa découverte de la réaction d'hydroboration. Il s'agissait de réaction du catécholborane (généralisé *in situ*) avec des alcènes ou des alcynes pour former les dérivés correspondants de type boronates d'alkyles ou boronates d'alcényles respectivement. Ces derniers étaient obtenus stéréosélectivement en configuration *E*.

Concernant nos travaux, les premiers essais d'hydroboration ont été menés selon la méthode, sans catalyse métallique, décrite en 2014 par Ho *et al.*¹⁵¹ (Schéma 3.13). Cette méthode présente la synthèse des boronates d'alcényles dans l'octane, à partir d'alcyne et de pinacolborane, en présence d'un acide carboxylique comme catalyseur, sous reflux pendant 12 heures.

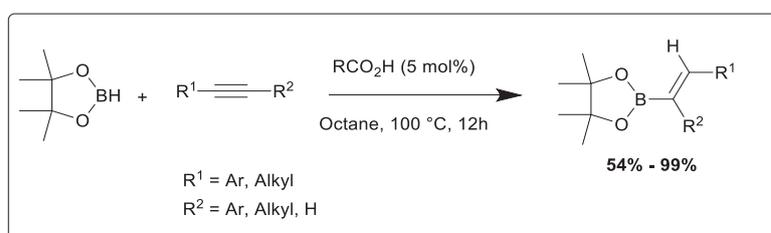


Schéma 3.13 Hydroboration d'alcynes par catalyse non métallique développée par Ho *et al.*¹⁵¹.

Malheureusement, lorsque nous avons appliqué ces conditions réactionnelles au phénylacétylène (utilisé comme modèle dans notre étude), nous n'avons obtenu que des traces d'ester boronique correspondant. Après la mise au point de la réaction (irradiation micro-onde sans solvant pendant 15 ou 30 minutes et acide 4-(diméthylamino)benzoïque comme catalyseur), nous avons pu synthétiser toute une gamme d'esters alcényl- ou cinnamyl-boroniques avec des rendements faibles à excellents (Schéma 3.14).

¹⁵⁰ Brown, H. C.; Snover, J. A.; Zweifel, G.; Murray, K. J.; Murray, L. J. Hydroboration. V. A Study of Convenient New Preparative Procedures for the Hydroboration of Olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (16), 4233–4241.

¹⁵¹ Ho, H. E.; Asao, N.; Yamamoto, Y.; Jin, T. Carboxylic Acid-Catalyzed Highly Efficient and Selective Hydroboration of Alkynes with Pinacolborane. *Org. Lett.* **2014**, *16* (17), 4670–4673.

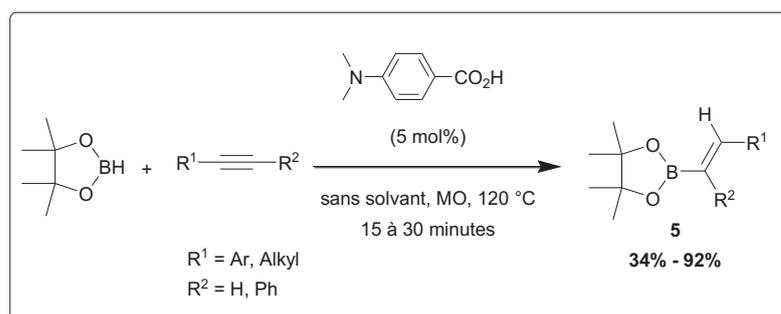


Schéma 3.14 Hydroboration d'alcynes sous irradiation micro-onde et sans solvant¹⁵².

Nos travaux nous ont donc permis de décrire une nouvelle méthode pour la synthèse d'esters boroniques sans solvant, réalisée en quelques minutes (15-30 min) sous irradiation MO et sans catalyseur métallique. Cette méthode nous a permis d'avoir rapidement à disposition une grande diversité de d'alcénylboronates avec des chaînes carbonées de longueurs variables (C₅ à C₁₂). Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Tetrahedron Letters* que vous trouverez ci-après.

¹⁵² Gioia, B.; Arnaud, A.; Radix, S.; Walchshofer, N.; Doléans-Jordheim, A.; Rocheblave, L. Solvent- and Metal-Free Hydroboration of Alkynes under Microwave Irradiation. *Tetrahedron Lett.* **2020**.



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetlet

Solvent- and metal-free hydroboration of alkynes under microwave irradiation

Bruna Gioia^a, Alexandre Arnaud^a, Sylvie Radix^a, Nadia Walchshofer^a, Anne Doléans-Jordheim^{b,c}, Luc Rocheblave^{a,*}

^aUniv Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISPB-Faculté de Pharmacie, EA 4446, B2MC, F-69373, Lyon Cedex 08, France

^bUniv Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, VetAgro Sup, UMR CNRS 5557, Ecologie Microbienne, F-69622 Villeurbanne, France

^cLaboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon (HCL), F-69000 Bron, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 November 2019
Revised 19 December 2019
Accepted 6 January 2020
Available online xxx

Keywords:
Hydroboration
Alkynes
Microwave
Solvent-free conditions

ABSTRACT

Boronic esters are versatile building blocks extensively used in organic chemistry and essential to a variety of coupling reactions. In this work, the hydroboration reactions of alkynes were performed without metal catalysts using concomitant microwave irradiation that allowed a significantly reduced reaction time. Another interesting outcome of this study was that the reaction could be carried out under solvent-free conditions, highlighting the environmentally-friendly nature of our method. A wide scope of aryl- and alkylboronic acid pinacol esters were easily synthesized from the corresponding alkynes.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Boronic ester derivatives are important to create carbon–carbon and carbon–heteroatom bonds [1] as exemplified by the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction [2], or oxidative boron Heck reaction [3]. The scope of boron-mediated reactions has been expanded in organic chemistry to the design and synthesis of various lead compounds in both the pharmaceutical and agricultural industries [4,5]. Considering the widespread use of organoboron derivatives, it would be of interest to develop a simple and eco-friendlier method to quickly synthesize boronic esters. Alkenylboronic esters have been traditionally obtained by the reactions of Grignard reagents with trialkylboronates but the hydroboration of alkynes has also found to be very efficient [6,7].

The most often described hydroborations of alkynes were conducted under thermal conditions with prolonged reaction times [8]. Moreover, numerous alkyne borylations have been described including transition metal-catalyzed reactions [9–12].

In recent years, metal-free approaches have also been investigated: tris(2,4,6-trifluorophenyl)borane could be considered as a good catalyst for the direct hydroboration of terminal alkynes [13]. Another example involved (diacetoxyiodo)benzene (PIDA)

catalysis and *t*-BuONa for the highly selective hydroboration of terminal alkynes under air conditions [14]. Recently, Jin and co-workers proposed a hydroboration of alkynes in solution using carboxylic acid-based catalysis [15]. However, the main drawback to these approaches was a prolonged reaction time. Thereby, the microwave-assisted borations of alkynes or alkenes have also been developed, as described by Kappe and co-workers in a one-pot platinum(0)-catalyzed diboration/Suzuki–Miyaura cross-coupling sequence in 1,4-dioxane [16]. Microwave irradiation has also been applied for the dehydrogenative borylations of alkenes in the presence of bis(pinacolato)boron ($B_2(Pin)_2$) [17]. Moreover, the microwave-assisted hydroboration of α,β -unsaturated carbonyl compounds has been described in 1,4-dioxane [11]. More recently, it has been shown that microwave irradiation can be used for the hydroboration of alkynes in chloroform in the presence of different boron catalysts [18].

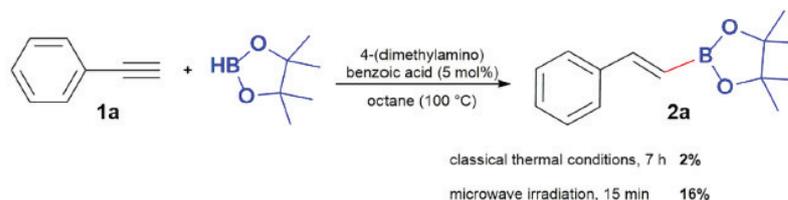
In this work, we have focused our attention on the synthesis of alkenyl boronates as building blocks under microwave irradiation, using both metal- and solvent-free conditions, an approach that was not described before.

Results and discussion

The hydroboration of phenylacetylene **1a**, was used as a model reaction (Scheme 1). A calibration curve was established using a LC/UV method (see ESI) to determine the yields of boronic ester

* Corresponding author.

E-mail address: luc.rocheblave@univ-lyon1.fr (L. Rocheblave).



Scheme 1. Initial conditions for the model hydroboration reaction.

2a in the reaction mixture during the development of the model reaction (Tables 1–5). Isolated yields of all boronic acid pinacol esters **2a-t** were also determined after purification by column chromatography on silica gel.

First, the hydroboration reaction of phenylacetylene **1a** was carried out under similar conditions to those described by Jin and co-workers [15] (octane as the solvent at 100 °C) but boronic ester **2a** was only obtained in trace amounts (2%) after 7 h (Scheme 1). At the same time, **2a** was obtained in 16% yield after 15-minute microwave irradiation under otherwise identical reaction conditions. This promising result encouraged us to conduct a methodological study to optimize the reaction conditions. We considered the nature of the solvent, whether or not a solvent was required, the reaction temperature and the reaction time, the nature of the catalyst and its amount.

Considering that octane was not an ideal solvent for microwave irradiation ($\epsilon = 1.93$ at 30 °C, 1 bar), the reaction was performed in the presence of more polar solvents in which microwave-assisted reactions are reported to proceed more efficiently [19]. Using the converting rules (according to Arrhenius law) [20], the reaction was conducted at 150 °C for 30 min in four different solvents as shown in Table 1. Surprisingly, the highest yield of **2a** was still obtained in octane (Table 1, entry 4).

This result prompted us to evaluate the importance of the solvent for this hydroboration reaction of alkynes, under metal-free conditions using concomitant microwave irradiation. First, the reaction was carried out at three different temperatures (120 °C, 150 °C and 170 °C) for 15 or 30 min, with or without octane for comparison. As shown in Tables 2 and 3, the best result was obtained at 120 °C after 15 min irradiation, under neat conditions

Table 1
Effect of the nature of the solvent.

Entry	Solvent	Yield 2a (%) ^{a,b}
1	1,4-Dioxane	48
2	Acetonitrile	62
3	Dimethylformamide	3
4	Octane	70

^a Reagents and conditions: phenylacetylene **1a** (1 eq, 2.36 mmol), pinacol borane (4 eq, 9.44 mmol), solvent (2.4 mL), 4-(dimethylamino)benzoic acid (5 mol%), microwave irradiation, 150 °C, 30 min. ^bYields were determined using a calibration curve.

Table 2
Reaction condition optimization in octane or solvent-free medium under microwave irradiation.

	Octane (Yield 2a , %) ^{a,b}			No solvent (Yield 2a , %) ^{a,b}		
	120 °C	150 °C	170 °C	120 °C	150 °C	170 °C
15 min	14	63	62	77	50	30
30 min	15	70	52	48	20	2

^a Reagents and conditions: phenylacetylene **1a** (1 eq, 2.36 mmol), pinacol borane (4 eq, 9.44 mmol), octane (2.4 mL) or not, 4-(dimethylamino)benzoic acid (5 mol%), microwave irradiation. ^b Yields of **2a** were determined using a calibration curve after a complete conversion of the substrate **1a**, under microwave conditions at different temperatures and reaction time, in the presence or absence of octane.

Table 3
Microwave-assisted reaction time optimization under solvent-free conditions.

Entry	Time (min)	Yield 2a (%) ^{a,b}
1	5	38
2	10	57
3	15	77
4	20	64
5	25	54
6	30	48

^a Reagents and conditions: phenylacetylene **1a** (1 eq, 2.36 mmol), pinacol borane (4 eq, 9.44 mmol), 4-(dimethylamino)benzoic acid (5 mol%), microwave irradiation, 120 °C. ^bYields were determined using a calibration curve.

Table 4
Influence of various carboxylic acids as catalysts on the hydroboration of phenylacetylene **1a** with HB(Pin).

Entry	Catalyst (pKa)	Yield 2a (%) ^{a,b}
1	4-nitrobenzoic acid (3.44)	63
2	benzoic acid (4.20)	66
3	4-(dimethylamino)benzoic acid (5.03)	77
4	2-(dimethylamino)benzoic acid (8.42)	4
5	trifluoroacetic acid (0.52)	44
6	formic acid (3.75)	41
7	acetic acid (4.76)	62

^a Reagents and conditions: phenylacetylene **1a** (1 eq, 2.36 mmol), pinacol borane (4 eq, 9.44 mmol), carboxylic acid catalyst (5 mol%), microwave irradiation, 120 °C, 15 min. ^b Yields were determined using a calibration curve.

Table 5
Effect of the amount of 4-(dimethylamino)benzoic acid as a catalyst.

Entry	4-(dimethylamino) benzoic acid (mol%)	Yield 2a (%) ^{a,b}
1	1	31
2	4	64
3	5	77
4	6	71
5	10	70

^a Reagents and conditions: phenylacetylene **1a** (1 eq, 2.36 mmol), pinacol borane (4 eq, 9.44 mmol), 4-(dimethylamino)benzoic acid (from 1 to 10 mol%), microwave irradiation, 120 °C, 15 min. ^b Yields were determined using a calibration curve.

(77% yield, Table 2 and Table 3, entry 3). However, increasing the reaction time did not improve the yield (Table 3, entries 4–6).

We further investigated the nature of the catalyst for this reaction (Table 4). As Jin and co-workers have shown that the

Table 6
Solvent- and metal-free hydroboration of various aryl- or alkyl-alkynes under microwave irradiation.

Boronic esters	Time (min.)	R	R'	Yield 2 (%) ^{ab}
2a	15	Ph	H	62 (77) ^c
2b	15	3-(MeO)C ₆ H ₄	H	60
2c	15	4-(MeO)C ₆ H ₄	H	58
2d	15	PhCH ₂	H	79
2e	15	Ph	Ph	28
2f	15	3-(MeO ₂ C)C ₆ H ₄	H	65
2g	15	4-(MeO ₂ C)C ₆ H ₄	H	48
2h	–	CH ₂ NH ₂	H	0
2i	–	CH ₂ NHCH ₃	H	0
2j	15	CH ₂ OCH ₃	H	34
2k	15	3-Cl-C ₆ H ₄	H	55
2l	15	4-Cl-C ₆ H ₄	H	92
2m	30	(CH ₂) _n CH ₃ n = 2	H	35
2n	30	n = 3	H	54
2o	30	n = 4	H	64
2p	30	n = 5	H	58
2q	30	n = 6	H	50
2r	30	n = 7	H	62
2s	30	n = 8	H	61
2t	30	n = 9	H	88

^a Reagents and conditions: alkyne (1 eq, 2.36 mmol), pinacol borane (4 eq, 9.44 mmol), 4-(dimethylamino)benzoic acid (5 mol%), microwave irradiation, 120 °C. ^b Isolated yields. ^c Yield shown in parentheses was determined using a calibration curve. Estimated and isolated yields could differ because boronate 2a is volatile.

carboxylic group was crucial for the catalytic hydroboration of alkynes with HB(Pin) in octane [15], different carboxylic acids were evaluated. These results showed that the catalytic activity depends on the acidity of carboxylic acids. The use of stronger acids resulted in lower yields (Table 4, entries 5 and 6). The weaker 4-(dimethylamino)benzoic acid proved to be the best catalyst. It is worth noting that 2-(dimethylamino)benzoic acid was much less efficient under our solvent-free conditions and gave boronic ester 2a with a very low 4% yield (Table 4, entry 4). This different catalytic activity has previously been reported [15] and could be explained by the formation of an inactive four-coordinate boron species bound to the N and O atoms of 2-(dimethylamino)benzoic acid.

Finally, we observed that the maximum yield of boronic ester 2a was observed with 5 mol% of 4-(dimethylamino)benzoic acid (Table 5, entry 3). It is worth noting that an increase of the catalyst amount did not increase the reaction yields (Table 4).

At this stage, these new combined solvent- and metal-free hydroboration conditions were applied to a wide scope of aromatic or aliphatic alkynes to obtain the corresponding boronic esters 2a-t in moderate to excellent yields (Table 6). This reaction proceeded through an *anti*-Markovnikov and *syn*-addition of HB(Pin) to the alkynes.

As shown in Table 6, this procedure was compatible with many functional groups such as ethers, esters or chlorine atoms. In the case of the hydroboration of methyl propargyl ether or pent-1-yne, the corresponding boronic esters 2j and 2m were obtained with poor isolated yields. In both cases, purification by column chromatography was challenging because the R_f values of the alkyne and the corresponding boronic ester were very close. Moreover, it is worth noting that the hydroboration did not proceed when propargyl amines 2h and 2i were used as starting materials. In this case, the reaction resulted in gas release, which was presumably hydrogen, produced after a dehydrocoupling reaction between pinacol borane and amine functionalities [21].

This method also allowed us to obtain the more sterically hindered (*Z*)-stilbeneboronic acid pinacol ester 2e from diphenylacetylene and HB(Pin) in a moderate 28% yield. The ¹H NMR

spectral characteristics of 2e were identical to that previously published [22], attesting to the *syn* addition of HB(Pin) onto the triple bond.

This new method was also applied to alkyl alkynes with a minor adjustment concerning the reaction time. It was observed that the best yields were obtained at 120 °C for 30 min for alkynes having various chain lengths (i.e. C5–C12): the corresponding aliphatic boronic esters 2m-t were obtained with moderate to good yields. It is important to note that the alkenyl boronic esters 2p-r were obtained in lower yields (35–43%) when the hydroboration was carried out in octane under otherwise identical reaction conditions.

All of the final boronic esters prepared from terminal alkynes (R' = H), were stereoselectively obtained with a *trans* double bond whose stereochemistry was checked by ¹H NMR (the coupling constant ³J_{HH}, measured from the displacements of alkenyl protons, was approximately equal to 18 Hz).

Conclusion

In this paper, we have developed a solvent- and metal-free approach to synthesize boronic esters under microwave irradiation, which significantly reduced the reaction time from hours to minutes. This simple and eco-friendlier procedure has been applied on a wide scope of aromatic and aliphatic alkynes to lead to the corresponding boronate esters.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Vaincre la Mucoviscidose (RF20160501634/1/2/99) and Gregory Lemarchal associations for the financial support over these past two years. They thank Pr T. Lomberget for his helpful discussions for this work. The authors are grateful to Auvergne Rhône-Alpes region for the Anton Paar Monowave 300 microwave synthesizer acquisition. They thank the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de

ARTICLE IN PRESS

4

B. Gioia et al. / Tetrahedron Letters xxx (xxxx) xxx

Technologie (MENRT) and Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS) for the PhD fellowship of B. Gioia. The authors acknowledge the helpful suggestions made by Drs L.P. Jordheim, D. Goldie, J.P. Salvi.

References

- [1] W. Lu, Z. Shen, *Org. Lett.* 21 (2019) 142–146.
- [2] S.E. Hooshmand, B. Heidari, R. Sedghi, R.S. Varma, *Green Chem.* 21 (2019) 381–405.
- [3] A.-L. Lee, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 5357–5366.
- [4] N.A. Petasis, *Aust. J. Chem.* 60 (2007) 795.
- [5] A.J.J. Lennox, G.C. Lloyd-Jones, *Chem Soc Rev* 43 (2014) 412–443.
- [6] N. Miyaoura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* 95 (1995) 2457–2483.
- [7] D. Hall, In *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and Medicine*; G. John Wiley & Sons Ltd (2006) 1–99.
- [8] R. Barbeyron, E. Benedetti, J. Cossy, J.-J. Vasseur, S. Arseniyadis, M. Smetana, *Tetrahedron* 70 (2014) 8431–8452.
- [9] G. Zhang, J. Wu, H. Zeng, M.C. Neary, M. Devany, S. Zheng, P.A. Dub, *ACS Catal.* 9 (2019) 874–884.
- [10] H. Ben-Daat, C.L. Rock, M. Flores, T.L. Groy, A.C. Bowman, R.J. Trovitch, *Chem. Commun.* 53 (2017) 7333–7336.
- [11] X. Huang, M. Wang, M. Wu, J. Wang, Y. Peng, G. Song, *ChemistrySelect* 2 (2017) 1381–1385.
- [12] D. Wei, B. Carboni, J.-B. Sortais, C. Darcel, *Adv. Synth. Catal.* 360 (2018) 3649–3654.
- [13] J.R. Lawson, L.C. Wilkins, R.L. Melen, *Chem. - Eur. J.* 23 (2017) 10997–11000.
- [14] S. Chen, L. Yang, D. Yi, Q. Fu, Z. Zhang, W. Liang, Q. Zhang, J. Ji, W. Wei, *RSC Adv.* 7 (2017) 26070–26073.
- [15] H.E. Ho, N. Asao, Y. Yamamoto, T. Jin, *Org. Lett.* 16 (2014) 4670–4673.
- [16] H. Prokopcová, J. Ramírez, E. Fernández, C.O. Kappe, *Tetrahedron Lett.* 49 (2008) 4831–4835.
- [17] I.A.I. Mkhaliid, R.B. Coapes, S.N. Edes, D.N. Coventry, F.E.S. Souza, Thomas RLI, Hall JJ, Bi S-W, Lin Z, Marder TB, *Dalton Trans* (2008) 1055–1064.
- [18] J.L. Carden, L.J. Gierlich, D.F. Wass, D.L. Browne, R.L. Melen, *Chem. Commun.* 55 (2019) 318–321.
- [19] D.W. Brazier, G.R.T. Freeman, *Can. J. Chem.* 47 (1969) 893–899.
- [20] C.O. Kappe, D. Dallinger, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 51–63.
- [21] E.A. Romero, J.L. Peltier, R. Jazzar, G. Bertrand, *Chem. Commun.* 52 (2016) 10563–10565.
- [22] M. Fleige, J. Möbus, T. vom Stein, F. Glorius, D.W. Stephan, *Chem. Commun.* 52 (2016) 10830–10833.

Les boronates constituent donc des briques élémentaires, souvent essentielles pour des couplages métallo-catalysés, tels que le couplage de Suzuki-Miyaura ou la réaction de Heck. Jusqu'à récemment, les réactions d'hydroboration ont été, pour la plupart, catalysées par des métaux lourds. Au cours des dix dernières années, la communauté scientifique a commencé à s'intéresser à d'autres voies d'accès n'employant pas de métaux^{151,153,154,155}. L'étude méthodologique que nous avons menée nous a permis de mettre au point une méthode de synthèse d'esters boroniques efficace et rapide, qui répond à certains critères de la chimie verte : réaction sans solvant, sans catalyse métallique et avec des temps de réaction réduits.

4. SYNTHÈSE DES COMPOSÉS Δ^n -AQ-C_n

Nous présentons dans ce paragraphe la synthèse des premiers composés cibles appartenant à la famille des Δ^n -AQ-C_n, selon un couplage de Suzuki-Miyaura entre une 2-(halogénométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4a** ou **4b**) et un boronate d'alcényle (**5a-h**) (Schéma 3.15)

¹⁵¹ Ho, H. E.; Asao, N.; Yamamoto, Y.; Jin, T. Carboxylic Acid-Catalyzed Highly Efficient and Selective Hydroboration of Alkynes with Pinacolborane. *Org. Lett.* **2014**, *16* (17), 4670–4673.

¹⁵³ Hoyt, C. B.; Sarazen, M. L.; Jones, C. W. Hydroboration of Substituted Alkynes Using a Solid Polymeric Carboxylic Acid Catalyst. *J. Catal.* **2019**, *369*, 493–500.

¹⁵⁴ Fleige, M.; Möbus, J.; Vom Stein, T.; Glorius, F.; Stephan, D. W. Lewis Acid Catalysis: Catalytic Hydroboration of Alkynes Initiated by Piers' Borane. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (72), 10830–10833.

¹⁵⁵ Wen, K.; Chen, J.; Gao, F.; Bhadury, P. S.; Fan, E.; Sun, Z. Metal Free Catalytic Hydroboration of Multiple Bonds in Methanol Using N-Heterocyclic Carbenes under Open Atmosphere. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (37), 6350–6356.

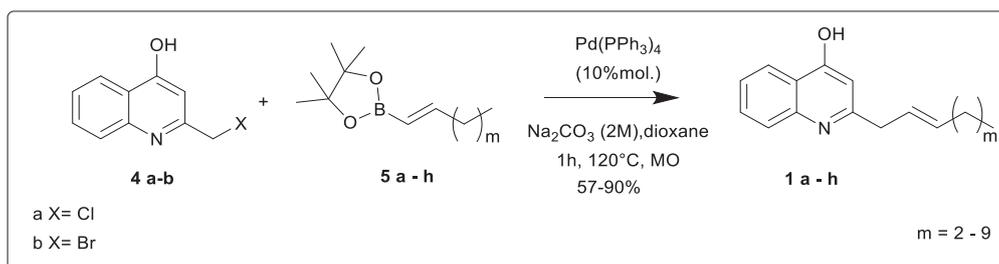


Schéma 3.15 Couplage de Suzuki-Miyaura pour la synthèse des dérivés Δ^2 -AQ-C_n.

4.1. Couplage de Suzuki-Miyaura : données bibliographiques

La réaction de Suzuki-Miyaura (SM) a été décrite pour la première fois par Akira Suzuki et Norio Miyaura en 1979^{156,157}. Elle consiste en un couplage pallado-catalysé entre un dérivé d'acide boronique avec un halogénure ou un triflate d'alcényle, d'alcynyle ou d'aryle. Le couplage de SM permet la formation directe d'une liaison simple carbone-carbone^{158,159}. Une variation du couplage SM est la réaction entre un organoboronate et un dérivé acyle électrophile pour former un dérivé carbonyle¹⁶⁰.

La réaction SM a été largement utilisée au cours de ces dernières années. Une revue récente¹⁶¹ montre comment de 1995 à 2017, les publications relatives à ce sujet ont connu une croissance exponentielle. Cet intérêt s'explique du fait de conditions réactionnelles

¹⁵⁶ Miyaura, N.; Kinji, Y.; Akira, S. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Letters*, 20(36), **1979**, 3437–3440.

¹⁵⁷ Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95 (7), 2457–2483.

¹⁵⁸ Doucet, H. Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions of Alkylboronic Acid Derivatives or Alkyltrifluoroborates with Aryl, Alkenyl or Alkyl Halides and Triflates. *European J. Org. Chem.* **2008**, 12, 2013–2030.

¹⁵⁹ Littke, A. F.; Fu, G. C. Palladium-Catalyzed Coupling Reactions of Aryl Chlorides (Detrimental Effect of Sterics in Cross Coupling Reactions). *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, 41, 4176–4211.

¹⁶⁰ Buchspies, J.; Szostak, M. Recent Advances in Acyl Suzuki Cross-Coupling. *Catalysts* **2019**, 9 (1), 53.

¹⁶¹ Hooshmand, S. E.; Heidari, B.; Sedghi, R.; Varma, R. S. Recent Advances in the Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction Using Efficient Catalysts in Eco-Friendly Media. *Green Chem.* **2019**, 21 (3), 381–405.

simples, de la facilité de préparation des dérivés organoboroniques ainsi qu'à leur stabilité¹⁶². Ces dernières années, des approches de cette réaction respectant les critères de chimie verte ont été envisagées. Elles mettent en œuvre des solvants comme l'eau et l'éthanol, purs ou en mélange ; elles utilisent des catalyseurs sur supports nano-particulaires¹⁶¹.

Le couplage est principalement catalysé par des complexes du palladium mais des catalyses au nickel sont également mises en œuvre¹⁶³. L'intérêt pour ce métal est en augmentation constante, du fait de sa grande abondance dans l'environnement et de son prix réduit par rapport à celui du palladium¹⁶². Le couplage de Suzuki-Miyaura peut également être catalysé par des nanoparticules chargées avec l'or. Cette approche gagne en intérêt, surtout dans le monde de l'industrie. Dans ce cas, le couplage est réalisé dans des conditions relativement douces, par irradiation laser du catalyseur¹⁶⁴.

¹⁶¹ Hooshmand, S. E.; Heidari, B.; Sedghi, R.; Varma, R. S. Recent Advances in the Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction Using Efficient Catalysts in Eco-Friendly Media. *Green Chem.* **2019**, *21* (3), 381–405.

¹⁶² Han, F. S. Transition-Metal-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions: A Remarkable Advance from Palladium to Nickel Catalysts. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (12), 5270–5298.

¹⁶³ Tobisu, M.; Xu, T.; Shimasaki, T.; Chatani, N. Nickel-Catalyzed Suzuki-Miyaura Reaction of Aryl Fluorides. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (48), 19505–19511.

¹⁶⁴ Wang, C.; Astruc, D. Nanogold Plasmonic Photocatalysis for Organic Synthesis and Clean Energy Conversion. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (20), 7188–7216.

4.2. Couplage de Suzuki : travaux personnels

Lors de nos travaux, le protocole utilisé pour le couplage de SM est celui décrit par Spring *et al.*¹²⁷ (Schéma 3.1). Un boronate d'alcényle (**5a-h**) est couplé à une 2-(halogénométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4a** ou **4b**) sous irradiation MO dans un mélange dioxane/eau, en milieu basique et en présence de palladium(0) en quantités catalytiques. Après une heure à 120°C, les 2-alkyl-4-hydroxyquinoléines **1a-h** ont alors été obtenues avec des rendements moyens à excellents après purification sur colonne de silice.

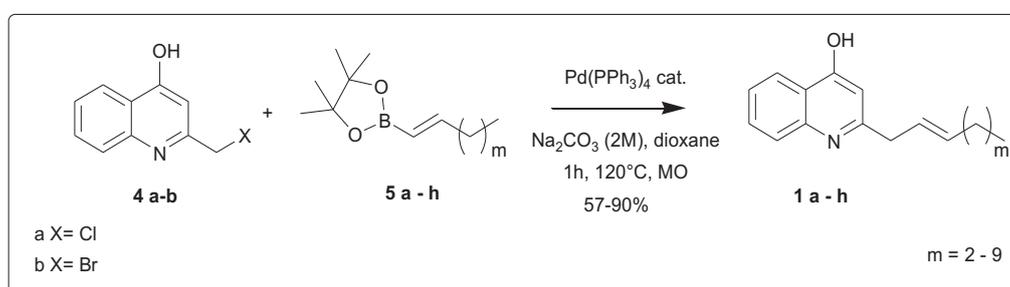
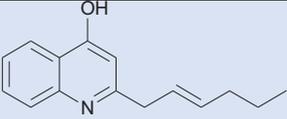
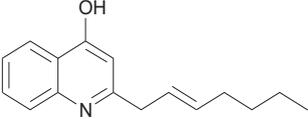
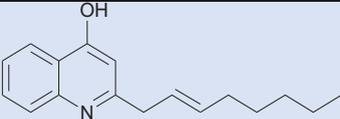
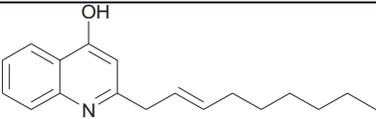
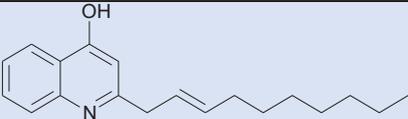
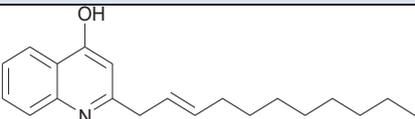
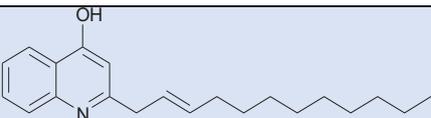
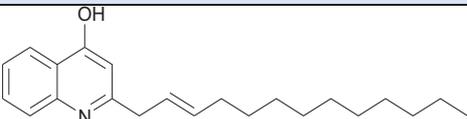


Schéma 3.15 Synthèse de dérivés Δ^2 -AQ- C_n par couplage de Suzuki-Miyaura.

¹²⁷ Salvaggo, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from Pseudonocardia Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

Tableau 3.3 Structures chimiques et rendement des Δ^2 -AQ-C_n synthétisés

Composés	Δ^2 -AQ-C _n	Structure	Rendement (%)
1a	Δ^2 -AQ-C ₆		90
1b	Δ^2 -AQ-C ₇		86
1c	Δ^2 -AQ-C ₈		80
1d	Δ^2 -AQ-C ₉		74
1e	Δ^2 -AQ-C ₁₀		70
1f	Δ^2 -AQ-C ₁₁		68
1g	Δ^2 -AQ-C ₁₂		66
1h	Δ^2 -AQ-C ₁₃		57

La qualité du catalyseur est une condition importante au succès du couplage SM (la couleur jaune canari brillant est gage de bonne qualité). Nous avons donc choisi de synthétiser le tétrakis(triphénylphosphine)palladium, non seulement pour pallier le problème de pureté du $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ commercial (souvent de couleur noire et impropre au couplage de SM) mais également pour des raisons budgétaires (Schéma 3.16).

Le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ est obtenu sous forme d'un solide jaune canari brillant, à partir de la triphénylphosphine avec du PdCl_2 . Le catalyseur a pu être synthétisé avec un rendement de 90%, à l'échelle de 2-3 grammes et conservé sous argon à $-30\text{ }^\circ\text{C}$.

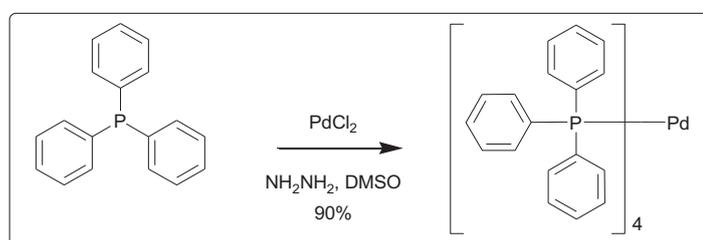


Schéma 3.16 Synthèse du catalyseur tétrakis(triphénylphosphine)palladium.

Le principal inconvénient à la conduite du couplage de SM sous irradiation MO est la difficulté de travailler sur grande échelle afin d'obtenir des quantités suffisantes de dérivé pour permettre i) une manipulation aisée lors de la purification, ii) la caractérisation structurale, iii) la poursuite éventuelle de la synthèse et, iv) l'évaluation biologique. En effet, bien que les rendements obtenus aient été moyens à excellents (57% - 90%), les quantités isolées après purification ont été limitées à une centaine de mg et nous ont obligé à répéter plusieurs fois la réaction.

Nous avons donc tenté de mener le couplage de SM sur des quantités plus importantes en réalisant la réaction dans des conditions classiques de chauffage. Une tentative a été conduite avec un ester boronique commercial **5d** et le dérivé **4a** (Schéma 3.17). Cependant, après une nuit à $101\text{ }^\circ\text{C}$, la réaction n'a conduit qu'à un mélange complexe de composé (suivi CCM) qui a rendu difficile la purification du produit final obtenu avec un faible rendement de 27%.

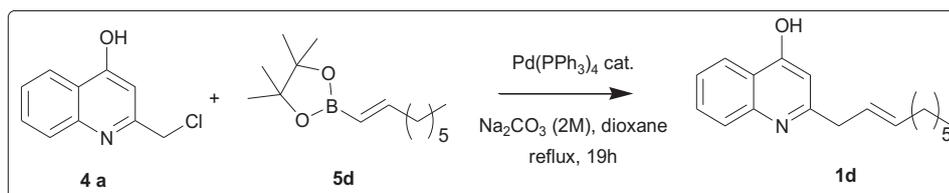


Schéma 3.17 Essai du couplage de Suzuki-Miyaura par chauffage thermique.

Les composés Δ^2 -AQ-C_n ont été testés *in vitro*. Les méthodes et les résultats d'évaluation de l'activité antibactérienne seront détaillés dans le Chapitre 4. L'évaluation biologique du premier lot synthétisé du dérivé **1f** (Δ^2 -AQ-C₁₁-**lot 1**) a montré que Δ^2 -AQ-C₁₁-**lot 1** possédait une activité d'inhibition complète de la croissance de **Sa**. Or, l'évaluation d'un deuxième lot de fabrication, Δ^2 -AQ-C₁₁-**lot 2**, n'a pas montré les mêmes résultats puisque, dans ce cas, l'inhibition de la croissance de **Sa** n'était que partielle. Nous avons donc cherché à comprendre cette différence d'activité. Notre hypothèse est que le dérivé **1f** n'existerait pas sous la même forme tautomère dans les deux lots.

En effet, une étude des spectres de RMN ¹H, enregistrés dans le chloroforme deutéré pour les deux lots de composé **1f**, nous a permis d'identifier de faibles différences de déplacements chimiques pour le proton H5 du cycle (Figure 3.2). Inversement, les déplacements de RMN ¹³C sont très proches entre les deux lots. Les déplacements des signaux correspondants au C4 du **lot 1** et du **lot 2** sont respectivement de 177.75 ppm et 178.33 ppm, qui correspondent à la forme tautomère cétonique. Par conséquent, la différence d'activité retrouvée entre les deux lots est donc indépendante de la forme tautomère.

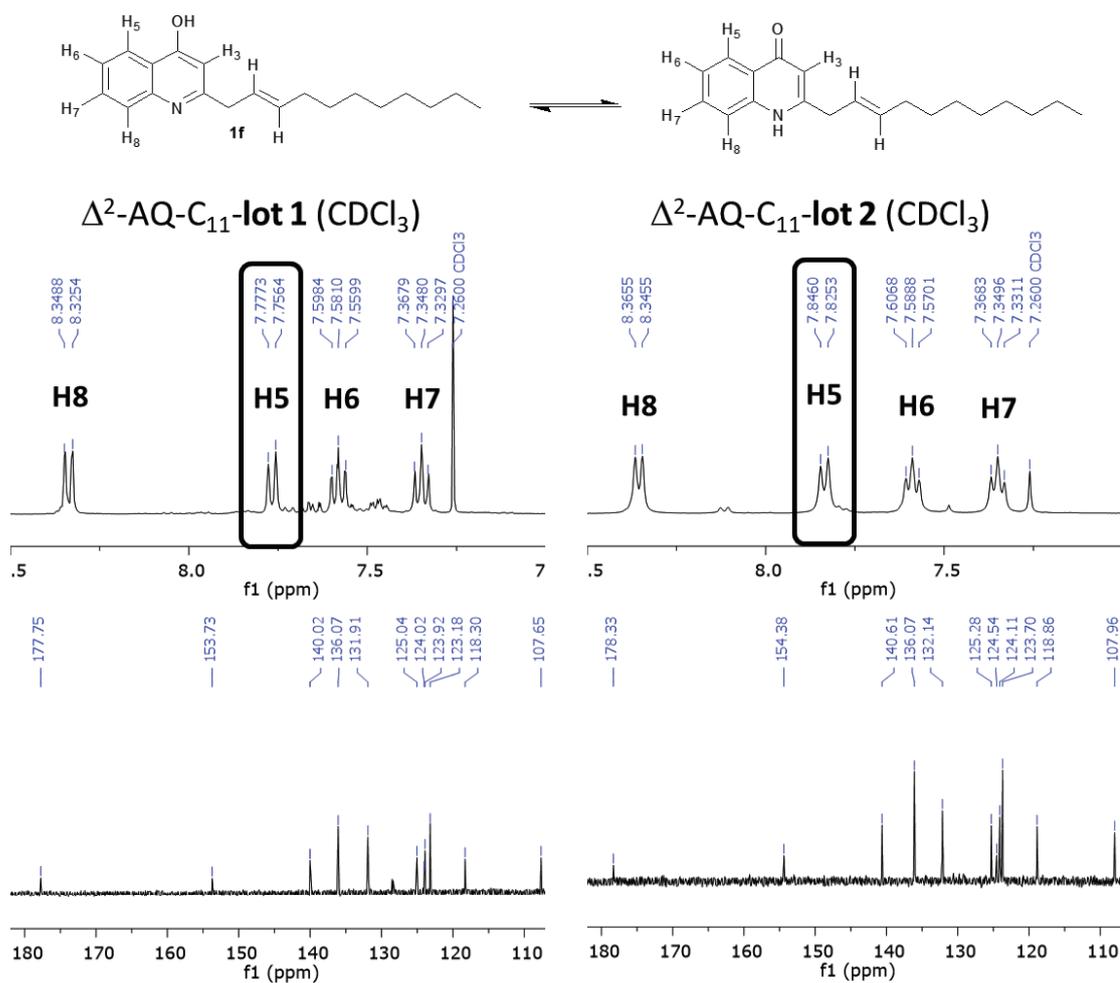


Figure 3.2 Déplacements chimiques en RMN ¹H et ¹³C-pour les deux lots de Δ^2 -AQ-C₁₁.

Agrandissements de la zone des protons aromatiques.

Pour rappel, la tautomérie entre les deux formes quinoléine et quinolone était décrite (Chapitre 2, page 65), les deux formes sont en équilibre mais il existe une prévalence entre les deux tautomères selon la forme solide/liquide et selon le pH du milieu⁷³.

⁷³ Heeb, S.; Fletcher, M. P.; Chhabra, S. R.; Diggle, S. P.; Williams, P.; Cámara, M. Quinolones: From Antibiotics to Autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35* (2), 247–274.

Pour enrichir ce travail préliminaire sur la tautomérie du composé **1f** nous avons réalisés une étude sur le pH du solvant (CDCl_3 , CD_3OD ou DMSO-d_6) du Δ^2 -AQ-C₁₁-lot **2**. Sur la base de déplacements en RMN ^{13}C du C4, compris entre 176 ppm et 180 ppm, nous confirmons que la forme cétonique est le tautomère prédominant en solution, pour le composé **1f** et vraisemblablement pour tous les dérivés Δ^2 -AQ-C_n^{100,106,108}.

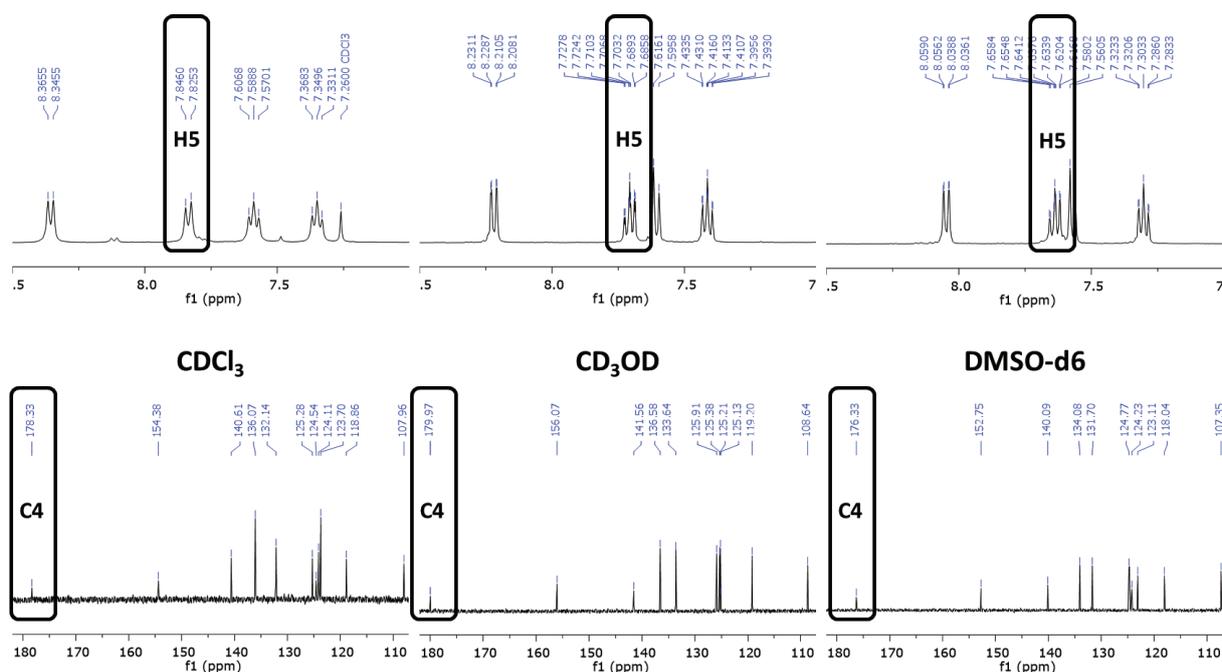


Figure 3.3 Déplacements chimiques en RMN ^1H - et ^{13}C des dérivés Δ^2 -AQ-C₁₁-lot **2**, dans CDCl_3 , CD_3OD et DMSO-d_6 . Agrandissement de la zone des protons aromatiques.

¹⁰⁰ Nasiri, H. R.; Bolte, M.; Schwalbe, H. Tautomerism of 4-hydroxy-4(1h)-quinolon. *Heterocycl. Commun.* **2006**, *12* (5), 319–322.

¹⁰⁶ Pogoda, D.; Janczak, J.; Pawlak, S.; Zaworotko, M.; Videnova-Adrabsinska, V. Tautomeric Polymorphism of the Neuroactive Inhibitor Kynurenic Acid. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2019**, *75*, 793–805.

¹⁰⁸ de la Cruz, A.; Elguero, J.; Goya, P.; Martínez, A.; Pfeleiderer, W. Tautomerism and Acidity in 4-Quinolone-3-Carboxylic Acid Derivatives. *Tetrahedron* **1992**, *48* (29), 6135–6150.

Nous avons ensuite traité un troisième lot du composé **1f** avec (i) TEA \rightarrow Δ^2 -AQ-C₁₁-TEA (ii) HCl \rightarrow Δ^2 -AQ-C₁₁-HCl. Le spectre RMN du lot Δ^2 -AQ-C₁₁-lot **1** synthétisé était plus proche de l'échantillon traité avec HCl. Les deux lots Δ^2 -AQ-C₁₁-HCl et Δ^2 -AQ-C₁₁-lot **1** n'ont pas montré la même activité *in vitro*.

Pour mieux comprendre la structure et le comportement de ces molécules, nous avons formé le chlorhydrate du Δ^2 -AQ-C₁₁, par traitement du composé avec une solution de HCl (1M) dans l'éther diéthylique. Le spectre RMN montre une différence entre l'échantillon avant et après traitement, confirmant la formation du chlorhydrate. Le composé chlorhydrate montre une meilleure solubilité dans le milieu biologique, mais l'activité n'était toujours pas à la hauteur du premier essai (Δ^2 -AQ-C₁₁-lot **1**). Finalement, nous avons considéré les premiers résultats obtenus comme un faux positif.

Cependant, par rapport aux données bibliographiques (*cf.* Chapitre 2, page 65), nous pouvons supposer que la tautomérie et la solubilité dans le milieu biologique soient des facteurs importants pour l'activité biologique de nos composés. Des investigations supplémentaires sur la structure et sur les comportements dans un milieu biologique sont nécessaires pour faire une liaison entre structure et activité. Le blocage d'une des formes tautomères serait important à réaliser pour comprendre l'activité des molécules synthétisées. Cet aspect sera davantage étudié lors de la synthèse de Δ^2 -AQNO-C_n.

5. SYNTHÈSE DE COMPOSÉS AQ-C_n

5.1. Essai d'alkylation de la 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine

Les dérivés de la 4-hydroxyquinoléine AQ-C_n (**2a-d**), qui présentent une chaîne latérale saturée, sont accessibles par plusieurs méthodes. La voie de synthèse la plus utilisée passe par une condensation d'une aniline sur un β-cétoester pour former l'énamine correspondante qui subit ensuite une cyclisation de Conrad-Limpach¹³⁷. Cependant, la littérature fait également état d'une réaction d'alkylation de la 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine en présence d'une base pour générer l'anion benzylique qui réagit ensuite avec un halogénure d'alkyle pour aboutir au dérivé AQ-C_n correspondant (Schéma 3.18)¹⁶⁵.

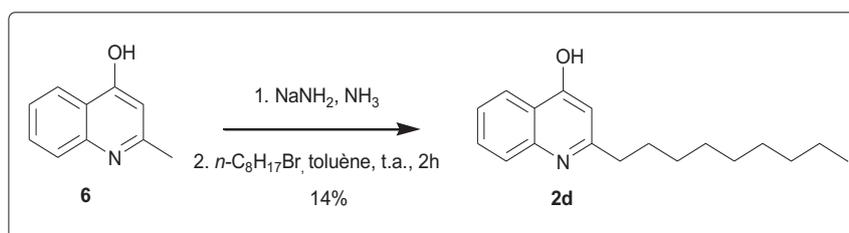


Schéma 3.18 Exemple de réaction d'alkylation de la 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine¹⁶⁵

Un essai d'alkylation de la 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine (**6**) a donc été réalisé à -30 °C, en présence de BuLi et de 1-bromobutane (**14**), pour obtenir le composé AQ-C₅ **15** avec un rendement très faible.

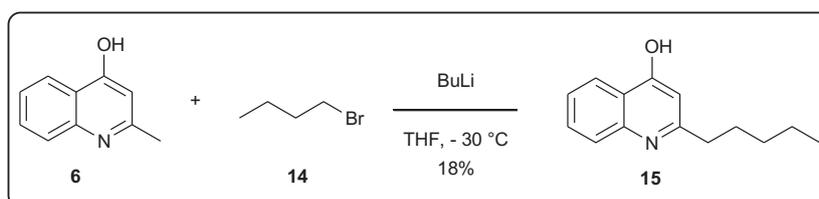


Schéma 3.19 Essai d'alkylation directe sur 2-méthyl-4-hydroxyquinoléine

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (25), 7271–7275.

¹⁶⁵ Royt, P. W.; Honeychuck, R. V.; Ravich, V.; Ponnaluri, P.; Pannell, L. K.; Buyer, J. S.; Chandhoke, V.; Stalick, W. M.; DeSesso, L. C.; Donohue, S.; et al. 4-Hydroxy-2-Nonylquinoline: A Novel Iron Chelator Isolated from a Bacterial Cell Membrane. *Bioorg. Chem.* **2001**, *29* (6), 387–397.

Les conditions opératoires de cette réaction d'alkylation – telles que le contrôle de la température, la qualité des réactifs ainsi que leur vitesse et leur sens d'addition - auraient pu être optimisées afin d'améliorer le rendement. Cependant, pour plus d'efficacité, nous avons privilégié la mise au point de la synthèse des AQ-C_n par hydrogénation catalytique des dérivés Δ^2 -AQ-C_n (**1 a-h**) obtenus précédemment.

5.2. Hydrogénation catalytique de Δ^2 -AQ-C_n

Cette méthode alternative nous permet d'exploiter les composés issus du couplage de Suzuki-Miyaura.

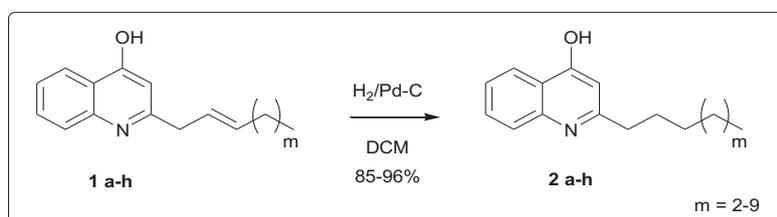
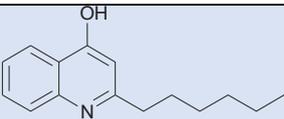
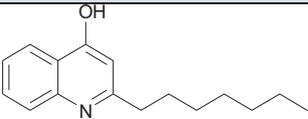
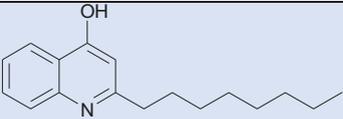
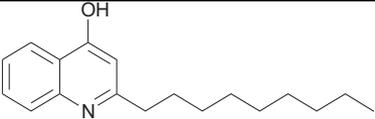
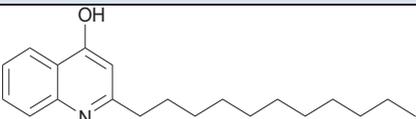
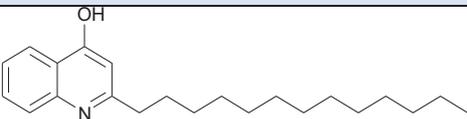


Schéma 3.20 Hydrogénation catalytique de Δ^2 -AQ-C_n

Tableau 3.4 Structures et rendements des molécules synthétisées

Composés	AQ-C _n	Structure	Rendement (%)
2a	AQ-C ₆		96
2b	AQ-C ₇		95
2c	AQ-C ₈		80
2d	AQ-C ₉		95
2e	AQ-C ₁₀		84
2f	AQ-C ₁₁		90
2g	AQ-C ₁₂		90
2h	AQ-C ₁₃		85

Les dérivés Δ^2 -AQ- C_n (**1a-h**) présentent sur leur chaîne latérale une double liaison non conjuguée, disponible pour une réaction d'hydrogénation catalytique, conduite sous un flux continu de H_2 et en présence d'une quantité catalytique de Pd sur charbon. Après filtration sur célite®, les dérivés AQ- C_n sont obtenus avec d'excellents rendements (80% - 96%) sans purification supplémentaire

6. SYNTHÈSE DES COMPOSÉS Δ^2 -AQNO- C_n

Les dérivés *N*-oxyde des Δ^2 -AQ- C_n constituent la troisième classe de composés dont nous avons envisagé la synthèse (Figure 3.4). Dans ce paragraphe, nous allons présenter nos travaux centrés sur la préparation des dérivés Δ^2 -AQNO- C_n dont la synthèse, à notre connaissance, n'a pas encore été décrite.

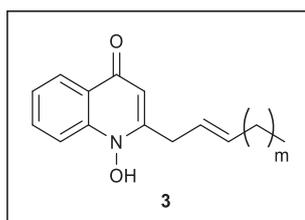


Figure 3.4 Structure chimique générale des composés cibles de type Δ^2 -AQNO- C_n

Les composés Δ^2 -AQNO- C_n sont des molécules qui dérivent de la classe des 4-hydroxyquinoléines possédant une chaîne alkyle en position 2 du cycle et un groupement OH sur l'azote. Les dérivés AQNOs sont des molécules naturelles produites par plusieurs microorganismes, en particulier *P. aeruginosa*.

Pour rappel :

Parmi ces molécules, la 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine *N*-oxyde (HQNO – LXXVIII) constitue un des principaux métabolites de *Pa*^{59,166}. HQNO a montré des effets antagonistes contre *Sa* (Figure 3.5)¹³⁷. Un autre composé faisant partie de la classe de AQNO a été décrit : 1-hydroxy-2-dodécyl-4(1*H*)quinoléin-4-one (CXII), et présente une activité contre *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*¹⁶⁷.

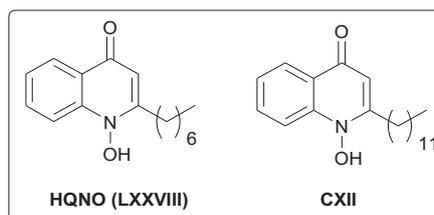


Figure 3.5 Structure des dérivés *N*-oxyde décrits dans la littérature.

La synthèse de ces composés a été décrite à partir des AQs par oxydation de l'azote en position 1^{134,135,137}. Dans un premier temps, nous avons voulu tenter la réaction de *N*-oxydation directement sur le composé **1g** sans protection préalable de la fonction hydroxyle en position 4. Malheureusement, la réaction n'a pas abouti à la formation du composé **3b** souhaité. Selon Szamosvari *et al.*¹⁶⁸, le tautomère cétonique des HQ empêche l'oxydation sur

⁵⁹ Radlinski, L.; Rowe, S. E.; Kartchner, L. B.; Maile, R.; Cairns, B. A.; Vitko, N. P.; Gode, C. J.; Lachiewicz, A. M.; Wolfgang, M. C.; Conlon, B. P. *Pseudomonas Aeruginosa* Exoproducts Determine Antibiotic Efficacy against *Staphylococcus Aureus*. *PLoS Biol.* **2017**, *15* (11), 1–25.

¹³⁴ Thierbach, S.; Wienhold, M.; Fetzner, S.; Hennecke, U. Synthesis and Biological Activity of Methylated Derivatives of the *Pseudomonas* Metabolites HHQ, HQNO and PQS. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 187–193.

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1*H*)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline *N*-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1*H*)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg.)*. **2007**, *4* (10), 1517–1522.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone *N*-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (25), 7271–7275.

¹⁶⁶ Thierbach, S.; Birnes, F. S.; Letzel, M. C.; Hennecke, U.; Fetzner, S. Chemical Modification and Detoxification of the *Pseudomonas Aeruginosa* Toxin 2-Heptyl-4-Hydroxyquinoline *N*-Oxide by Environmental and Pathogenic Bacteria. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (9), 2305–2312.

¹⁶⁷ Saleh, A.; Friesen, J.; Baumeister, S.; Gross, U.; Bohne, W. Growth Inhibition of *Toxoplasma Gondii* and *Plasmodium Falciparum* by Nanomolar Concentrations of 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1*H*)Quinolone, a High-Affinity Inhibitor of Alternative (Type II) NADH Dehydrogenases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (4), 1217–1222.

l'azote. Une protection du groupement OH est donc nécessaire pour bloquer le dérivé HQ sous sa forme énolique.

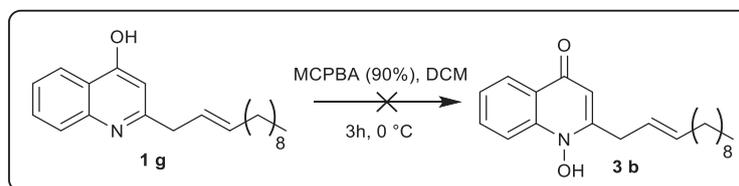


Schéma 3.21 Essai de *N*-oxydation du composé Δ^2 -AQ- C_{12} (**1g**)

Dans la suite de notre étude, nous avons suivi les protocoles décrits par Woschek *et al.*¹³⁵ en 2007 et par Böttcher *et al.*¹³⁷ en 2016.

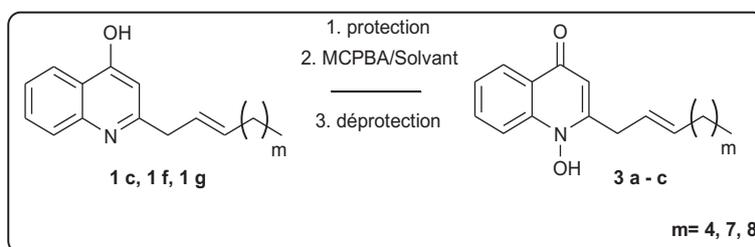


Schéma 3.22 Résumé des conditions pour obtenir les composés Δ^2 -AQNO- C_n

Dans un premier temps, le carbonate d'éthyle a été choisi comme groupement protecteur de la fonction OH. Les composés Δ^2 -AQNO- C_n (**16a-c**) sont obtenus avec des rendements satisfaisants après réaction des dérivés Δ^2 -AQ- C_n (**1c**, **1f-g**) dans le THF avec le chloroformiate d'éthyle en présence de tBuOK comme base (Schéma 3.23).

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1H)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline N-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1H)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg)*. **2007**, 4 (10), 1517–1522.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (25), 7271–7275.

¹⁶⁸ Szamosvári, D.; Reichle, V. F.; Jureschi, M.; Böttcher, T. Synthetic Quinolone Signal Analogues Inhibiting the Virulence Factor Elastase of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (92), 13440–13443.

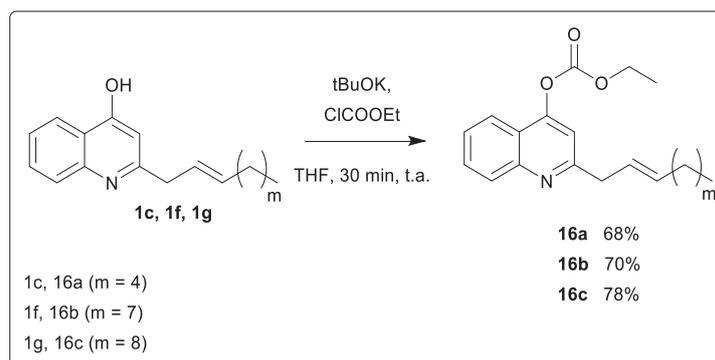


Schéma 3.23 Réaction de protection de la fonction hydroxyle en position 4 sous forme de carbonate d'éthyle

Le premier essai d'oxydation a ensuite été réalisé, selon le protocole de Tatsuta *et al.*¹³⁸, sur la quinoléine protégée **16b** à l'aide de l'acide 3-chloroperbenzoïque commercial (MCPBA, degré de pureté de 70%), dans le DCM pendant 3h à 0°C pour conduire au dérivé **17b** avec un rendement de 37% après purification (Schéma 3.24).

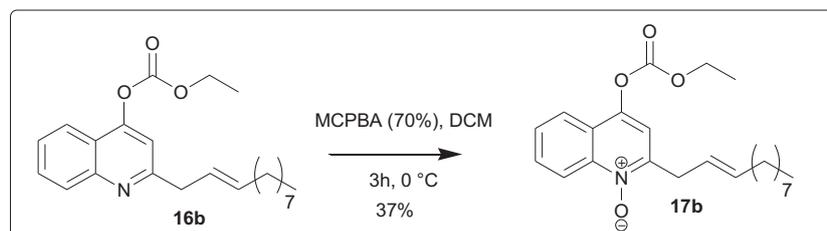


Schéma 3.24 N-oxydation par MCPBA du composé **16b**.

La structure chimique du composé **17b** est vérifiée par RMN. Les déplacements chimiques des protons aromatiques H-6, H-7 et H-3 sont plus blindés comparé aux mêmes protons présents sur le précurseur carbonate **16b**. Cependant, il faut noter que le proton H-3 est celui dont le déplacement chimique subit le plus grand changement ($\delta(\mathbf{16b})=7,44$ ppm / $\delta(\mathbf{17b})=5,99$ ppm).

Le composé oxydé **17b** est ensuite déprotégé par KOH/EtOH pour obtenir le composé Δ^2 -AQNO-C₁₁ (**3b**).

¹³⁸Tatsuta, K.; Tamura, T. Novel Synthesis and Structural Elucidation of Quinolone Antibiotics PC-3 (SF2420B) and YM-30059. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2000**, 53 (4), 418–421.

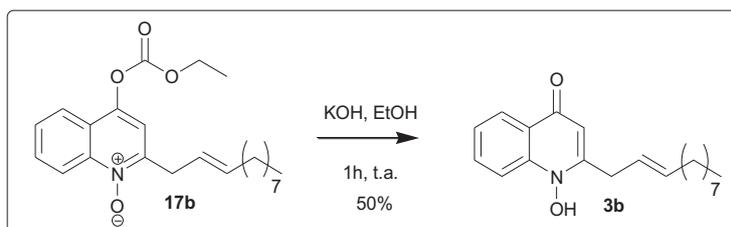


Schéma 3.25 Synthèse du composé Δ^2 -AQNO-C₁₁ par réaction de déprotection de **17b**.

Les conditions d'oxydation par MCPBA (70% de pureté) ont ensuite été appliquées aux carbonates **16a** et **16c**. Un suivi de la réaction par CCM nous a permis de constater que la réaction d'oxydation n'était pas complète (présence de la quinoléine de départ) et qu'elle conduisait à la formation de deux nouveaux produits dont le plus polaire absorbait dans l'UV (λ 254 nm). La purification sur gel de silice s'est avérée difficile pour obtenir des produits purs. Nous avons alors supposé que les difficultés rencontrées étaient liées à la pureté du MCPBA. Nous avons donc mis en place la purification ainsi que le dosage du MCPBA.

MCPBA a été purifié par lavages successifs d'une solution dans le chloroforme avec une solution tampon de NaH₂PO₄ (pH 7,5) puis de l'eau. Le MCPBA purifié est ensuite dosé par iodométrie (dosage en retour par une solution de thiosulfate de sodium de I₂ formé par réaction d'oxydo-réduction entre NaI et MCPBA). Après purification, le MCPBA a été obtenu avec un degré de pureté de 90%.

La réaction d'oxydation a lors été appliqué au composé **16a** avec le MCPBA purifié (90%) mais un suivi CCM a de nouveau montré la formation de deux composés, en plus du produit de départ résiduel. Or, Woschek *et al.*¹³⁵ (Schéma 3.26) ont déjà décrit la migration du groupe carbonate sur un composé de type quinoléine N-oxyde **LXXVI** ce qui peut expliquer la présence de plusieurs produits lors de la réaction de N-oxydation.

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1H)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline N-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1H)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg)*. **2007**, 4 (10), 1517–1522.

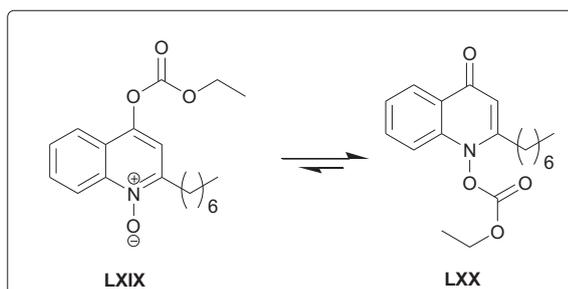


Schéma 3.26 Migration du groupement protecteur carbonate sur quinoléine N-oxydée.

Le réarrangement était montré à partir d'analyses RMN et IR. Cette migration est supposée être intermoléculaire. Les auteurs ont prouvé que le dérivé **LXXVI** (sous forme d'une huile jaune clair) évolue, après 3 jours à température ambiante, vers un composé cristallin issu de la migration du groupe carbonate sur l'atome d'oxygène de la fonction NO ¹³⁵.

Dans notre cas, la purification du brut obtenu suite à l'oxydation de **16a** a conduit à deux dérivés **17a** et **18a** avec un faible rendement de 20% (Schéma 3.27).

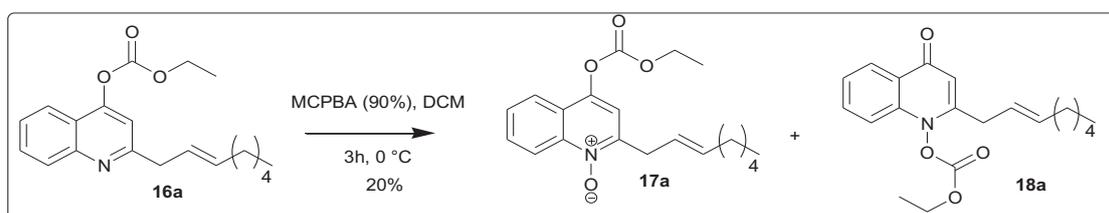


Schéma 3.27 Réaction de N-oxydation du carbonate **16a**.

Les deux composés **17a** et **18a** n'ont pas pu être séparés. En effet, nous avons remarqué que le produit **17a** (Rf=0,94), isolé pur de la colonne, évoluait vers la formation du dérivé **18a** (Rf=0,56) après quelques heures à température ambiante. Ce phénomène a également été observé par RMN ¹H : à J0, le spectre montre le produit **17a** majoritaire en présence de traces de **18a**. Après trois jours, un nouveau spectre proton (J3) est enregistré avec le même échantillon et montre que la proportion des deux composés s'est inversée (Figure 3.6).

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1H)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline N-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1H)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg)*. **2007**, 4 (10), 1517–1522.

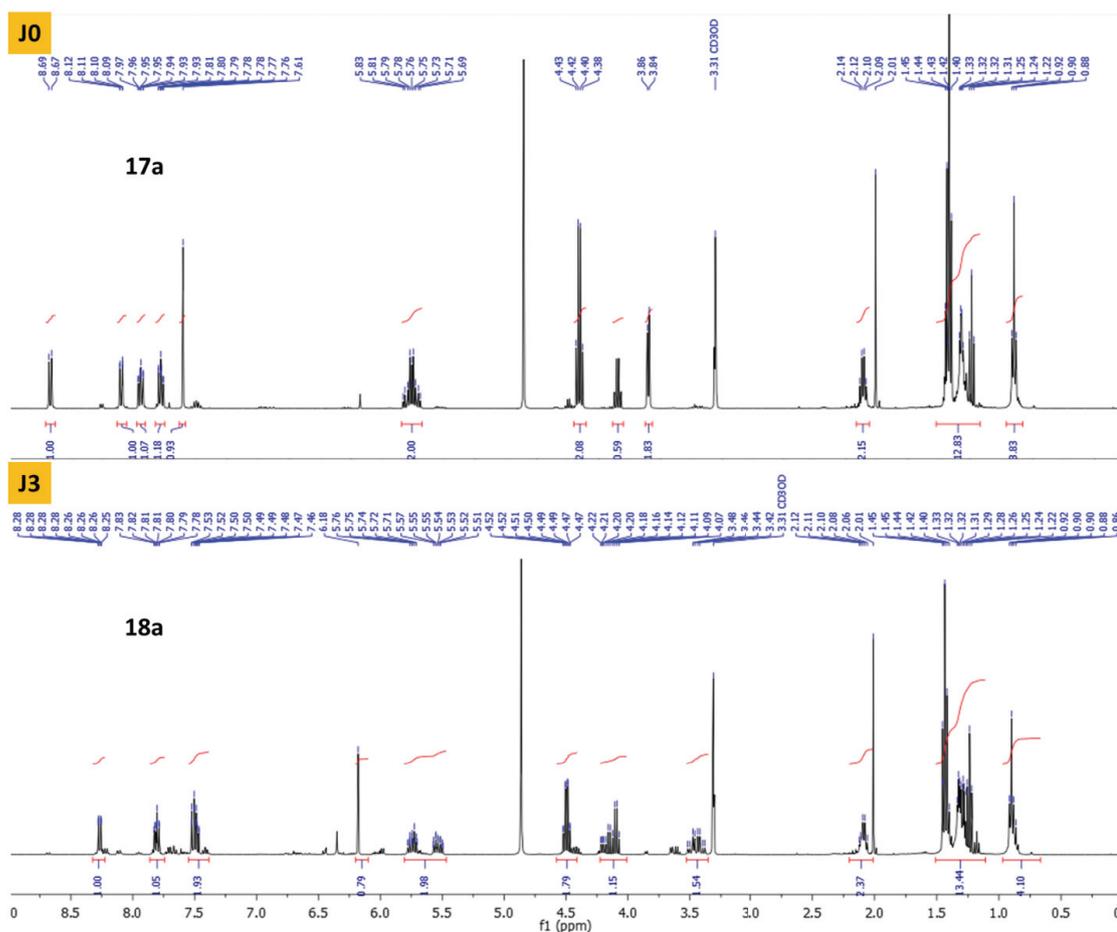


Figure 3.6 Comparaison de deux spectre $^1\text{H-NMR}$ du mélange **17a/18a**. Les deux spectres sont enregistrés à J0 et à J3, correspondant respectivement à **17a** et **18a**.

La réaction de *N*-oxydation a enfin été appliquée à la quinoléine **16c** pour conduire, de façon analogue, au mélange des deux produits **17c** et **18c** avec un rendement de 34%.

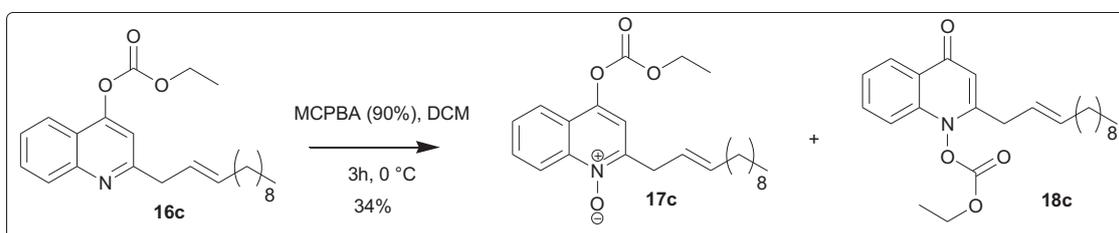


Schéma 3.28 Réaction de *N*-oxydation du carbonate **16c** par MCPBA dans DCM

L'évaluation du mélange **17c/18c** sur des souches de **Sa** (cf Chapitre 4) montre que ce mélange est le plus actif de toutes les molécules testées avec la CMI la plus basse. De ce fait, il était nécessaire de déterminer lequel des deux isomères était responsable de l'activité antibactérienne. En outre, l'activité des quinoléines sur **Sa** est souvent liée à la présence d'un

azote substitué par un méthyle^{127,134} ou un groupement *N*-oxyde¹³⁷, ce qui verrouille la structure dans sa forme cétonique.

Les méthodes classiques de purification ne nous ayant pas permis d'obtenir chacun des deux isomères avec une pureté suffisante, nous avons essayé de convertir **17c** en **18c**. En effet, selon Woschek *et al.*¹³⁵, la migration du groupement carbonate tend à former l'isomère le plus stable énergétiquement. Dans un premier temps, le mélange a donc été laissé, après purification, à température ambiante pendant 3 jours. Malheureusement, contrairement aux résultats déjà décrits^{135 136}, aucune migration du groupement carbonate n'a été observée. Nous avons alors décidé de chauffer au reflux le mélange en solution dans l'éther diéthylique ($T_{\text{eb}}=35\text{ °C}$) ou l'éthanol ($T_{\text{eb}}=78\text{ °C}$). Mais, dans les deux cas nous n'avons pas obtenu le résultat escompté.

Enfin, nous avons observé, après analyse des spectres RMN ¹H, que le ratio initial entre les deux isomères **17c/18c** différait d'une réaction de *N*-oxydation à l'autre. De plus, une poursuite de l'étude dans le temps, nous a permis de constater que le ratio d'équilibre était également différent en fonction des lots.

Au vu de tous ces résultats, nous nous sommes attachés à mettre au point une méthode de synthèse plus sélective qui nous permettrait de mieux contrôler la réaction de *N*-oxydation et ainsi de mieux explorer les relations structure-activité des dérivés synthétisés.

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from *Pseudonocardia* Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

¹³⁴ Thierbach, S.; Wienhold, M.; Fetzner, S.; Hennecke, U. Synthesis and Biological Activity of Methylated Derivatives of the *Pseudomonas* Metabolites HHQ, HQNO and PQS. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, 15, 187–193.

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1H)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline *N*-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1H)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg.)* **2007**, 4 (10), 1517–1522.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone *N*-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (25), 7271–7275.

Nous avons alors essayé de mener la réaction de *N*-oxydation dans l'acide acétique à température ambiante pour modifier la solubilité de **17c** dans le milieu (Schéma 3.29). Cependant, ces nouvelles conditions opératoires conduisent à un résultat identique aux précédentes.

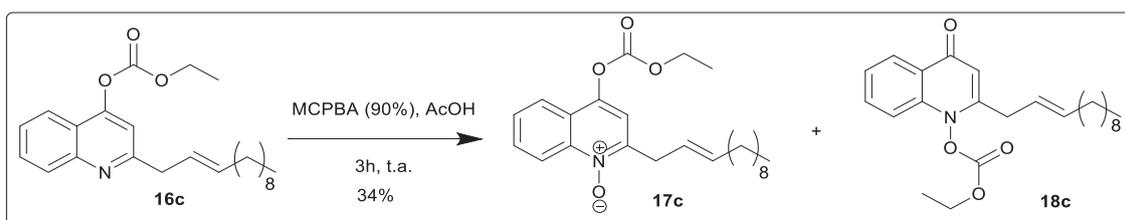


Schéma 3.29 Réaction de *N*-oxydation du carbonate **16c** par MCPBA dans AcOH

A ce stade de l'étude, le mélange des deux carbonates **17c** et **18c** est déprotégé par une solution éthanolique de KOH pour obtenir le composé Δ^2 -AQNO-C₁₂ (**3c**) sous forme solide après traitement acide. (Schéma 3.30)

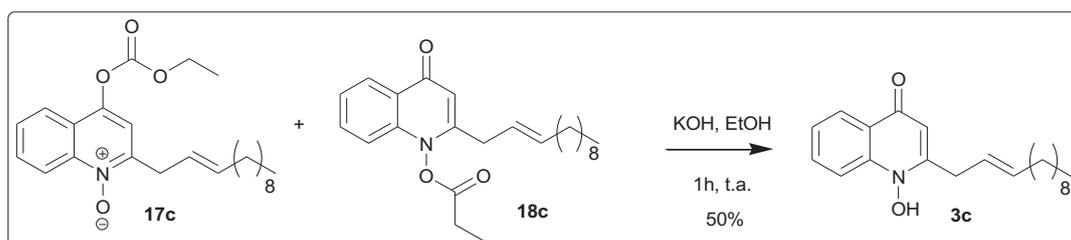


Schéma 3.30 Synthèse du composé Δ^2 -AQNO-C₁₂ par réaction de déprotection de **17c**

Une autre problématique rencontrée lors de la réaction de *N*-oxydation est la chimiocompatibilité des conditions réactionnelles avec les composés **16a-c**. En effet, nous avons remarqué, qu'après réaction de ces composés avec MCPBA, une analyse en spectrométrie de masse montrait la présence de plusieurs produits d'oxydation de même masse moléculaire. Il est donc probable qu'un de ces composés soit issu d'une réaction secondaire d'époxydation sur la double liaison de la chaîne latérale (Schéma 3.31). Cependant, la formation de l'époxyde (**24**) n'est pas pu être confirmée puisque l'isolement de sous-produits d'époxydation n'a pas été possible à cause des faibles quantités obtenues.



Schéma 3.31 Hypothèse de formation du produit secondaire de type époxyde.

Pour déterminer si les difficultés rencontrées lors de la réaction de *N*-oxydation résultent, ou non, de la présence d'une insaturation sur la chaîne latérale, nous avons mis en œuvre la réaction de *N*-oxydation sur le composé **2g**, dont la chaîne latérale est saturée (Schéma 3.32). La réaction de protection par un groupe carbonate est réalisée selon le protocole précédent mais conduit, dans ce cas au composé **25** avec un rendement faible de 34%. Ce résultat peut être dû à un manque de solubilité de **2g** dans le THF.

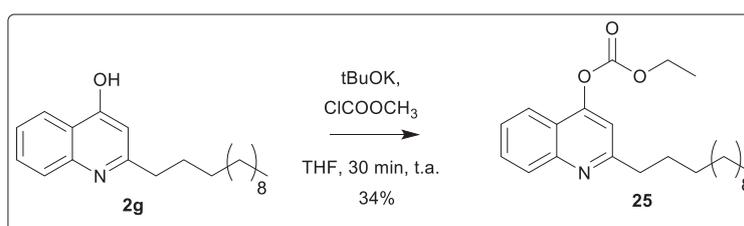


Schéma 3.32 Réaction de protection sous forme de carbonate d'éthyle de la fonction hydroxyle en position 4 de **2g**.

Le composé **25** est ensuite traité avec MCPBA dans le DCM à 0 °C. Suite à la réaction d'oxydation, le suivi CCM a de nouveau montré la formation de deux composés, en plus du produit de départ résiduel. Le mélange de *N*-oxydation **26a/26b** est isolé avec un rendement de 33% avant d'être déprotégé en milieu basique pour obtenir **27** avec un rendement de 50% (Schéma 3.33). La formation du mélange **26a/26b** est vérifié par RMN, inversement l'obtention de **27** est vérifiée que par LC-UV/MS (insolubilité de **27** dans les principaux solvants deutérés).

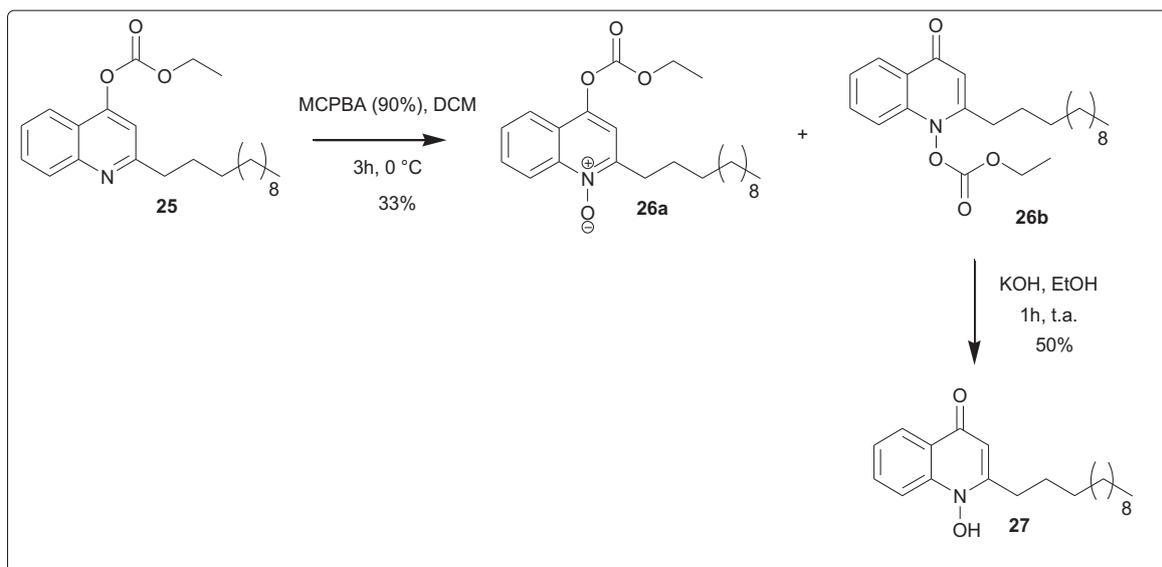


Schéma 3.33 Enchaînement réactionnel pour la formation du composé AQNO-C₁₂

Le rendement de *N*-oxydation du composé **26** n'est que légèrement supérieur à celui obtenu lors de la *N*-oxydation de **16c** (Rdt=26%). Il semblerait donc que la présence de la double liaison ne représente pas un problème majeur et n'explique pas l'obtention de rendements d'oxydation faibles. Cependant, il est certain que des sous-produits d'oxydation sont formés (détectés en CCM) mais en revanche ils ne peuvent pas être identifiés, en raison des faibles quantités formées.

En résumé, les problématiques rencontrées lors des premiers essais de synthèse des composés *N*-oxydes **3** sont liées à deux aspects de la première approche envisagée : (i) la protection par le carbonate et la migration de ce groupement ; et (ii) la formation supposée de l'époxyde.

Ces deux réactions secondaires rendent difficiles l'obtention de produits satisfaisant aux critères de pureté indispensables à une évaluation biologique ultérieure.

Afin de tenter d'apporter une réponse à cette problématique et ainsi, simplifier l'exploration des relations structure-activité, nous avons décidé de protéger le groupement OH de la 4-hydroxyquinoléine **1g** par un groupement diéthylcarbamate qui est connu pour ne pas se réarranger¹³⁵¹³⁵

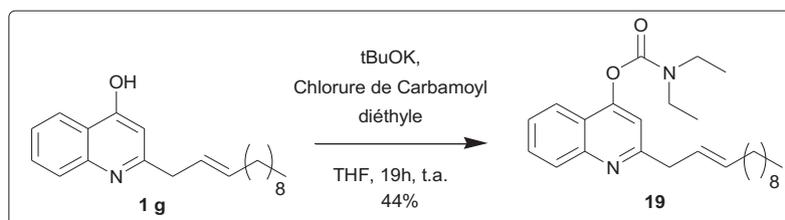


Schéma 3.34 Protection de **1g** par un groupement diéthylcarbamate.

Cette réaction de protection est appliquée à la 4-hydroxyquinoléine **1g**, en présence de chlorure de diéthylcarbamoyle et de *tert*-butylate de potassium utilisé comme base (Schéma 3.34). Après purification, le produit **19** est obtenu avec un rendement de 44%.

Le composé **19** est ensuite traité avec MCPBA dans l'acide acétique pour conduire au dérivé *N*-oxyde **20** avec un faible rendement de 25% malgré une purification sur gel de silice plus simple que dans le cas du groupement carbonate (Schéma 3.35).

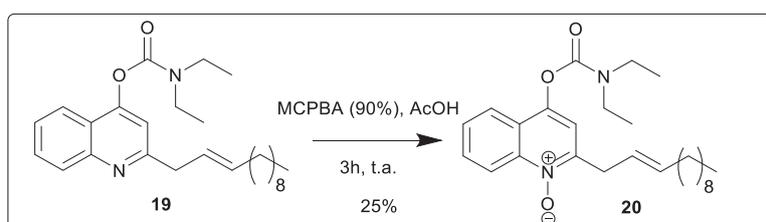


Schéma 3.35 Réaction de *N*-oxydation dans l'acide acétique du dérivé carbamate Δ^2 -AQ-C₁₂

Or, le composé **20** a été testé sur **Sa** mais n'a pas montré d'activité. Nous avons donc supposé que l'activité de nos composés pouvait être en lien avec la forme oxo en position 4.

¹³⁵ Woschek, A.; Mahout, M.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. Synthesis of 2-Heptyl-1-Hydroxy-4(1H)-Quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)Quinoline *N*-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyloxy)-4(1H)-Quinolones. *Synthesis (Stuttg)*. **2007**, 4 (10), 1517–1522.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons envisagé de méthyler l'azote du noyau quinoléine afin de verrouiller la structure sous forme cétonique. Un premier essai de *N*-méthylation¹³⁴ du composé **1g** conduit dans le THF à 0°C, en présence de BuLi, utilisé comme base, et de diméthyl sulfate comme agent alkylant s'est avéré infructueux (Schéma 3.36).

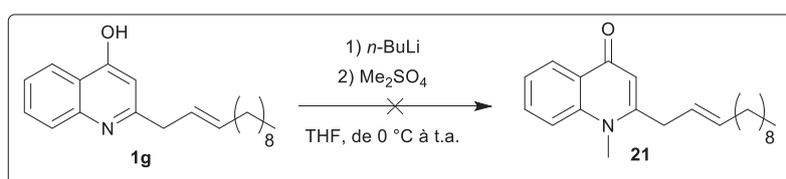


Schéma 3.36 Réaction de *N*-méthylation à partir du composé Δ^2 -AQ-C₁₂ (**1g**)

Nous avons, donc, envisagé la *N*-méthylation de la quinoléine chlorée **4a**, précurseur de **1g**, suivant le même protocole (Schéma 3.37). Cette réaction a conduit à la formation du composé *N*-méthylé **22** avec un rendement de 37%.

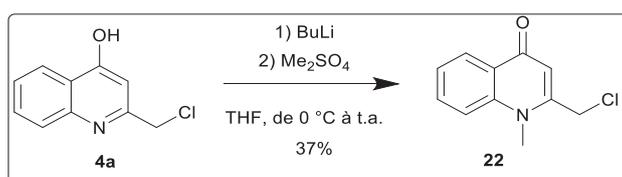


Schéma 3.37 Réaction de *N*-méthylation à partir de la 2-(chlorométhyl)-4-hydroxyquinoléine (**4a**)

Suite à la formation du composé **22**, le couplage de Suzuki-Miyaura est réalisé selon les conditions précédemment développées pour obtenir le dérivé *N*-méthylé de Δ^2 -AQ-C₁₂ **21** avec un rendement de 33% (Schéma 3.38).

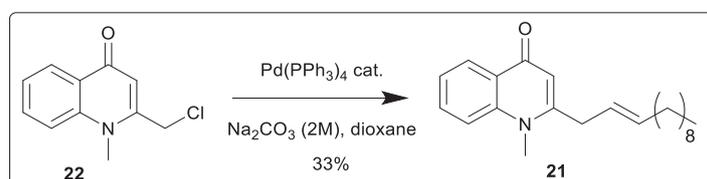


Schéma 3.38 Couplage de Suzuki-Miyaura à partir de **22**

Afin de confirmer la régiosélectivité de la méthylation et, dans le même temps, avoir à disposition le régioisomère de **21**, correspondant à une structure verrouillée de la forme énolique, la réaction de *O*-méthylation de **1g** a été menée en présence de K₂CO₃ et de

iodométhane, dans l'acétone pour conduire au composé **23** avec un rendement de 30% (Schéma 3.39).

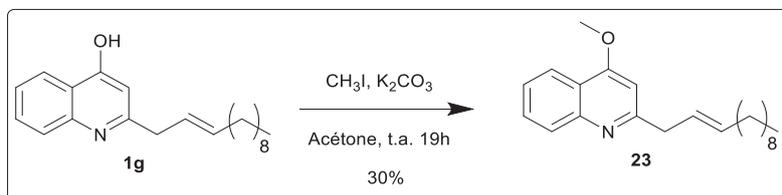


Schéma 3.39 Réaction de *O*-méthylation à partir de **1g**.

Une analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C a confirmé la structure respective des deux régioisomères **21** et **23**. Les déplacements des protons du NCH_3 et du OCH_3 sont respectivement à 3,76 ppm et 4,03 ppm en RMN ^1H alors que les signaux correspondants aux groupements méthyles sont détectés respectivement à 34,46 ppm pour le NCH_3 et à 55,65 ppm pour le OCH_3 en RMN ^{13}C . Ces données spectrales sont cohérentes avec celles de la littérature¹³⁴.

Les résultats d'évaluation des deux composés **21** et **23** comme agents anti-bactériens pourront nous donner des pistes très utiles dans l'exploration de la relation structure-activité.

¹³⁴ Thierbach, S.; Wienhold, M.; Fetzner, S.; Hennecke, U. Synthesis and Biological Activity of Methylated Derivatives of the Pseudomonas Metabolites HHQ, HQNO and PQS. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 187–193.

7. CONCLUSIONS

Dans ce chapitre nous avons décrit la synthèse de trois classes de molécules (Δ^2 -AQ- C_n , AQ- C_n , Δ^2 -AQNO- C_n) de la famille des 4-hydroxyquinoléines.

Dans un premier temps, nous avons mis au point la synthèse *via* le couplage de SM qui a permis de préparer la première classe des composés (Δ^2 -AQ- C_n). Parallèlement à ce travail de chimie médicinale, nous avons mis au point une nouvelle voie d'accès aux boronates d'alcényles selon des conditions écoresponsables. Nous avons ainsi obtenu une grande diversité des esters boroniques. Ce travail de méthodologie a été valorisé au travers d'un article publié dans Tetrahedron Letters.

Les deux autres familles ont été obtenues à partir de ces premiers composés, soit par une hydrogénation catalytique (AQ- C_n), soit par réaction de *N*-oxydation (Δ^2 -AQNO- C_n).

La synthèse des composés a été orientée grâce aux premiers résultats biologiques pour débiter une étude de relation structure-activité. Les résultats biologiques avec une première approche de la relation structure-activité sont exposés dans le chapitre suivant.

Chapitre 4.
Évaluations biologiques des
composés synthétisés de type
AQ

Chapitre 4. Évaluations biologiques des composés synthétisés de type AQ

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté la méthodologie de synthèse de molécules en lien avec le projet HEMATITE. Une chimiothèque d'une trentaine de molécules a ainsi été constituée. L'activité biologique de chacune de ces molécules, y compris les intermédiaires de réaction, a été évaluée. Pour cela, l'effet potentiellement inhibiteur de croissance de souches de *Sa* a été déterminé et caractérisé.

1. CRIBLAGE DES MOLÉCULES ET IDENTIFICATION DES COMPOSÉS PRÉSENTANT UNE ACTIVITÉ INHIBITRICE

Ce premier test nous a permis d'identifier les composés ayant une potentielle activité anti-*Sa*. Chaque molécule a été transmise au laboratoire de bactériologie sous forme de solution dans du DMSO, à 10 mM. Puis elles ont été diluées dans du milieu de culture bactérienne Mueller-Hinton (MH). Pour chaque composé, la concentration maximale pouvant être utilisée dans ce milieu MH sans précipitation de la molécule ni toxicité du DMSO pour les bactéries (taux < à 3%) a été évaluée.

Une souche de référence de *Sa* (ATCC 29213) et trois souches cliniques de *Sa* (MiSt, BeSi, CoSo) issues de prélèvements de patients atteints de mucoviscidose ont été sélectionnées afin d'évaluer l'activité des composés. Ce panel a pour but d'éviter un biais expérimental lié à l'utilisation de souches bactériennes peu représentatives du contexte clinique.

Une solution de chaque molécule a été déposée en goutte sur une gélose préalablementensemencée par une souche de *Sa* (voir partie expérimentale). La formation d'un halo au niveau de la zone du dépôt a été indicative d'une activité inhibitrice. En effet, ce halo correspond à l'absence de développement de *Sa* due à la présence de la molécule, le reste de la gélose étant quant à lui recouvert par les colonies de la bactérie (Figure 4.1).

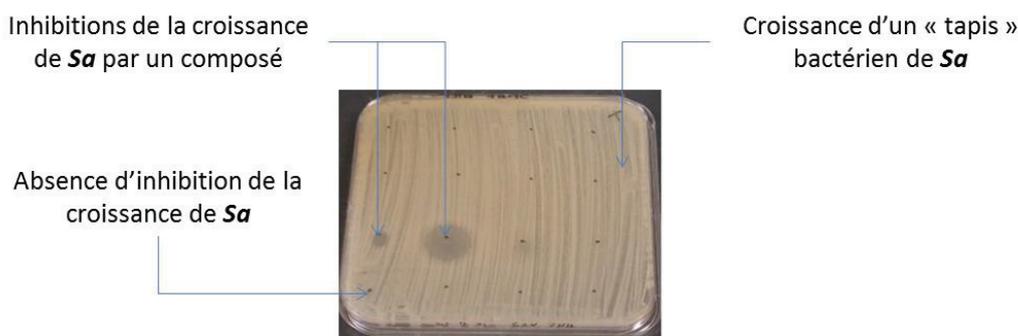


Figure 4.1 Test de criblage des molécules sur culture de *Sa*.

Nous avons identifié 9 molécules ainsi qu'un mélange de composés ayant un effet inhibiteur de la croissance de *Sa* (Tableau 5.1):

- Groupe 1 : les composés **1e**, **1h** et **16a** qui ont présenté une inhibition très faible du tapis de *Sa* (inhibition +/-) (Tableau 5.1a);
- Groupe 2 : les composés **1f**, **1g**, **3b** et **16c** qui ont présenté une inhibition faible du tapis de *Sa* (inhibition +) (Tableau 5.1b);
- Groupe 3 : le mélange **17c/18c** et le composé **3c** qui ont présenté une inhibition complète de la croissance de *Sa* (inhibition +++) (Tableau 5.1c).

Nous avons alors cherché à quantifier cette activité afin de pouvoir comparer les molécules entre elles. Cette caractérisation a reposé sur la détermination de la **Concentration Minimal Inhibitrice (CMI)**.

2. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE

La CMI représente une quantification de la sensibilité des bactéries aux molécules antibiotiques. Elle peut être déterminée *via* des expérimentations en plaque 96-puits (voir partie expérimentale). A noter que pour chaque composé, la gamme de concentrations testées a été comprise entre 16 µg/ml et 0,125 µg/ml.

La CMI correspond à la concentration la plus faible entraînant l'inhibition du développement des bactéries après 18-24h d'incubation à 37°C. Ceci s'observe par la limpidité des puits de culture (Figure 4.2).

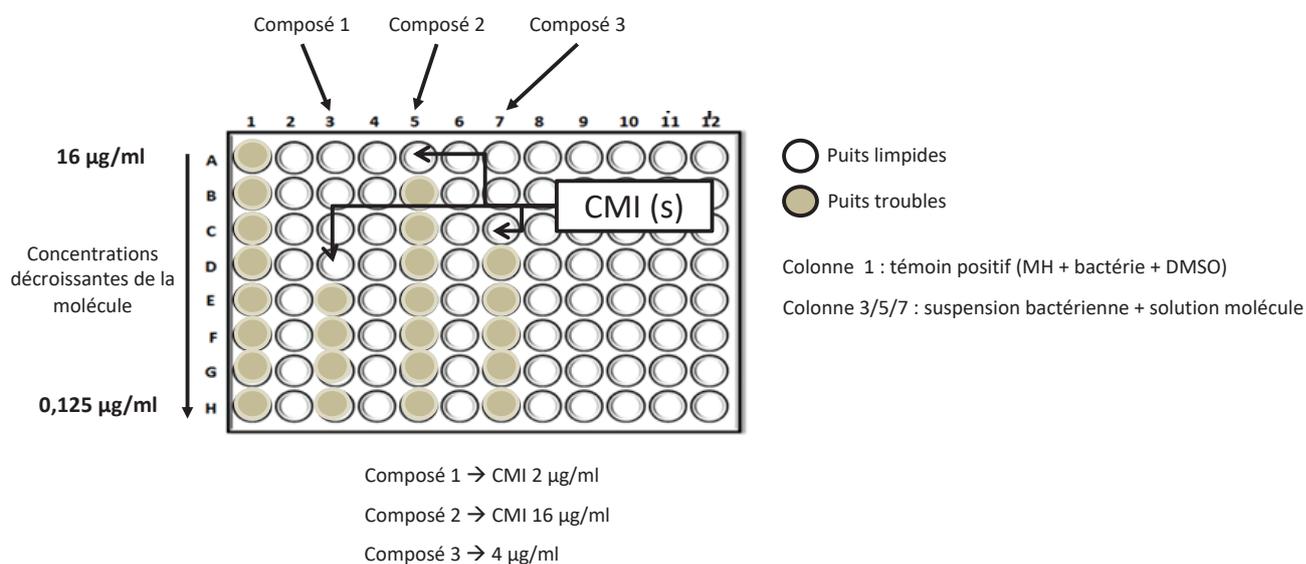


Figure 4.2 Évaluation de la CMI de trois composés.

Compte tenu du faible niveau d'inhibition obtenu lors du criblage avec le groupe 1, les CMI des molécules de ce groupe n'ont pas été évaluées.

Concernant les molécules du groupe 2 (**1f**, **1g**, **3b** et **16c**), les CMI ont toutes été évaluées comme supérieures à 8-16 µg/ml. Une détermination plus précise, au-delà de 16 µg/ml n'a pas été possible, car les concentrations dans le MH ont été trop importantes et ont engendré la précipitation des composés.

Concernant les molécules du groupe 3 (mélange **17c/18c** et composé **3c**)

- pour le mélange de deux molécules isomères **17c/18c**, la CMI a été déterminée entre 2 et 8 µg/ml.
- le composé **3c**, qui dérive du mélange de **17c/18c**, a aussi présenté une activité sur les souches de **Sa**. Sa CMI est comprise entre 4-8 µg/ml.

A noter que pour chaque expérimentation, c'est la souche de **Sa** appelée BeSi qui est apparue la plus sensible aux molécules. Cet isolat correspond à une souche de **Sa** isolée d'un

patient colonisé chroniquement par **Sa** (plus de la moitié des prélèvements réalisés sur un an, présente cette bactérie) mais n'ayant pas de **Pa**.

3. IDENTIFICATION DES PARTICULARITÉS CHIMIQUES FAVORISANT L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES COMPOSÉS

Sur la base de ces données, nous avons cherché à identifier les éléments structuraux des molécules qui influencent l'activité. Nous pouvons affirmer qu'un des points importants pour l'activité anti-**Sa** est la présence d'une chaîne carbonée en position 2 de la 4-hydroxyquinoléine. En effet, les molécules **4 a-b**, et **13** ne sont pas actives. Une fois établie le rôle majeur de la chaîne latérale, nous avons recherché les éléments de la chaîne qui favorisent cette activité. Ces éléments importants sont au nombre de trois : (a) la présence de la double liaison, (b) la longueur de la chaîne et (c) les formes isomères.

a) La double liaison

Nous avons remarqué que l'activité des molécules synthétisées est liée à la présence de l'insaturation non-conjuguée au niveau de la chaîne latérale. Nous avons comparé les deux classes de molécules Δ^2 -AQ-C_n (**1a-1h**) et AQ-C_n (**2a-2h**). A nombre égal de carbones de la chaîne latérale, les composés **1e-1h** contenant une insaturation, présentent une inhibition de la croissance de **Sa** supérieure aux composés **2e-2h**, dont la chaîne est saturée.

b) La longueur de la chaîne

L'autre paramètre favorisant l'activité est la longueur de la chaîne. Les molécules **1a-1d**, ayant une chaîne comprise entre 6 et 9 atomes de carbone ne présentent pas d'activité anti-**Sa**. En revanche, les molécules **1e-1h**, ayant de 10 à 13 atomes de carbone inhibent la croissance de **Sa**. Cette condition est aussi vérifiée pour les molécules de la famille des Δ^2 -AQNO-C_n, le composé **3a** (en C₈) n'est pas actif alors que les composés **3b** (en C₁₁) et **3c** (en C₁₂) sont actifs.

Avec cette famille des Δ^2 -AQNO-C_n il est possible de quantifier la relation structure/activité des molécules. En effet, une différence d'activité entre les composés **3b** et

3c a été mise en évidence (CMI du composé **3b** > à 8 µg/ml, et CMI du composé **3c** entre 4-8 µg/l). La chaîne optimale apparaît composée de 12 carbones.

c) Les formes isomères

Le déplacement de l'équilibre tautomérique des 4-hydroxyquinoléines entre la forme quinolone (**XIX**) et la forme hydroxy (**XVIII**) semble être un facteur essentiel de l'activité anti-**Sa** de nos composés.

Les composés **20** et **23**, qui n'ont pas d'activité anti-**Sa**, présentent une structure proche de la forme hydroxy qui se rapproche de celle du composé **17c**. Sachant que le mélange **17c/18c** est très actif nous pouvons supposer que l'activité est plus liée au composé **18c** qu'au composé **17c**.

De plus, l'équilibre établie au niveau du mélange **17c/18c** est important pour l'activité. Ceci a été mis en évidence lors de l'analyse de deux lots du mélange **17c/18c**, montrant une légère différence d'activité. En comparant les deux spectres RMN de ces deux lots, nous avons observé que le rapport entre **17c** et **18c** n'était pas le même.

Bien que nous soupçonnions que le composé **18c** soit le plus actif, il est important à présent de confirmer ou d'infirmer cette théorie en modifiant la voie de synthèse de ce composé.

4. PROPOSITION DU MÉCANISME D'ACTION

Grâce aux synthèses réalisées, nous avons identifié des composés (**17c/18c** et **3c**) comme ayant un potentiel effet anti-**Sa**. Étant donné que ces composés présentent des points de similarité avec les molécules synthétisées par Böttcher *et al.*¹³⁷, nous pouvons supposer que leur mécanisme d'action est proche de celui proposé par cette équipe.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (25), 7271–7275.

La molécule **LXXIX** (Δ^1 -NQNO), avec son tautomère (**CIII**), est structurellement similaire au couple ménaquinone (**MK-n**)/ménaquinol (**MKH₂-n**). Il est connu que la bactérie présente une chaîne respiratoire, au niveau membranaire, avec plusieurs oxydases en lien avec le couple ménaquinone/ménaquinol (MK/MKH₂). La succession des événements serait la suivante : a) la ménaquinone est réduite en ménaquinol ; b) les électrons dérivés de la réduction sont transférés au niveau des cytochromes oxydases ; c) en présence des électrons ces oxydases réduisent l'oxygène en eau ; d) les protons, qui sont produits, sont alors transférés au niveau extracellulaire ; e) les protons permettent un gradient électrochimique qui est impliqué dans la synthèse d'ATP par activation de l'ATP-synthase¹⁶⁹.

Böttcher *et al.*¹³⁷ proposent que **LXXIX** et son tautomère (**CIII**) miment la fonction du couple MK/MKH₂ dans la structure des enzymes en bloquant l'activité de ces enzymes. Ces auteurs reprennent des observations décrites en 1956¹⁷⁰ démontrant l'action antagoniste de molécules AQNO sur le cytochrome de certaines bactéries (*Bacillus subtilis* et **Sa**). En aérobiose, l'inhibition des cytochromes serait réalisée par **LXXIX**. En anaérobiose, l'inhibition serait localisée au niveau de la nitrate reductase (Nar). A l'image de ce que propose Böttcher, nous pouvons à notre tour proposer que le mécanisme d'action de nos composés soit lié à l'inhibition de la chaîne respiratoire de **Sa**.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (25), 7271–7275.

¹⁶⁹ Götz, F.; Mayer, S.; In, A.; Hammer, N. D.; Reniere, M. L.; Cassat, J. E.; Zhang, Y.; Hirsch, A. O.; Indriati, M. Both Terminal Oxidases Contribute to Fitness and Virulence during Organ-Specific *Staphylococcus Aureus* Colonization. **2013**, 4 (6), 6–8.

¹⁷⁰ Lightbown, J. W.; Jackson, F. L. Inhibition of Cytochrome Systems of Heart Muscle and Certain Bacteria by the Antagonists of Dihydrostreptomycin: 2-Alkyl-4-Hydroxyquinoline N-Oxides. *Biochem. J.* **1956**, 63 (1), 130–137

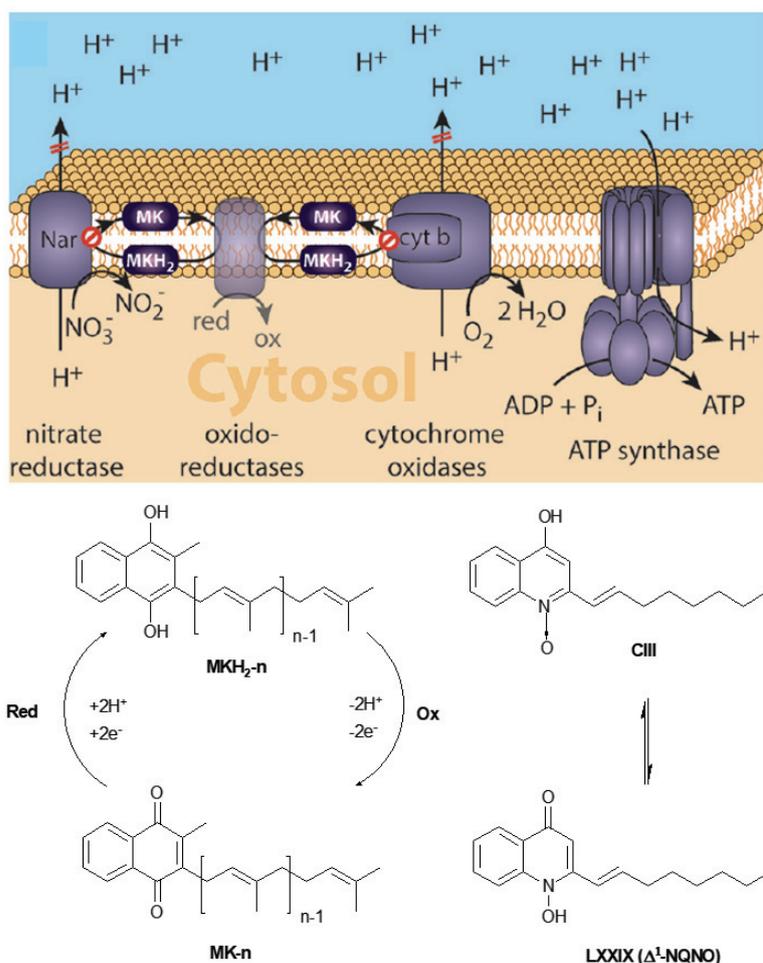


Figure 4.3 Proposition du mécanisme d'action des composés AQNO (adaptée de Böttcher *et al.*)

Une autre hypothèse serait de rapprocher le mécanisme d'action de nos composés de celui des fluoroquinolones. Ces antibiotiques sont actifs sur les topoisomères et sur les gyrases des bactéries^{171,172}. Comme vu précédemment (*cf.* Chapitre 2 page 71), une forme cétonique en C4 et la présence d'un groupement acide carboxylique en position 3 sont des conditions fondamentales pour la liaison avec la gyrase, et pour le transport dans la bactérie¹¹⁰. La présence de la fonction carbonylée en position 4 est importante pour la

¹¹⁰ Andersson, M. I.; MacGowan, A. P. Development of the Quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51* (90001), 1–11.

¹⁷¹ Chu D.T.; Fernandes P.B.. Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33* (2), 131–135.

¹⁷² Blondeau, J. M. Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. *Surv. Ophthalmol.* **2004**, *49* (SUPPL. 2), 1–6.

chélation des métaux, et pour la formation des interactions hydrogènes avec les bases de l'ADN^{111,112}. Les fluoroquinolones et nos structures sont des dérivés de la 4-hydroxyquinoléine. Cette ressemblance permet de suggérer un mécanisme d'action de nos composés similaire à celui des fluoroquinolones.

Actuellement, nous n'avons pas encore identifié la cible thérapeutique exacte. Des investigations supplémentaires sur **Sa** sont nécessaires et représentent l'une des perspectives de nos travaux.

5. CONCLUSIONS

Grâce à ce travail, nous avons établi des conditions essentielles pour l'activité anti-**Sa** : une chaîne carbonyle en 2 de la 4-hydroxyquinoléine, la présence d'une insaturation, conjuguée (Böttcher *et al.*¹³⁷) ou non conjuguée (en ce qui nous concerne), sur la chaîne et une longueur de la chaîne qui doit être comprise entre C₁₀ et C₁₃.

Nous avons commencé à étudier plus en détail l'influence de la tautomérie de ces molécules sur leur activité biologique. Nous supposons que la forme quinolone est la plus active mais nous ne l'avons pas encore confirmé. Néanmoins, les résultats obtenus nous permettent d'orienter le choix des prochaines réactions.

¹¹¹ Sissi, C.; Palumbo, M. The Quinolone Family: From Antibacterial to Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2003**, *3* (6), 439–450.

¹¹² Emami, S.; Shafiee, A.; Alirez, F. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. *Iran. J. Pharm. Res.* **2005**, *4* (3), 123–136.

¹³⁷ Szamosvári, D.; Böttcher, T. An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (25), 7271–7275.

Tableau 5.1 Classification des molécules actives selon leur degré d'activité

Tableau 5.1a Molécules du Groupe 1

NOM CHIMIQUE	CODE NUMERIQUE	ACTIVITÉ	CMI (µg/ml)
Δ^2 -AQ-C ₁₀	1e	-/+	-
Δ^2 -AQ-C ₁₃	1h	-/+	-
Δ^2 -AQ-C ₈ - Carbonate	16a	-/+	-

Tableau 5.1b Molécules du Groupe 2

NOM CHIMIQUE	CODE NUMERIQUE	ACTIVITÉ	CMI (µg/ml)	
Δ^2 -AQ-C ₁₁	1f	+	ATCC 29213	>16
			MiSt	>16
			BeSi	>16
			CoSo	>16
Δ^2 -AQ-C ₁₂	1g	+	ATCC 29213	>16
			MiSt	>16
			BeSi	>16
			CoSo	>16
Δ^2 -AQNO-C ₁₁	3b	+	ATCC 29213	>8
			MiSt	>8
			BeSi	>8
			CoSo	>8
Δ^2 -AQ-C ₁₂ - Carbonate	16c	+	ATCC 29213	>16
			MiSt	>16
			BeSi	>16
			CoSo	>16

Tableau 5.1c Molécules du Groupe 3

<i>NOM CHIMIQUE</i>	<i>CODE NUMERIQUE</i>	<i>ACTIVITÉ</i>	<i>CMI (µg/ml)</i>	
Δ^2 -AQNO- <i>C</i> ₁₂ - Carbonate	17c/18c	+++	ATCC 29213	4
			MiSt	8
			BeSi	2
			CoSo	4-8
Δ^2 -AQNO- <i>C</i> ₁₂	3c	+++	ATCC 29213	8
			MiSt	8
			BeSi	4
			CoSo	8

Conclusions et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans ce manuscrit de thèse, nous avons présenté nos recherches sur la compréhension des interactions entre deux bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* (**Pa**) et *Staphylococcus aureus* (**Sa**), présentes dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Plus particulièrement, nos travaux ont porté sur la synthèse d'une trentaine de dérivés appartenant à la famille des 2-alkyl-4-hydroxyquinoléines. En effet, certaines de ces molécules apparaissent être produites par des microorganismes, dont **Pa**, et permettraient des interactions microbiennes.

Pour produire ces composés, nous avons mis en place une stratégie de synthèse permettant d'obtenir une grande diversité structurale en quelques étapes. Le **couplage de Suzuki-Miyaura** représente la réaction clé dans l'obtention de la première classe de molécules : les Δ^2 -AQ-C_n. Cette synthèse est réalisée par couplage d'une 2-halogénométhyl-4-hydroxyquinoléine avec un boronate d'alcényle. Elle permet l'introduction, sur le noyau quinoléique, d'une chaîne carbonée insaturée en position 2.

Le choix de cette voie de synthèse nous a permis de mettre en place une méthode originale de synthèse des boronates d'alcényles, basée sur l'hydroboration de ces alcynes. Elle nous permet d'obtenir rapidement des composés intermédiaires ayant une grande diversité de longueur de chaîne. De plus, cette voie est sans solvant, sans catalyse métallique et sous irradiation microondes. Ainsi, en plus de nos travaux de chimie médicinale, nous avons mis au point un nouveau procédé, rapide et écoresponsable, pour accéder à cette famille des esters boroniques.

A partir des composés issus du couplage de Suzuki (Δ^2 -AQ-C_n), les deuxième et troisième classes de molécules (AQ-C_n et Δ^2 -AQNO-C_n) sont obtenues respectivement par hydrogénation catalytique et par réaction de *N*-oxydation.

Au cours de nos travaux, différentes problématiques sont apparues. La résolution de ces situations représente un enjeu pour les travaux futurs. Ainsi, concernant la problématique liée à la chimio-compatibilité, lors de l'étape d'oxydation par MCPBA, nous envisageons de modifier notre stratégie de synthèse des composés Δ^2 -AQNO-C_n. La nouvelle séquence

réactionnelle prévoit l'étape d'oxydation, sur le composé 2-halogénométhyl-4-hydroxyquinoléine, avant le couplage de Suzuki.

Une autre problématique retrouvée est celle liée au réarrangement spontané du groupement carbonate lors de réaction d'oxydation du composé **16c** conduisant à un mélange de deux isomères **17c** et **18c**. En solution, un ratio entre les deux isomères est établi. Nous avons essayé d'isoler l'un de deux isomères, malheureusement sans succès. Nous ne pouvons pas clairement associer une structure à une activité anti-**Sa**. Cependant, nous supposons que l'activité est plus liée au composé **18c**, qu'au composé **17c**. Nous proposons donc de synthétiser le composé **18c** par une autre voie de synthèse comme par exemple la réaction du composé **3c** avec le carbonate d'éthyle.

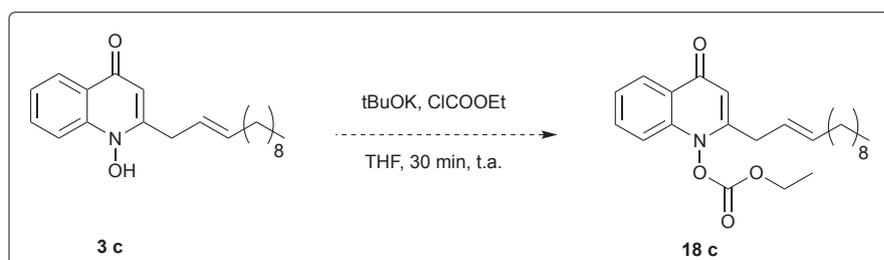


Schéma A. Proposition de synthèse du composé **18c**.

Suite à ces expérimentations, nous avons obtenu une série de molécules présentant une grande diversité structurale par fonctionnalisation directe du noyau quinoléique. Ces composés, y compris les intermédiaires réactionnels, ont pu être transmis à nos partenaires bactériologistes pour l'évaluation de leur activité anti-staphylococcique. Grâce à cette évaluation biologique, nous avons identifié des molécules qui présentent une très bonne activité inhibitrice de la croissance de **Sa**, le mélange **17c/18c** et le composé **3c**.

Les molécules synthétisées présentent une solubilité dans certains milieux biologiques (milieu de culture bactérien) qui est limitée. En effet, un phénomène de précipitation dans ces milieux est remarqué pour des concentrations supérieures à $16 \mu\text{g/ml}$, empêchant notamment la quantification précise de la CMI. Une étude sur l'amélioration de la solubilité de ces molécules est donc nécessaire. Nous proposons la formation de chlorhydrate de nos molécules. Une meilleure solubilité de ces composés nous permettra de poursuivre les

tests biologiques permettant l'identification de la cible thérapeutique et la détermination de l'action bactéricide ou bactériostatique de ces composés.

Les molécules synthétisées étant, pour la plupart, des composés originaux, leurs mécanismes anti- **Sa** ne sont pas encore clairement explicités. D'un point de vue structural, grâce aux résultats de l'évaluation biologique, nous avons pu orienter la synthèse des composés afin d'identifier les éléments structuraux importants permettant l'activité inhibitrice de la croissance de **Sa**. Nous avons ainsi débuté une première approche de la relation structure-activité antibactérienne. Parmi l'ensemble des éléments identifiées, l'équilibre tautomérique apparaît comme étant un facteur crucial permettant de comprendre l'activité inhibitrice de nos composés. Certes, l'identification d'une forme tautomère est complexe. Cependant, nous supposons que la présence d'une fonction carbonylée en position 4 de l'hétérocycle azoté est nécessaire à l'activité biologique. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons réalisé les premiers essais de synthèse d'une quatrième famille de composés, analogues *N*-méthylés des Δ^2 -AQNO-C_n qui bloquent la fonction carbonylée en position 4. Nous sommes dans l'attente de l'évaluation biologique du premier membre de cette famille pour confirmer notre hypothèse.

D'un point de vue biologique, une étude sur des mutants de **Sa** sera conduite prochainement pour identifier le mécanisme d'action de nos composés. Pour cette étude deux méthodes peuvent être envisagées. La première consiste en la production de mutants spontanés de **Sa** suite à la croissance de la bactérie dans des milieux contenant des quantités croissantes du composé. La seconde consiste en la confrontation de nos molécules avec une banque de mutants aléatoires, déjà constituée.

Les composés étudiés dans nos travaux présentent une activité anti-**Sa** qui pourrait en partie expliquer la succession au niveau pulmonaire fréquemment observée entre ces deux bactéries, **Sa** étant présent, comme évoqué précédemment surtout chez les enfants et **Pa** prenant sa suite chez les jeunes adolescents et les adultes¹. Cette activité anti-microbienne pourrait être généralisée à d'autres espèces bactériennes, expliquant l'envahissement progressif des poumons par **Pa** au détriment des autres micro-organismes.

¹ Registre Français de La Mucoviscidose - Bilan Des Données. 2017.

En effet, comme évoqué dans la partie bibliographique de ces travaux, un âge avancé chez les patients MV est souvent associé à la présence d'infections chroniques à *Pa* mais également à un microbiote moins divers. Cette diminution de la diversité pourrait être en lien avec l'envahissement de la niche pulmonaire par *Pa* et son action néfaste sur les autres organismes. A l'image de ce qui se produit pour *Sa*, cette action pourrait être permise notamment par la production de composés diffusibles dans l'environnement pulmonaire. Les familles de molécules que nous avons identifiées pourraient là encore jouer un rôle. Afin d'approfondir cette hypothèse, le spectre d'activité des molécules synthétisés doit être établi, à la fois pour des souches bactériennes de type Gram + (autres staphylocoques, streptocoque...) et Gram – (bacilles non fermentants autres que *Pa* par exemple). Des résultats préliminaires ont mis en évidence l'activité inhibitrice de ces molécules sur d'autres bactéries appartenant à la famille de *Staphylococcus*. Il sera également important de tester ces molécules sur différents microbiotes complexes de patients MV.

A noter que parmi toutes les molécules synthétisées, toutes ne sont pas naturellement produites par *Pa*. Il sera donc important de rechercher quels sont les composés réellement produits par cette bactérie parmi l'ensemble de ceux que nous avons élaborés, notamment *via* leur identification parmi les molécules obtenues lors de l'étude métabolomique (qui est à l'origine de nos travaux).

A long terme, les perspectives de ces travaux sont multiples. Outre le fait que cette étude permette de mieux appréhender les interactions microbiennes au sein des poumons MV, elle ouvre également de nouvelles voies thérapeutiques. En effet, grâce à ces travaux, une partie de la physiopathologie des infections pulmonaires à *Pa* pourrait être identifiée. Nos travaux répondent en partie à la problématique du projet HEMATITE, à savoir pourquoi et comment *Pa* finit par envahir les poumons des patients MV et engendrer des infections aux conséquences dramatiques en termes de morbidité et mortalité. Ces nouvelles connaissances laisseraient envisager le développement de stratégies anti-*Pa* innovantes. Comme par exemple, le blocage de la synthèse de certaines de ces molécules qui permettraient d'empêcher l'implantation de *Pa* au niveau pulmonaire et donc de réduire les infections. Nos travaux nous permettent également de disposer d'une chimiothèque de composés présentant un potentiel thérapeutique intéressant dans la lutte contre les infections par *Staphylococcus*,

non seulement dans le cadre de la MV mais probablement dans d'autres situations cliniques (infections cutanées, sur cathéters...). En fonction du spectre d'activité sur d'autres micro-organismes, l'emploi de ces molécules dans d'autres pathologies pourra être envisagée. Ainsi, la poursuite de la relation structure activité, de la potentialisation de ces molécules par des modifications structurales et de la caractérisation biologique pourra permettre le développement de nouvelles stratégies anti-infectieuses et classes d'antibiotiques, et ainsi déboucher sur une prise en charge optimisée des patients atteints de mucoviscidose.

Experimental Section

Experimental Section

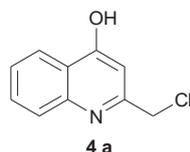
Experimental chemical section

General information

All air- and moisture-sensitive reactions were carried out under argon atmosphere. All purchased compounds were used as received, besides MCPBA which was used after purification. They were purchased from Sigma-Aldrich, Fisher Scientific and Fluorochem. Microwave reactions were performed in an Anton Paar Monowave 300 synthesiser. Liquid chromatography (LC) analyses were carried out by an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) Agilent 1290 Infinity system (Agilent Technologies). Chromatographic separations were performed on a reversed phase column Poroshell 120 SB-C18 Agilent (50 mm x 2.1 mm; 2.7 μ m). ^1H NMR spectra were recorded in a Bruker DRX400 Fourier transform spectrometer, using an internal deuterium lock, operating at 400 MHz or 500MHz. ^{13}C NMR spectra were recorded with Bruker DRX400 Fourier transform spectrometer, using an internal deuterium lock, operating at 100 MHz or 101 MHz. The chemical shift of the solvent residual signal was used as the reference. Chemical shifts were indicated in part per million (ppm) and coupling constants J are reported in hertz (Hz). Carbon multiplicity was determined by DEPT 135 experiments. High resolution mass spectroscopy was carried out in a Bruker MicroTOF Q mass spectrometer using an electrospray ionization (ESI). Column chromatography was realized using silica Kieselgel 300 - 400 mesh with eluent indicated for each compound. Analytical thin-layer chromatography (TLC silica gel 60 F254) purchased from Merck was realized and observed by UV lamps (254 nm and 356 nm) or revealed by KMnO_4 , followed by drying with heat gun. Melting point (mp) was measured with a BUCHI B-540.

General procedures

General procedure A: Conrad-Limpach cyclization:



In a 250 mL round-bottom flask, PPA is weighted and the aniline was added and ethyl-4-chloroacetate was slowly added. The mixture was heated at 130 °C for 3 h and once reaction was over, it was cooled and work up realized. The suspension was poured onto iced solution of NaOH (2M) for neutralization. Consequently, the suspension was filtered under vacuum. The crude product was recovered and purified by flash chromatography dichloromethane:methanol (97:3).

General procedure B: Suzuki-Miyaura coupling (Δ^2 -AQ-C_n (1a-h)):

In a 30 mL-microwave reactor alkenyl boronate **5** (1.5 mmol, 1.55 eq.) was, firstly, introduced; then 2-(chloromethyl)-4-hydroxyquinoline **4a** (0.93 mmol, 1 eq.) was added and consequently the dioxane (9 mL) and the two-molar solution of Na₂CO₃ (9 mL). Then, the tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.1 eq.) was added to the mixture. Reaction was led in a microwave synthesizer at 120 °C for 1 h. Once reaction was over the reaction mix was filtered onto celite® which was washed with EtOAc (3x 5 mL). The reaction mixture was, subsequently, washed with brine (3x 20 mL), the organic phase separated and filtered over phase-separator filter. The crude product was recovered after evaporated under reduced pressure. The final product **1** was obtained after flash chromatography with dichloromethane:methanol (97:3) and evaporation under reduced pressure.

General procedure C: catalytic hydrogenation (AQ-C_n (2a-h)):

In a round-bottom flask under argon, compound **1** (0.40 mmol, 1 eq.) was introduced and dry dichloromethane (9 mL) added. The flask was put under vigorous stirring, and the mixture was flushed with argon over 5 minutes. Then catalyst, Pd/C (10%) was added, and suspension was

flushed with argon over 5 min. Then, the reaction mixture was flushed with a constant hydrogen flux. Reaction was followed by TLC, which was revealed with H₂SO₄ (10%), followed by drying with heat gun. The starting compound was identified after drying instead, the hydrogenated product disappeared after drying. The reaction was considered over when spots on TLC faded out. The mixture was filtered over celite[®] and some washing were realized with dichloromethane (3x 10 mL). The final product **2** was obtained without further purification.

General procedure D: *N*-oxydation (Δ^2 -AQNO-C_n (3a-c)):

In a 50 mL round-bottom flask, compound **16** (0.83 mmol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (11.3 mL) at 0 °C. After few seconds, purified MCPBA (90% w/w, 0.91 mmol, 1.5 eq.) was added to the solution and the mixture was stirred at 0 °C for 3h. The reaction was stopped with Na₂CO₃ (0.5 M, 2x 15 mL) and with H₂O (1x 15 mL). Combined organic phases were dried by filtration on PS filter and concentrated under reduced pressure. The crude product was obtained after flash chromatography with EtOAc (100%). The corresponding *N*-oxide was isolated as a pale-yellow oil

General procedure E: Synthesis of Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)

A double-neck 100 ml flask was fitted up with a refrigerator and a brand-new rubber septum and flushed with argon. PdCl₂ (0.500 g, 2.82 mmol, 1 eq.) was suspended in dry DMSO (30 mL) under vigorous magnetic stirring. PPh₃ (3.7 g, 14.1 mmol, 5 eq.) was added to the suspension. The reaction mixture was heated at 165 °C in an oil bath until the formation of an orange clear solution. The oil bath was removed and monohydrated hydrazine (0.550 mL, 11.4 mmol) was introduced dropwise through the septum. The magnetic stirring was stopped. The mixture was led to cooled down to room temperature. It was observed that complex Pd(PPh₃)₄ slowly crystallized. The solid was recovered after filtration. Complex was washed with absolute ethanol (3x 10 mL) and diethyl ether (2x 10 mL). Pd(PPh₃)₄ was dried under vacuum and it was stocked under argon at -30 °C.

Yellow crystalline solid (90%, 2.92 g)

General procedure F: MCPBA purification:

MCPBA was purchased by Sigma-Aldrich at ~ 77% 2g of commercial MCPBA were dissolved in chloroform (20 mL) under magnetic stirring. Once the MCPBA was completely dissolved, it was washed with a phosphate buffer (3x 20 mL) and with water (3x 20 mL). Emulsion was formed during washings. Organic phase was dried over MgSO_4 and it was evaporated under reduced pressure.

Phosphate buffer preparation (KH_2PO_4 0.7 M, pH= 7.5): KH_2PO_4 (47.63 g) was dissolved in water (175 mL) and pH was adjusted to 7.5 with NaOH 2M (139-141 mL).

General procedure G: MCPBA titration :

0.5 g of purified MCPBA were added to a solution consisting of 1.5 g of NaI in 50 ml of water, 5 ml of glacial acetic acid and 5 ml of chloroform. The mixture was put under vigorous stirring. Released iodine was titrated with a sodium thiosulfate solution (1M).

2-(chloromethyl)-4-hydroxyquinoline (4a)

Compound **4a** was obtained following the general procedure A. The formation was verified by NMR and it was recovered with 23% yield. The aspect of the final product was light brown oily-solid. Variations were made to this general procedure, there are indicated in the following Tables.

Firstly, work-up conditions were investigated.

A different base was used such as NaHCO₃, but the final product was not found. Then, we changed the NaOH concentration to 4M, the final product was obtained with 14% yield.

Table A Different workups for the Conrad-Limpach cyclization

PPA (g)	Aniline (mol/mL)	Ethyl-4-chloroacetoacetate (mol/mL)	Base/T (°C)/t (h)	Yield (%)
34	0.05/4.6	0.05/6.8	NaOH (2M)/130/2	23
23.9	0.017/1.64	0.017/2.4	NaHCO ₃ /130/3	/
7.23	0.010/0.97	0.010/1.44	NaOH (4M)/130/2	14

The cyclisation was run with toluene or diphenyl ether, under different conditions. Reaction with toluene was realized in a microwave synthesizer at 270 °C for 5 minutes. Reaction with diphenyl ether was heated at reflux temperature (259 °C) for 6h. Both assays do not result in a final cyclisation product.

Table B Supplementary conditions for the Conrad-Limpach cyclization

Solvent (ml)	Enamine (mmol/g)	Method (heating, T (°C), time (min))	Yield (%)
<i>Toluene</i>			
11.6	5.8/1.38	Microwave/270/5	/
<i>Diphenylether</i>			
15	11/2.62	Thermic/259/360	/

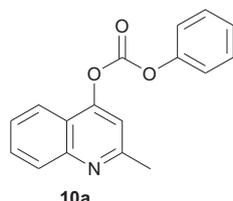
Another assay was done with aniline and ethyl-4-chloroacetoacetate in diphenyl ether. Some drops of H₂SO₄ was added. The reaction was heated to reflux temperature (259 °C) for 35 minutes. Product was not isolated.

Table C Assay of Conrad-Limpach cyclization using high-boiling point solvent

Diphenyl ether (mL)	Aniline mol/mL	Ethyl-4-chloroacetoacetate (mol/mL)	H ₂ SO ₄	Method (heating, T (°C), time (min))
50	0.036/2.18	0.091/8	2 drops	Thermic/259/35

2-methylquinolin-4-yl benzoate (10a)¹⁷³Chemical Formula: C₁₇H₁₃NO₂

Molecular Weight: 263,29 g/mol



In a 50 mL flask 2-methyl-4-hydroxyquinoline (1 g, 6.29 mmol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (13 mL) and the *N*-methylmorpholine (0.830 mL, 7.55 mmol, 1.2 eq) and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 15-20 min. The benzoyl chloride (0.767 mL, 6.60 mmol, 1.05 eq.) was slowly added to the reaction and the mixture was stirred for 50 min. The reaction was quenched with 10 mL of water. The organic phase was washed with water (2x 20 mL) and brine (1x 20 mL). The organic phase was dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. The final product was received after flash chromatography with dichloromethane: methanol (97:3) as a white solid. (1.326 g, 80%)

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.34 – 8.26 (m, 2H, 2x Ar-H), 8.09 (dt, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.00 – 7.92 (m, 1H, Ar-H), 7.76 – 7.67 (m, 2H, 2x Ar-H), 7.61 – 7.54 (m, 2H, 2x Ar-H), 7.50 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.33 (s, 1H, Ar-H), 2.79 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 25.70 (CH₃), 113.91 (Ar-CH), 120.99 (Cq-), 121.23 (Ar-CH), 126.26 (Ar-CH), 128.82 (Ar-CH), 129.01 (2x Ar-CH), 130.30 (Ar-CH), 130.51 (2x Ar-CH), 134.38 (Ar-CH), 149.55 (Cq), 154.63 (Cq), 159.99 (2xCq), 164.15 (Cq). Carbon signal of carbonyl was not observed.

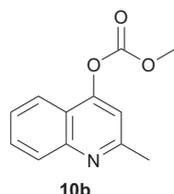
¹⁷³ Li, W.; Gao, J. J.; Zhang, Y.; Tang, W.; Lee, H.; Fandrick, K. R.; Lu, B.; Senanayake, C. H. A Mild Palladium-Catalyzed Suzuki Coupling Reaction of Quinoline Carboxylates with Boronic Acids. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353 (10), 1671–1675.

Table D Different conditions for the **2-methylquinolin-4-yl benzoate** synthesis

2-methyl-4-hydroxyquinoline (mmol)	Benzoyl chloride (mmol)	NMM (eq./μL)	DCM (mL)	Time (min)	Yield (%)
1,25	1.13	1.2/166.02	2	60	68
6.29	6.60	1.2/0.830	13	50	80
5	7.5	1.2/0.846	15	20	52

2-methylquinolin-4-yl acetate¹⁷³ (10b)Chemical Formula: C₁₂H₁₁NO₂

Molecular Weight: 201,22 g/mol



In a 50 mL flask 2-methyl-4-hydroxyquinoline (0.500 g, 3.14 mmol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (7.5 mL) and the *N*-methylmorpholine (NMM) (0.423 mL, 3.76 mmol, 1.2 eq) and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 15-20 min. The acetyl chloride (0.323 mL, 4.17 mmol, 1.5 eq.) was slowly added to the reaction and the mixture was stirred for 45 min. The reaction was quenched with 5 mL of water. The organic phase was washed with water (2x 10 mL) and brine (1x 10 mL). The organic phase was dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. The final product was received without further purification. Colorless oil. (0.330 g, 52%)

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H5), 7.88 – 7.78 (m, 1H, Ar-H8), 7.67 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.46 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H, Ar-H6), 7.16 (s, 1H, Ar-H3), 2.72 (s, 3H, O-CO-CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 21.14 (CH₃), 25.54 (O-CO-CH₃), 113.60 (Ar-CH-3), 120.60 (Cq-4a), 121.02 (Ar-CH-8), 126.07 (Ar-CH-6), 128.65 (Ar-CH-5), 130.13 (Ar-CH-7), 149.39 (Cq-8a), 154.12 (Cq-2), 159.81 (Cq-4), 168.18 (Cq-10).

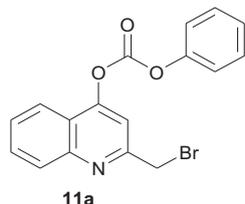
Table F Different conditions for 2-methylquinolin-4-yl acetate synthesis

2-methyl-4-hydroxyquinoline (mmol)	Acetyl chloride (mmol)	NMM (1.2 eq.)	DCM (mL)	Time (min)	Yield (%)
1,25 mmol	2.5 mmol	0,164 mL	3	180	20
2,5 mmol	3.75 mmol	0.423mL	7.5	20	52
2,5 mmol	3.75 mmol	0.423mL	7.5	45	No purification

¹⁷³ Li, W.; Gao, J. J.; Zhang, Y.; Tang, W.; Lee, H.; Fandrick, K. R.; Lu, B.; Senanayake, C. H. A Mild Palladium-Catalyzed Suzuki Coupling Reaction of Quinoline Carboxylates with Boronic Acids. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353 (10), 1671–1675.

2-(bromomethyl)quinolin-4-yl benzoate (11a)Chemical Formula: C₁₇H₁₂BrNO₂

Molecular Weight: 342,19 g/mol



In a 50 mL flask, benzoate derivative (0.500 g, 1.90 mmol, 1 eq.) was dissolved in chloroform (17 mL) and N-bromosuccinimide (0.341 g, 1.92 mmol, 1.01 eq.) and Azobisisobutyronitrile (0.046 mg, 0.29 mmol, 0.15 eq.) were added and the reaction was irradiated with 75W lamp for 15 min. Then, the mixture was heated during 5h at reflux temperature (75 °C). Once reaction was over the flask was introduced in an ice bath to enhance the precipitation. After few minutes, the mixture was filtered, the solid phase was rinsed with cooled dichloromethane. The solid was recovered for further purification by flash chromatography with dichloromethane: methanol (97:3). The final product was received as a white solid (314.9 mg, 48%)

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.27 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2x Ar-H), 8.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.81 – 7.65 (m, 2H, 2x Ar-H), 7.63 – 7.49 (m, 4H, 4x Ar-H), 4.71 (s, 2H, CH₂-Br).

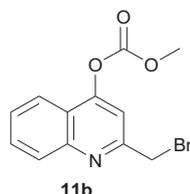
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 33.97 (CH₂-C9), 113.16 (Ar-CH), 121.23 (Ar-CH), 121.71 (Ar-Cq), 127.48, 128.44 (Ar-Cq), 128.94 (2x Ar-CH), 129.25 (Ar-CH), 130.40 (2x Ar-CH), 130.68 (Ar-CH), 134.42 (Ar-CH), 148.99 (Cq), 155.22 (Cq), 157.65 (Cq), 163.80 (Cq). Carbon signal of carbonyle was not observed.

Table E Different conditions for **2-(bromomethyl)quinolin-4-yl benzoate** synthesis

10a (mmol/eq)	NBS (mmol/eq)	AiBN (mmol/eq)	CCl₄ (mL)	Conditions	Yield (%)
0.38/1	0.38/1	0.057/0.015	8	75w/Reflux/3h	23
3.53/1	3.53 /1	0.17 /0.15	17	75w/Reflux/5h	48

2-(bromomethyl)quinolin-4-yl acetate (11b)Chemical Formula: C₁₂H₁₀BrNO₂

Molecular Weight: 280,12 g/mol



In a 25 mL round-bottom flask, acetate derivative (0.589 g, 2.9 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetonitrile (HPLC grade) (3 mL) and N-bromosuccinimide (0.573 g, 3.22 mmol, 1.1 eq.) and Azobisisobutyronitrile (0.047 g, 0.029 mmol, 0.1 eq.) were added and the reaction was irradiated with 75W lamp for 15 min. Then, the mixture was heated during 5h at reflux temperature (75 °C). Once reaction was over the flask was introduced in an ice bath to enhance the precipitation. After few minutes, the mixture was filtered, the solid phase was rinsed with cooled dichloromethane. The solid was recovered for further purification by flash chromatography with cyclohexane: EtOAc (90:10). The final product was received as a white solid (221 mg, 27%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H5), 7.95 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H, Ar-H8), 7.79 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, 1H, Ar-H7), 7.61 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H, Ar-H6), 2.52 (s, 3H, CH₃), 1.26 (s, 2H, CH₂-Br).

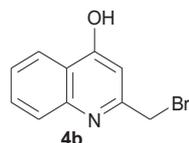
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 21.31 (CH₃), 29.84 (CH₂-Br), 111.63 (Ar-CH-3), 121.35 (Ar-CH-8), 122.20 (Cq-4a), 128.27 (Ar-CH-6), 129.64 (Ar-CH-5), 131.15 (Ar-CH-7), 147.30 (Cq-8a), 155.62 (Cq-2), 159.17 (Cq-4), 167.83 (Cq-10).

Table G Different conditions for 2-(bromomethyl)quinolin-4-yl acetate synthesis

6 (mmol)	NBS (mmol)	AiBN (mmol)	ACN (mL)	DCM (mmol)	Conditions	Yield (%)
2.9	3.22	0.29	3	/	75W/reflux/1h	27
0.99	1.09	0.099	/	6 mL	75W/reflux/3h	12

2-(bromomethyl)quinolin-4-ol (4b)Chemical Formula: C₁₀H₈BrNO

Molecular Weight: 238,08 g/mol



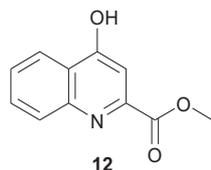
In a 25 mL round bottom flask, 0.100 g of 2-(bromomethyl)quinolin-4-yl benzoate (0.29 mmol, 1 eq.), are dissolved in a mix of THF (1.5 mL) and H₂O (1 mL). The mixture was cooled down at 0 °C and LiOH (0.030 g, 1.27 mmol, 4 eq.) was added. The reaction was stopped after 30 min with water. The final product was obtained by extraction with EtOAc. The combined organic phases were dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The final product was obtained without further purification with 92% yield.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.22 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H, Ar-H5), 7.72 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.64 – 7.55 (m, 1H, Ar-H8), 7.41 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.1 Hz, 1H, Ar-H6), 6.43 (s, 1H, Ar-H3), 4.53 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 28.04 (CH₂), 109.69 (Ar-CH-3), 119.35 (Ar-CH-8), 125.52 (Cq-4a), 125.55 (Ar-CH-6), 125.94 (Ar-CH-5), 133.98 (Ar-CH-7), 141.72 (Cq-8a), 151.28 (Cq-2), 180.51 (Cq-4).

Methyl 4-hydroxyquinoline-2-carboxylate¹²⁷ (12)Chemical Formula: C₁₁H₉NO₃

Molecular Weight: 203,19 g/mol



In a 50 mL flask, 45 mL of methanol was measured and 5 mL of H₂SO₄ was added, the mix was realized at 0 °C. In a 250 mL round-bottom flask, the kynurenic acid **7** (0.820 g, 3.9 mmol, 1 eq.) was introduced and the mix Methanol/H₂SO₄ was added to the kynurenic acid at 0 °C. The round-bottom flask was placed in a heating mantle and the condenser was put in position over the flask, the mixture was heated to reflux temperature (65 °C) overnight. The work-up consisted in neutralizing the acid excess with NaHCO₃ (40 g) at 0 °C. The NaHCO₃ was slowly added over 15 minutes. The pH was verified to be neutral. Then, the methanol was evaporated, and 200 mL of water was added. The water phase was extracted with ethyl acetate (3x 200 mL) and the organic phases were recovered, dried over phase-separator filter and solvent was dried and evaporated under reduced pressure. The final compound was recovered without further purification with a yield of 90%.

Pale yellow solid (800 mg, 90%)

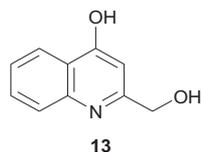
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.22 (m, 1H, Ar-H5), 7.65 – 7.59 (m, J = 6.1, 1.3 Hz, 2H, Ar-H8-7), 7.33 (ddd, J = 8.1, 6.0, 2.0 Hz, 1H, Ar-H6), 6.94 (s, 1H, Ar-H3), 3.95 (s, 2H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 53.70 (CH₃), 110.78 (Ar-CH-3), 118.88 (Ar-CH-8), 124.98 (Ar-CH-6), 125.55 (Ar-CH-5), 125.84 (Cq-4a), 133.35 (Ar-CH-7), 137.51 (Cq-8a), 139.68 (Cq-2), 162.87 (Cq-4), 179.61 (Cq-CO).

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from Pseudonocardia Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802.

2-(hydroxymethyl)-4-hydroxyquinoline¹²⁷ (13)Chemical Formula: C₁₀H₉NO₂

Molecular Weight: 175,18 g/mol



In a 250 mL round-bottom flask, the methyl 4-hydroxyquinoline-2-carboxylate **12** (1.5 g, 7.3 mmol, 1 eq.) was suspended in the THF (23 mL) and the flask was placed in a heating mantle and the condenser was put in position over, in an inert environment. Then, NaBH₄ (1.65 g, 44 mmol, 6 eq.) was slowly added to the suspension and the mixture was heated to reflux temperature (65 °C) for 15 minutes. Then, methanol (23 mL) was added dropwise over 15 minutes, due to foam formation. Reaction was over after 3h at reflux temperature. The mixture was cooled to room temperature and the solvent evaporated under reduced pressure. The final product **13** was obtained by flash chromatography with dichloromethane: methanol (90: 10).

Pale yellow solid (895 mg, 70%)

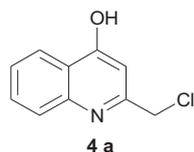
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.22 (dt, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H, Ar-H5), 7.74 – 7.59 (m, 2H, Ar-H8-7), 7.40 (ddd, *J* = 8.2, 6.1, 2.0 Hz, 1H, Ar-H6), 6.35 (s, 1H, Ar-H3), 4.67 (d, *J* = 0.7 Hz, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 61.81 (CH₂), 106.54 (Ar-H3), 119.62 (Ar-H8), 125.38 (Ar-H6), 126.23 (Ar-H5), 126.19 (Cq-4a), 133.68 (Ar-H7), 141.63 (8a), 156.16 (Cq-2), 180.99 (Cq-4).

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from Pseudonocardia Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802

2-(chloromethyl)-4-hydroxyquinoline¹²⁷ (**4a**)Chemical Formula: C₁₀H₈ClNO

Molecular Weight: 193,63 g/mol



In a 250 mL round-bottom flask, 2-(hydroxymethyl)-4-hydroxyquinoline (**13**) (1.07 g, 6.11 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous DCM (50 mL). The mixture was cooled down to 0 °C and SOCl₂ (4.46 mL, 61.1 mmol, 10 eq.) was added dropwise over 10 minutes. The mixture was led to reach room temperature and after 24 h the reaction was stopped with 100 mL of methanol, added dropwise over 15 minutes and it was left for 1 h at room temperature. Then, solvent was evaporated under reduced pressure and the final product **4a** was isolated by flash chromatography (dichloromethane: methanol (90: 10)).

White solid (970 mg, 82%)

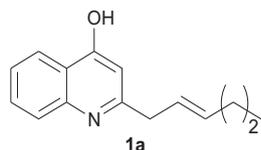
¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 8.20 (m, 1H, Ar-H5), 7.70 (ddd, J = 8.4, 7.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.70 (m, 1H, Ar-H8), 7.40 (ddd, J = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H, Ar-H6), 6.40 (s, 1H, Ar-H3), 4.66 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 42.79 (CH₂), 109.63 (Ar-CH-3), 119.40 (Ar-CH-8), 125.48 (Ar-CH-6), 125.67 (Cq-4a), 126.00 (Ar-CH-5), 133.98 (Ar-CH-7), 141.78 (Cq-8a), 150.75 (Cq-2), 180.86 (Cq-4).

¹²⁷ Salvaggio, F.; Hodgkinson, J. T.; Carro, L.; Geddis, S. M.; Galloway, W. R. J. D.; Welch, M.; Spring, D. R. The Synthesis of Quinolone Natural Products from Pseudonocardia Sp. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (35), 5799–5802

(E)-2-(hex-2-en-1-yl)quinolin-4-ol (1a)Chemical Formula: C₁₅H₁₇NO

Molecular Weight: 227,30 g/mol



Final product **1a** was obtained following the general procedure B for the Suzuki-Miyaura coupling. **1a** was obtained as a pale yellow oil with a yield after purification of 90%.

M.p. 120.0 – 120.6 °C

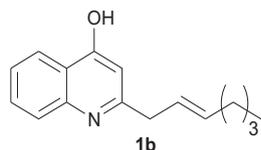
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 12.21 (s, 1H, OH), 8.28 (dd, J = 8.2, 1.5 Hz, 1H, Ar-H5), 7.66 (m, 1H, Ar-H8), 7.50 (ddd, J = 8.4, 7.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.25 (ddd, J = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H, Ar-H6), 6.19 (s, 1H, Ar-H3), 5.70 – 5.39 (m, 2H, 2x alkenyl-H), 3.37 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂-9), 1.85 (dt, J = 7.8, 6.0 Hz, 2H, CH₂-12), 1.22 (dt, J = 14.4, 7.2 Hz, 2H, CH₂-13), 0.75 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 13.65 (CH₃), 22.23 (CH₂-13), 34.50 (CH₂-12), 37.21 (CH₂-9), 108.24 (Ar-CH-3), 118.55 (Ar-CH-8), 123.61 (CH-alkenyl), 124.00 (Ar-CH-6), 125.01 (Cq-4a), 125.29 (Ar-CH-5), 131.79 (Ar-CH-7), 135.38 (CH-alkenyl), 140.68 (Cq-8a), 153.66 (Cq-2), 179.01 (Cq-4).

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₅H₁₈NO: 228.1383 found [M+H]⁺: 228.1381

(E)-2-(hept-2-en-1-yl)quinolin-4-ol (1b)Chemical Formula: C₁₆H₁₉NO

Molecular Weight: 241,33 g/mol



Final product **1b** was obtained following the general procedure B for the Suzuki-Miyaura coupling. **1b** was obtained as a white solid with a yield after purification of 86%.

M.p. 117.1 - 117.8 °C

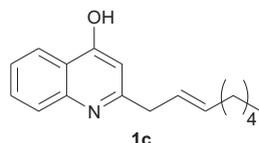
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.36 (dd, J = 8.2, 1.2 Hz, 1H, Ar-H5), 7.75 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar-H8), 7.57 (ddd, J = 8.4, 7.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.32 (ddd, J = 8.1, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar-H6), 6.26 (s, 1H, Ar-H3), 5.74 – 5.43 (m, 2H, 2x alkenyl-H), 3.44 (d, 2H, CH₂-9), 1.95 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-12), 1.36 – 1.14 (m, J = 4.7, 4.0 Hz, 4H, CH₂-13,14), 0.91 – 0.63 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 13.88 (CH₃), 22.21 (CH₂-14), 31.23 (CH₂-13), 32.13 (CH₂-12), 37.23 (CH₂-9), 108.25 (Ar-CH-3), 118.59 (Ar-CH-8), 123.59 (CH-alkenyl), 123.80 (Ar-CH-6), 125.03 (Cq-4a), 125.28 (Ar-CH-5), 131.78 (Ar-CH-7), 135.56 (CH-alkenyl), 140.66 (Cq-8a), 153.70 (Cq-2), 179.00 (Cq-4).

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₆H₂₀NO: 242.1539 found [M+H]⁺: 242.1541

(E)-2-(oct-2-en-1-yl)quinolin-4-ol (1c)Chemical Formula: C₁₇H₂₁NO

Molecular Weight: 255,36 g/mol



Final product **1c** was obtained following the general procedure B for the Suzuki-Miyaura coupling. **1c** was obtained as a white solid with a yield after purification of 80%.

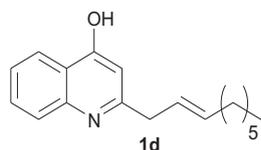
M.p. 101.0 - 101.8 °C

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ= 12.31 (s, 1H, OH ou NH), 8.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H5), 7.79 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar-H8), 7.58 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H7), 7.34 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar-H6), 6.33 (s, 1H, Ar-H3), 5.63 (dt, J = 12.7, 6.3 Hz, alkenyl-H), 5.54 (dt, J = 15.1, 6.4 Hz, 1H, alkenyl-H), 3.48 (d, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂-9), 1.95 (q, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-12), 1.25 (q, J = 9.0, 8.1 Hz, 6H, CH₂-13-15), 0.83 (t, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ= 14.17 (CH₃), 22.59 (CH₂-16), 25.00 (CH₂-15), 28.91 (CH₂-14), 31.53 (CH₂-13), 32.57 (CH₂-12), 37.33 (CH₂-9), 108.08 (Ar-CH-3), 118.75 (Ar-CH-8), 123.68 (CH- alkenyl), 124.04 (Ar-CH-6), 124.66 (Cq-4a), 125.33 (Ar-CH-5), 132.11 (Ar-CH-7), 136.09 (CH- alkenyl), 140.57 (Cq-8a), 154.11 (Cq-2), 178.49 (Cq-4).

(E)-2-(non-2-en-1-yl)quinolin-4-ol (1d)Chemical Formula: C₁₈H₂₃NO

Molecular Weight: 269,38 g/mol



Final product **1d** was obtained following the general procedure B for the Suzuki-Miyaura coupling. **1d** was obtained as a white solid with a yield after purification of 74%.

M.p. 93.2 - 93.7 °C

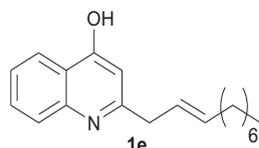
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.81 (s, 1H, OH ou NH), 8.35 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, Ar-H5), 7.68 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H, Ar-H8), 7.57 (ddd, *J* = 8.4, 7.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.32 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar-H3), 5.63 (dt, *J* = 15.1, 6.4 Hz, 1H, alkenyl-H), 5.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, alkenyl-H), 3.43 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-9), 1.97 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂-12), 1.35 – 1.15 (m, 8H, CH₂-13-16), 0.83 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.07 (CH₃), 22.59 (CH₂-16), 28.89 (CH₂-15), 29.09 (CH₂-14), 31.66 (CH₂-13), 32.49 (CH₂-12), 37.26 (CH₂-9), 108.41 (Ar-CH-3), 118.35 (Ar-CH-8), 123.58 (CH- alkenyl), 123.68 (Ar-CH-6), 125.05 (Cq-4a), 125.41 (Ar-CH-5), 131.78 (Ar-CH-7), 135.88 (CH- alkenyl), 140.49 (Cq-8a), 153.24 (Cq-2), 179.01 (Cq-4).

HRMS (ESI) : calcd. For C₁₈H₂₄NO: 270.1852 found [M+H]⁺: 270.1852

(E)-2-(dec-2-en-1-yl)quinolin-4-ol (1e)Chemical Formula: C₁₉H₂₅NO

Molecular Weight: 283,41 g/mol



Final product **1e** was obtained following the general procedure B for the Suzuki-Miyaura coupling. **1e** was obtained as a white solid with a yield after purification of 70%.

M.p. 92.1 - 92.8 °C

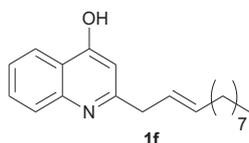
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.77 (s, 1H, OH), 8.28 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H, Ar-H5), 7.61 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H, Ar-H8), 7.50 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.25 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar-H3), 5.56 (dt, *J* = 15.2, 6.3 Hz, 1H, alkenyl-H), 5.52 – 5.43 (m, 1H, alkenyl-H), 3.36 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-9), 1.90 (m, 2H, CH₂-12), 1.43 – 1.00 (m, 10H, CH₂-13-17), 0.77 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.09 (CH₃), 22.65 (CH₂-17), 29.13 (CH₂-16), 29.14 (CH₂-15), 29.19 (CH₂-14), 31.81 (CH₂-13), 32.50 (CH₂-12), 37.27 (CH₂-9), 108.41 (Ar-CH-3), 118.37 (Ar-CH-8), 123.58 (CH- alkenyl), 123.69 (Ar-CH-6), 125.05 (Cq-4a), 125.41 (Ar-CH-5), 131.77 (Ar-CH-7), 135.87 (CH- alkenyl), 140.50 (Cq-8a), 153.26 (Cq-2), 179.01 (Cq-4).

HRMS (ESI) : calcd. For C₁₉H₂₆NO: 284.2009 found [M+H]⁺: 284.2011

(E)-2-(undec-2-en-1-yl)quinolin-4-ol (1f)C₂₀H₂₇NO

297,44 g/mol



Final product **1f** was obtained following the general procedure B for the Suzuki-Miyaura coupling. **1f** was obtained as a white solid with a yield after purification of 68%.

M.p. 91.9 – 91.0 °C

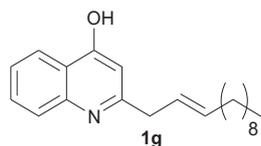
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ= 8.23 – 8.17 (m, 1H, Ar-H5), 7.67 (ddd, *J* = 8.4, 7.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H8), 7.55 (m, 1H, Ar-H7), 7.38 (ddd, *J* = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H, Ar-H6), 6.21 (s, 1H, Ar-H3), 5.77 – 5.66 (m, 1H, alkenyl-H), 5.65 – 5.54 (m, 1H, alkenyl-H), 3.66 – 2.83 (m, 2H, CH₂-9), 2.26 – 1.74 (m, 2H, CH₂-12), 1.38 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-13), 1.33 – 1.17 (m, 10H, CH₂-14-18), 0.86 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 14.42 (CH₃), 23.70 (CH₂-18), 30.23 (CH₂-17), 30.31 (CH₂-16), 30.41 (CH₂-15), 30.52 (CH₂-14), 33.01 (CH₂-13), 33.51 (CH₂-12), 37.86 (CH₂-9), 108.89 (Ar-CH-3), 119.09 (Ar-CH-8), 125.06 (alkenyl-CH), 125.32 (Ar-CH-6), 125.52 (Cq-4a), 126.00 (Ar-CH-5), 133.42 (Ar-CH-7), 136.42 (alkenyl-CH), 141.62 (Cq-8a), 155.59 (Cq-2), 180.73 (Cq-4).

HRMS (ESI) : calcd. For C₂₀H₂₈NO: 298.2165 found [M+H]⁺: 298.2165

(E)-2-(dodec-2-en-1-yl)quinolin-4-ol (1g)Chemical Formula: C₂₁H₂₉NO

Molecular Weight: 311,46 g/mol



Final product **1g** was obtained following the general procedure B for the Suzuki-Miyaura coupling. **1g** was obtained as a white solid with an yield after purification of 66%.

M.p. 84.7 – 85.5 °C

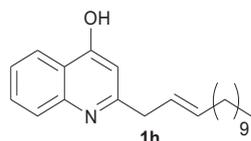
¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.27 – 8.13 (m, 1H, Ar-H5), 7.68 (ddd, *J* = 8.4, 7.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H8), 7.57 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H7), 7.38 (m, 1H, Ar-H6), 6.21 (s, 1H, Ar-H3), 5.76 – 5.66 (m, 1H, alkenyl-H), 5.65 – 5.56 (m, 1H, alkenyl-H), 3.41 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-9), 2.07 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-12), 1.49 – 1.16 (m, 14H CH₂-13-19), 0.87 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 14.44 (CH₃), 23.71 (CH₂-19), 30.22 (CH₂-18), 30.31 (CH₂-17), 30.42 (CH₂-16), 30.56 (CH₂-15), 30.69 (CH₂-14), 33.04 (CH₂-13), 33.51 (CH₂-12), 37.86 (CH₂-9), 108.89 (Ar-CH-3), 119.09 (Ar-CH-8), 125.06 (CH- alkenyl), 125.34 (Ar-CH-6), 125.52 (Cq-4a), 126.00 (Ar-CH-5), 133.42 (Ar-CH-7), 136.42 (CH- alkenyl), 141.62 (Cq-8a), 155.60 (Cq-2), 180.73 (Cq-4).

HRMS (ESI) : calcd. For C₂₁H₃₀NO: 312.2322 found [M+H]⁺: 312.2330

(E)-2-(tridec-2-en-1-yl)quinolin-4-ol (1h)Chemical Formula: C₂₂H₃₁NO

Molecular Weight: 325,49 g/mol



Final product **1h** was obtained following the general procedure B for the Suzuki-Miyaura coupling. **1h** was obtained as a white solid with an yield after purification of 57%

M.p. 83.0 – 83.8 °C

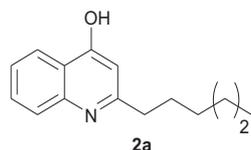
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.59 (s, 1H, OH), 8.47 – 8.30 (m, 1H, Ar-H5), 7.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H8), 7.64 – 7.54 (m, 1H, Ar-H7), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H6), 6.37 (s, 1H, Ar-H3), 5.69 – 5.60 (m, 1H, alkenyl-H), 5.60 – 5.50 (m, 1H, alkenyl-H), 3.52 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-9), 1.95 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂-12), 1.40 – 1.13 (m, 16H, CH₂-13-20), 0.85 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.25 (CH₃), 22.82 (CH₂-20), 29.29 (CH₂-19), 29.40 (CH₂-18), 29.48 (CH₂-17), 29.62 (2x CH₂-15-16), 29.76 (CH₂-14), 32.04 (CH₂-13), 32.65 (CH₂-12), 37.34 (CH₂-9), 107.92 (Ar-CH-3), 118.90 (Ar-CH-8), 123.69 (CH-11), 124.13 (Ar-CH-6), 124.51 (Cq-4a), 125.25 (Ar-CH-5), 132.15 (Ar-CH-7), 136.09 (CH-10), 140.61 (Cq-8a), 154.45 (Cq-2), 178.27 (Cq-4).

LC-UV/MS: 326.4 g/mol

2-hexyl-4-hydroxyquinoline⁹² (**2a**)Chemical Formula: C₁₅H₁₉NO

Molecular Weight: 229,32 g/mol



Final product **2a** was obtained following the general procedure C for the catalytic hydrogenation. **2a** was obtained as a white solid without further purification with an yield of 96%.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 8.20 (m, 1H, Ar-H5), 7.67 (m, 1H, Ar-H7), 7.57 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar-H8), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar-H6), 6.22 (s, 1H, Ar-H3), 2.75 – 2.66 (m, 2H, CH₂-9), 1.74 (p, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂-10), 1.45 – 1.27 (m, 6H, 3x CH₂-11-13), 0.90 (m, 3H, CH₃).

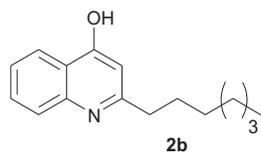
¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 14.36 (CH₃), 23.56 (CH₂-13), 29.89 (CH₂-12), 30.13 (CH₂-11), 32.62 (CH₂-10), 34.98 (CH₂-9), 108.81 (Ar-CH-3), 119.07 (Ar-CH-8), 125.05 (Ar-CH-6), 125.46 (Cq-4a), 125.94 (Ar-CH-5), 133.37 (Ar-CH-7), 141.58 (Cq-8a), 157.13 (Cq-2), 180.60 (Cq-4).

LC-UV/MS: 230.2 g/mol

⁹² Supong, K.; Thawai, C.; Supothina, S.; Auncharoen, P.; Pittayakhajonwut, P. Antimicrobial and Anti-Oxidant Activities of Quinoline Alkaloids from *Pseudomonas Aeruginosa* BCC76810. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 100–106

2-heptyl-4-hydroxyquinoline⁹² (**2b**)Chemical Formula: C₁₆H₂₁NO

Molecular Weight: 243,35 g/mol



Final product **2b** was obtained following the general procedure C for the catalytic hydrogenation. **2b** was obtained as a white solid without further purification with an yield of 95%)

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.81 (s, 1H, OH ou NH), 8.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H5), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H8), 7.59 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H7), 7.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H6), 6.30 (s, 1H, Ar-H3), 2.73 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂-9), 1.72 (p, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂-10), 1.33 – 1.09 (m, 8H, CH₂-11-13), 0.80 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

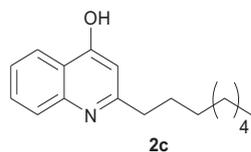
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.02 (CH₃), 22.56 (CH₂-13), 28.97 (CH₂-12), 29.19 (CH₂-11), 31.65 (CH₂-10), 34.35 (CH₂-9), 107.83 (Ar-CH-3), 118.80 (Ar-CH-8), 123.74 (Ar-CH-6), 124.67 (Cq-4a), 125.06 (Ar-CH-5), 131.85 (Ar-CH-7), 140.71 (Cq-8a), 155.89 (Cq-2), 178.53 (Cq-4).

LC-UV/MS: 244.2 g/mol

⁹²Supong, K.; Thawai, C.; Supothina, S.; Auncharoen, P.; Pittayakhajonwut, P. Antimicrobial and Anti-Oxidant Activities of Quinoline Alkaloids from *Pseudomonas Aeruginosa* BCC76810. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 100–106.

2-octyl-4-hydroxyquinoline⁹² (**2c**)Chemical Formula: C₁₇H₂₃NO

Molecular Weight: 257,37 g/mol



Final product **2c** was obtained following the general procedure C for the catalytic hydrogenation. **2c** was obtained as a white solid without further purification with an yield of 80%)

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.14 (s, 1H, OH ou NH), 8.37 (m, 1H, Ar-H5), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H8), 7.60 (m, 1H, Ar-H7), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H6), 6.38 (s, 1H, Ar-H3), 2.89 – 2.68 (m, 2H, CH₂-9), 1.73 (p, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂-10), 1.33 – 1.03 (m, 10H, CH₂-11-15), 0.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

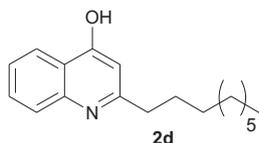
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.20 (CH₃), 22.73 (CH₂-15), 24.99 (CH₂-14), 29.27 (CH₂-13), 29.36 (CH₂-12), 29.41 (CH₂-11), 31.90 (CH₂-10), 34.42 (CH₂-9), 107.55 (Ar-CH-3), 119.12 (Ar-CH-8), 124.18 (Ar-CH-6), 124.26 (Cq-4a), 125.03 (Ar-CH-5), 132.16 (Ar-CH-7), 140.74 (Cq-8a), 156.63 (Cq-2), 177.95 (Cq-4).

LC-UV/MS: 258.3 g/mol

⁹²Supong, K.; Thawai, C.; Supothina, S.; Auncharoen, P.; Pittayakhajonwut, P. Antimicrobial and Anti-Oxidant Activities of Quinoline Alkaloids from *Pseudomonas Aeruginosa* BCC76810. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 100–106.

2-nonyl-4-hydroxyquinoline (2d)Chemical Formula: C₁₈H₂₅NO

Molecular Weight: 271,40 g/mol



Final product **2d** was obtained following the general procedure C for the catalytic hydrogenation. **2d** was obtained as a white solid without further purification with an yield of 95%)

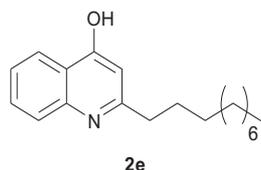
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.48 (s, 1H, OH ou NH), 8.29 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H, Ar-H5), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H8), 7.51 (m, 1H, Ar-H7), 7.25 (m, 1H, Ar-H6), 6.18 (s, 1H, Ar-H3), 2.63 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂-9), 1.64 (p, *J* = 8.0, 7.5 Hz, 2H, CH₂-10), 1.25 – 1.00 (m, 12H, CH₂-11-16), 0.76 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.09 (CH₃), 22.64 (CH₂-16), 29.17 (2x CH₂-14-15), 29.27 (CH₂-13), 29.34 (CH₂-12), 29.45 (CH₂-11), 31.83 (CH₂-10), 34.40 (CH₂-9), 108.09 (Ar-CH-3), 118.65 (Ar-CH-8), 123.51 (Ar-CH-6), 124.99 (Cq-4a), 125.19 (Ar-CH-5), 131.71 (Ar-CH-7), 140.75 (Cq-8a), 155.45 (Cq-2), 178.90 (Cq-4).

LC-UV/MS: 272.2 g/mol

2-decyl-4-hydroxyquinoline (2e)Chemical Formula: C₁₉H₂₇NO

Molecular Weight: 285,43 g/mol



Final product **2e** was obtained following the general procedure C for the catalytic hydrogenation. **2e** was obtained as a white solid without further purification with an yield of 84%.

M.p. 134.2 -135.0 °C

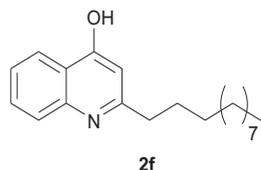
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.50 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H5), 7.81 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H8), 7.58 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H7), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H6), 6.26 (s, 1H, Ar-H3), 2.70 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-9), 1.72 (p, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂-10), 1.21 (d, *J* = 29.7 Hz, 14H, CH₂-11-17), 0.84 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.10 (CH₃), 22.66 (CH₃), 29.16 (CH₂-17), 29.27 (CH₂-15-16), 29.30 (CH₂-14), 29.35 (CH₂-13), 29.51 (CH₂-12), 29.57 (CH₂-11), 31.87 (CH₂-10), 34.40 (CH₂-10), 108.06 (Ar-CH-3), 118.64 (Ar-CH-8), 123.57 (Ar-CH-6), 124.92 (Cq-4a), 125.18 (Ar-CH-5), 131.75 (Ar-CH-7), 140.71 (Cq-8a), 155.49 (Cq-2), 178.84 (Cq-4).

LC-UV/MS: 286.2 g/mol

2-undecyl-4-hydroxyquinoline (2f) ⁹²Chemical Formula: C₂₀H₂₉NO

Molecular Weight: 299,45 g/mol



Final product **2f** was obtained following the general procedure C for the catalytic hydrogenation. **2f** was obtained as a white solid without further purification with an yield of 90%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.08 (s, 1H, OH ou NH), 8.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H5), 7.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H8), 7.60 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar-H7), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H6), 6.38 (s, 1H, Ar-H3), 2.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂-9), 1.74 (p, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂-10), 1.40 – 1.08 (m, 16H, CH₂-11-18), 0.84 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃).

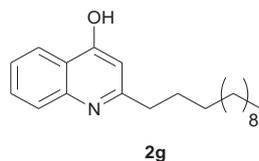
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.24 (CH₃), 22.81 (CH₂-18), 29.38 (CH₂-17), 29.46 (CH₂-16), 29.50 (CH₂-15), 29.50 (CH₂-14), 29.65 (CH₂-13), 29.74 (CH₂-12), 29.76 (CH₂-11), 32.03 (CH₂-10), 34.45 (CH₂-9), 107.64 (Ar-CH-3), 119.09 (Ar-CH-8), 124.13 (Ar-CH-6), 124.36 (Cq-4a), 125.10 (Ar-CH-5), 132.12 (Ar-CH-7), 140.77 (Cq-8a), 156.49 (Cq-2), 178.01 (Cq-4).

LC-UV/MS: 300.3 g/mol

⁹²Supong, K.; Thawai, C.; Supothina, S.; Auncharoen, P.; Pittayakhajonwut, P. Antimicrobial and Anti-Oxidant Activities of Quinoline Alkaloids from *Pseudomonas Aeruginosa* BCC76810. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 100–106.

2-dodecyl-4-hydroxyquinoline (2g)Chemical Formula: C₂₁H₃₁NO

Molecular Weight: 313,48 g/mol



Final product **2g** was obtained following the general procedure C for the catalytic hydrogenation. **2g** was obtained as a white solid without further purification with an yield of 90%.

M.p. 135.7 – 136.5 °C

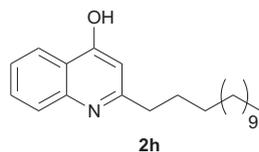
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.36 (s, 1H, OH ou NH), 8.36 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H5), 7.81 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, Ar-H8), 7.58 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H7), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H8), 6.27 (s, 1H, Ar-H3), 2.71 (m, 2H, CH₂-9), 1.72 (m, 2H, CH₂-10), 1.23 (m, 18H, CH₂-11-19), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.25 (CH₃), 22.82 (CH₂-19), 29.28 (CH₂-18), 29.41 (CH₂-17), 29.49 (CH₂-16), 29.50 (CH₂-15), 29.66 (CH₂-14), 29.78 (2x CH₂-12-13), 29.80 (CH₂-11), 32.05 (CH₂-10), 34.54 (CH₂-9), 108.17 (Ar-CH-3), 118.75 (Ar-CH-8), 123.77 (Ar-CH-6), 124.97 (Cq-4a), 125.34 (Ar-CH-5), 131.93 (Ar-CH-7), 140.79 (Cq-8a), 155.62 (Cq-2), 178.83 (Cq-4).

LC-UV/MS: 314.2 g/mol

2-tridecyl-4-hydroxyquinoline (2h)Chemical Formula: C₂₂H₃₃NO

Molecular Weight: 327,51 g/mol



Final product **2h** was obtained following the general procedure C for the catalytic hydrogenation. **2h** was obtained as a white solid without further purification with an yield of 85%.

M.p. 136.9 – 137.4 °C

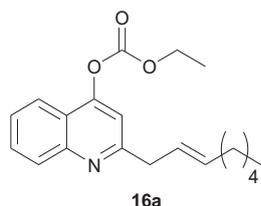
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.32 (s, 1H, OH ou NH), 8.36 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H, Ar-H5), 7.76 (p, *J* = 7.5, 7.1 Hz, 1H, Ar-H8), 7.58 (m, 1H, Ar-H7), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-H6), 6.24 (s, 1H, Ar-H3), 2.74 – 2.66 (m, 2H, CH₂-9), 1.73 (p, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂-10), 1.34 – 1.11 (m, 20H, CH₂-11-20), 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.24 (CH₃), 22.82 (CH₂-20), 29.27 (CH₂-19), 29.42 (CH₂-18), 29.50 (2x CH₂-16-17), 29.67 (CH₂-15), 29.78 (CH₂-14), 29.80 (2x CH₂-12-13), 29.83 (CH₂-11), 32.06 (CH₂-10), 34.57 (CH₂-9), 108.30 (Ar-CH-3), 118.70 (Ar-CH-8), 123.64 (Ar-CH-6), 125.17 (Cq-4a), 125.40 (Ar-CH-5), 131.85 (Ar-CH-7), 140.86 (Cq-8a), 155.47 (Cq-2), 179.06 (Cq-4).

LC-UV/MS: 328.2 g/mol

(E)-ethyl (2-(oct-2-en-1-yl)quinolin-4-yl) carbonate (16a)Chemical Formula: C₂₀H₂₅NO₃

Molecular Weight: 327,42 g/mol



In a 50 mL round-bottom flask, **1c** (0.397 g, 1.55 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous THF (10 mL). The tBuOK (0.217 g, 1.94 mmol, 1.25 eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. Further, the ethyl chloroformate (0.319 mL, 3.34 mmol, 2.15 eq.) was slowly added to the solution and the reaction was quenched after 30 min with 7 mL of water. THF was evaporated and the residue was diluted with more 7 mL of water. Extractions with EtOAc (3x 30 mL) were done, the combined organic phases were concentrated under reduced pressure. The final crude was purified by flash chromatography with EtOAc (100 %). R_f=0.95. The final product **16a** was obtained as an oil with 78% yield. (342 mg, yellow oil).

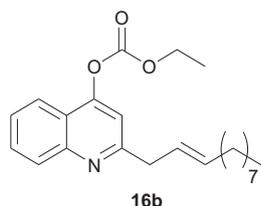
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H5), 7.99 (m, 1H, Ar-H8), 7.71 (ddd, *J* = 8.6, 7.9, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H6), 7.33 (s, 1H, Ar-H3), 5.75 – 5.56 (m, 2H, 2x alkenyl-H), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-18), 3.71 (dd, *J* = 6.5, 1.1 Hz, 2H, CH₂-9), 2.05 (m, 2H, CH₂-12), 1.39 – 1.19 (m, 12H, CH₂-13-15), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 14.15 (CH₃), 14.20 (CH₃-17), 22.67 (CH₂-15), 29.13 (CH₂-14), 31.55 (CH₂-13), 32.72 (CH₂-12), 42.95 (CH₂-9), 65.62 (CH₂-17), 112.02 (Ar-CH-8), 120.72 (Cq-4a), 121.10 (Ar-CH-6), 126.28 (CH-alkenyl), 129.00 (Ar-CH-5), 130.25 (Ar-CH-7), 134.32 (CH-alkenyl), 149.58 (Cq-8a), 152.48 (Cq-2), 154.57 (Cq-CO), 162.61 (Cq-4).

LC-UV/MS: 328.8 g/mol

(E)-ethyl (2-(undec-2-en-1-yl)quinolin-4-yl) carbonate (16b)Chemical Formula: C₂₃H₃₁NO₃

Molecular Weight: 369,50 g/mol



In a 50 mL round-bottom flask, compound **1f** (0.385 g, 1.295 mmol, 1 eq.) was introduced, then anhydrous THF (10 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature. The tBuOK (0.1830 g, 1.63 mmol, 1.25 eq.) was added and the reaction was led at room temperature for 1 h. Further, the ethyl chloroformate (0.27 mL, 2.83 mmol, 2.15 eq.) was slowly added to the solution and the reaction was quenched after 30 min with water (10 mL). THF was evaporated and the residue was diluted with 10 mL of water was added and extractions with EtOAc (3x 30 mL) were done. The combined organic phases were filtered over PS filter and concentrated under reduced pressure. The crude was, then, purified by flash chromatography with EtOAc (100 %). R_f=0.95. The final product (**16b**) was obtained as a pale-yellow oil with 67% yield (323 mg).

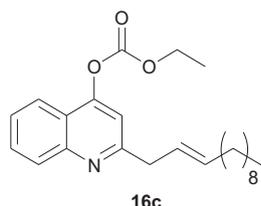
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H5), 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H8), 7.80 (m, 1H, Ar-H7), 7.62 (m, 1H, Ar-H6), 7.43 (s, 1H, Ar-H3), 5.70 (dt, *J* = 13.8, 6.7 Hz, 1H, alkenyl-H), 5.61 (dt, *J* = 15.0, 6.6 Hz, 1H, alkenyl-H), 4.35 (m, 2H, CH₂-20), 3.65 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂-9), 2.00 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-12), 1.41 - 1.15 (m, 15H, CH₂-13-18, CH₃-21), 0.83 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.38 (CH₃), 14.41 (CH₃-21), 22.53 (CH₂-18), 28.95 (CH₂-17), 29.13 (CH₂-16), 29.19 (CH₂-15), 29.27 (CH₂-14), 31.71 (CH₂-13), 32.39 (CH₂-12), 42.27 (CH₂-9), 65.93 (CH₂-20), 113.05 (Ar-CH-3), 120.61 (Cq-4a), 121.26 (Ar-CH-8), 127.11 (Ar-CH-6), 127.13 (alkenyl-CH), 129.04 (Ar-CH-5), 130.83 (Ar-CH-7), 133.47 (alkenyl-CH), 149.30 (Cq-8a), 152.31 (Cq-2), 154.33 (Cq-CO), 162.65 (Cq-4).

LC-UV/MS: 370.2 g/mol

(E)-2-(dodec-2-en-1-yl)quinolin-4-yl ethyl carbonate (16c)Chemical Formula: C₂₄H₃₃NO₃

Molecular Weight: 383,53 g/mol



In a 50 mL round-bottom flask, **1g** (0.410 g, 1.31 mmol, 1 eq.) was introduced, then anhydrous THF (10 mL) was added and the mixture was magnetic stirred. The tBuOK (0.184 g, 1.64 mmol, 1.25 eq.) was added and the reaction was led at room temperature for 1 h. Further, the ethyl chloroformate (0.702, 2.81 mmol, 2.15 eq.) was slowly added to the solution and the reaction was stopped after 30 min with (10 mL) of water. THF was evaporated and supplementary 10 mL more of water was added. Extractions with EtOAc (3x 30 mL) were done, the organic phases were concentrated under vacuum and final crude was purified by flash chromatography with EtOAc (100 %). R_f=0.95. The final product **16c** was obtained as an oil with 78% yield (393 mg, yellow oil).

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.03 – 7.99 (m, 2H, Ar-H5-7), 7.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H8), 7.59 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-H6), 7.44 (s, 1H, Ar-H3), 5.76 – 5.57 (m, 2H, 2x alkenyl-H), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-21), 3.67 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, CH₂-9), 2.05 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-12), 1.51 – 1.13 (m, 17H, CH₂-13-19, CH₃-22), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

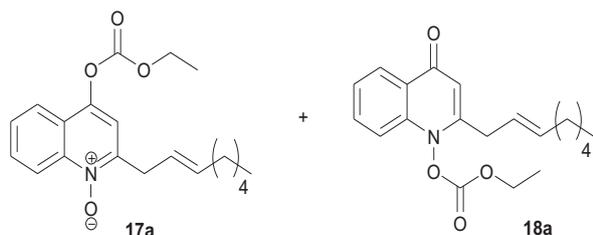
¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 14.45 (CH₃), 14.46 (CH₃-22), 23.71 (CH₂-19), 30.16 (CH₂-18), 30.37 (CH₂-17), 30.43 (CH₂-16), 30.57 (CH₂-15), 30.70 (CH₂-14), 33.04 (CH₂-13), 33.58 (CH₂-12), 43.04 (CH₂-9), 66.75 (CH₂-21), 113.43 (Ar-CH-3), 121.92 (Cq-4a), 122.15 (Ar-CH-8), 127.34 (Ar-CH-6), 127.84 (CH-alkenyl), 128.74 (Ar-CH-5), 131.77 (Ar-CH-7), 135.38 (CH-alkenyl), 150.13 (Cq-8a), 153.53 (Cq-2), 156.40 (Cq-OCO), 164.12 (Cq-4).

LC-UV/MS: 384.3 g/mol

(E)-4-((ethoxycarbonyloxy)-2-(oct-2-en-1-yl)quinoline 1-oxide + (E)-methyl (2-(oct-2-en-1-yl)-4-oxoquinolin-1(4H)-yl) carbonate (17a/18a ratio: 91/9 w/w)

Chemical Formula: C₂₀H₂₅NO₄

Molecular Weight: 343,42 g/mol



In a 50 mL round-bottom flask, compound **16a** (0.140 g, 0.49 mmol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (11.3 mL) at 0 °C. After few seconds, newly opened MCPBA (70-75% w/w, 0.126 g, 0.73 mmol, 1.5 eq.) was added to the solution and the mixture was stirred at 0 °C for 3h. The reaction was stopped with Na₂CO₃ (0.5 M, 2x 15 mL) and with H₂O (1x 15 mL). Combined organic phases were dried by filtration on PS filter and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by EtOAc: Cyclohexane (60:40). The corresponding *N*-oxide **17a** was isolated as a pale-yellow oil (R_f= 0.52) Yield 20%, 30 mg.

NMR spectra, showing the mixture of **17a/18b** are shown in the main text.(c.f. Ch 3, page 137)
¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 8.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H5-**17a**), 8.26 (m, 1H, H5-**18a**) 8.10 (dd, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 1H, H7-**17a**), 7.95 (ddd, *J* = 8.6, 7.0, 1.3 Hz, 1H, H8-**17a**), 7.78 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.1 Hz, 1H, H6-**17a**), 7.49 (m, 1H, H6-**18a**), 7.61 (s, 1H, **17a**), 6.15 (s, 1H, **18a**) 5.88 – 5.64 (m, 2H, **17a**), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.85 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.11 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.49 – 1.22 (m, 12H), 0.95 – 0.81 (m, 4H, **17a-18a**).

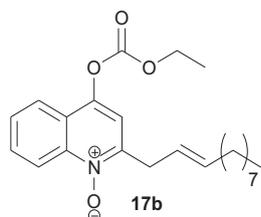
¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 14.39 (CH₃-**17a**), 14.41 (CH₃-18-**17a**), 14.47 (CH₂-**18a**), 23.57(CH₂-**17a**), 27.98 (CH₂-**18a**), 29.93 (CH₂-**18a**), 30.00 (CH₂-**17a**), 32.53 (CH₂-**17a-18a**), 33.60 (CH₂-**17a**), 34.87(CH₂-**18a**), 35.47 (CH₂-**17a**), 67.08 (CH₂-**17a**), 69.54 (CH₂-**18a**), 108.94 (CH-**18a**), 114.17 (CH-**18a**), 114.57 (CH-**17a**), 120.29 (CH-**17a**), 123.36 (CH-**17a**), 123.62 (CH-**18a**), 123.67 (CH-**17a**), 124.01 (Cq-**17a**), 125.94 (CH-**18a**), 126.95 (CH-**18a**), 129.98 (CH-**17a**), 133.21 (CH-**17a**), 134.80 (CH-**18a**), 137.60 (CH-**17a**), 140.51(Cq-**18a**), 142.86 (Cq-**17a**), 147.97

(Cq-**17a**), 151.80 (Cq-**17a**), 153.42 (Cq-**17a**), 153.98 (Cq-**18a**), 154.20 (Cq-**18a**), 172.95 (Cq-**17a**), 179.34(Cq-**18a**).

LC-UV/MS: 345.9 g/mol

(E)-4-((ethoxycarbonyl)oxy)-2-(undec-2-en-1-yl)quinoline 1-oxide (17b)Chemical Formula: C₂₃H₃₁NO₄

Molecular Weight: 385,50 g/mol



In a 50 mL round-bottom flask, compound **16b** (0.308 g, 0.83 mmol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (11.3 mL) at 0 °C. After few seconds, newly opened MCPBA (70-75%) (0.158 g, 0.91 mmol, 1.1 eq.) was added to the solution and the mixture was stirred at 0 °C for 3h. The reaction was stopped with Na₂CO₃ (0.5 M, 2x 15 mL) and with H₂O (1x 15 mL). Combined organic phases were dried by filtration on PS filter and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by EtOAc (100%). The corresponding *N*-oxide **17b** was isolated as a pale-yellow oil (R_f= 0.66) (26%, 83 mg)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, Ar-H5), 7.77 (ddd, *J* = 8.6, 7.1, 1.5 Hz, 1H, Ar-H8), 7.50 – 7.35 (m, 2H, Ar-H7-6), 5.99 (s, 1H, Ar-H3), 5.67 (m, 1H, alkenyl-H), 5.49 (dt, *J* = 15.2, 6.7 Hz, 1H, alkenyl-H), 4.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-20), 3.38 (m, 2H, CH₂-9), 2.02 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂-12), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H, 2x CH₂-13-14), 1.28 – 1.17 (m, 11H, 4x CH₂, CH₃-21), 0.88 – 0.77 (m, 3H).

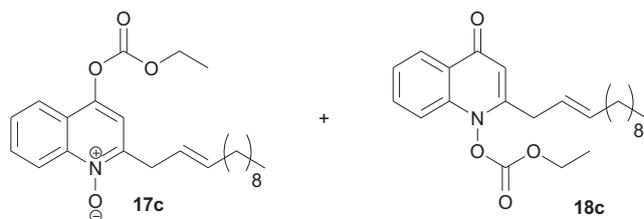
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.84 (CH₃), 13.91 (CH₃-21), 22.06 (CH₂-18), 28.48 (CH₂-17), 28.51 (CH₂-16), 28.64 (CH₂-15), 28.77 (CH₂-14), 31.23 (CH₂-13), 31.73 (CH₂-12), 33.23 (CH₂-9), 68.11 (CH₂-20), 107.80 (Ar-CH-3), 112.97 (Ar-CH-8), 123.03 (Ar-CH-6), 124.24 (alkenyl-CH), 124.32 (Cq-4a), 125.59 (Ar-CH-5), 133.22 (Ar-CH-7), 135.12 (alkenyl-CH), 138.86 (Cq-8a), 151.28 (Cq-2), 152.37 (Cq-CO), 175.58 (Cq-4).

LC-UV/MS: 386.3 g/mol

(E)-2-(dodec-2-en-1-yl)-4-((ethoxycarbonyl)oxy)quinoline 1-oxide + (E)-2-(dodec-2-en-1-yl)-4-oxoquinolin-1(4H)-yl ethyl carbonate (17c/18c ratio: 38/62 w/w)

Chemical Formula: C₂₃H₃₁NO₄

Molecular Weight: 399,50 g/mol



In a 25 round-bottom flask, compound **16c** (0.90 mg, 0.23 mmol, 1 eq.) was introduced and the solvent (3 mL) was added. After few seconds, purified MCPBA (90% w/w, 0.322 mg, 1.4 eq.) was added to the solution. The reaction was firstly followed by TLC and it was stopped after 3h. The solvent was evaporated under vacuum and crude product was purified by EtOAc (100%). Two products **17c** et **18c** were isolated corresponding to two structural isomers (Rf 0.83 or 0.66). (23 mg, 25%)

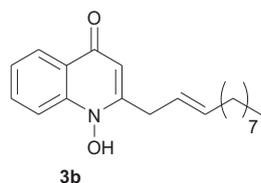
¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 8.25 (m, 1H, Ar-H5-**18c**), 8.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H7-**18c**), 8.11 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar-H7-**17c**), 7.80 (m, 1H, Ar-H8-**18c**), 7.68 (dd, J = 17.9, 8.0 Hz, 1H, Ar-H8-**17c**), 7.51 (m, 1H, Ar-H6-**18c**), 7.40 (m, 1H, Ar-H6-**18c**), 6.35 (s, 1H, Ar-H3-**18c**), 5.77-5.61 (m, 2H), 4.21 (qd, J = 7.0, 2.0 Hz, 2H), 3.65 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.09 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 1.46 – 1.19 (m, 28H, 14xCH₂-**17c/18c**), 0.93 – 0.83 (m, 6H, 2xCH₃-**17c/18c**).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 14.43 (CH₃-**18c**), 14.52 (CH₃-**18c**), 23.72 (CH₂-**18c**), 29.66 (CH₂-**17c**), 30.06 (CH₂-**17c**), 30.28 (CH₂-**18c**), 30.35 (CH₂-**18c**), 30.37 (CH₂-**17c**), 30.44 (CH₂-**18c**), 30.59 (CH₂-**18c**), 30.65 (CH₂-**17c**), 30.69 (CH₂-**18c**), 33.02 (CH₂-**17c**), 33.05 (CH₂-**18c**), 33.16 (CH₂-**17c**), 33.60 (CH₂-**18c**), 35.32 (CH₂-**18c**), 65.69 (CH₂-**18c**), 107.23 (CH-**18c**), 116.90 (CH-**18c**), 119.49 (CH-**17c**), 124.50, (CH-**18c**) 126.09 (CH-**18c**), 133.69 (CH-**18c**), 133.84 (CH-**17c**), 134.99 (Cq-**18a**), 136.92 (CH-**18c**), 139.74 (CH-**18c**), 141.92 (Cq-**18c**), 155.14 (Cq-**18c**), 155.38 (Cq-**18c**), 172.33 (Cq-**17c**), 180.83 (Cq-**18c**).

LC-UV/MS: 400.3 g/mol

(E)-1-hydroxy-2-(undec-2-en-1-yl)quinolin-4(1H)-one (3b)Chemical Formula: C₂₀H₂₇NO₂

Molecular Weight: 313,44 g/mol



In a 25 mL round-bottom flask, compound **17b** (83 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) was dissolved in ethanol (2.8 ml). 17 eq. of an aqueous solution of KOH (5M) was added to the reaction mixture and it was stirred for 1h at room temperature. The reaction was quenched with 10 mL of water and some drops of HCl (conc.), until pH 1-2, consequently a milky suspension is formed. Normally, the final product **3c** should be recovered by filtration, in this case suspension was filtered and washed with distilled water. The filtered product was dissolved with dichloromethane in order to recover it. White solid. (62 mg, 95%)

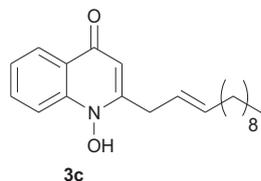
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.68 (s, 1H, N-OH), 8.11 - 8.05 (dd, J = 17.7, 7.9 Hz, 2H, Ar-5-8), 7.58 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.33 (t, J = 7.2 Hz, 1H, Ar-H6), 6.54 (s, 1H, Ar-H3), 5.53 (ddt, J = 41.4, 14.9, 6.3 Hz, 2H, 2x alkenyl-H), 3.57 (d, J = 5.7 Hz, 2H, CH₂-9), 1.95 (q, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-13), 1.41 – 0.98 (m, 12H, CH₂-14-18), 0.84 (t, J = 6.9 Hz, 4H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 14.24 (CH₃), 22.80 (CH₂-18), 29.42 (CH₂-17), 29.43 (CH₂-16), 29.45 (CH₂-15), 29.59 (CH₂-14), 32.02 (CH₂-13), 32.73 (CH₂-12), 34.93 (CH₂-9), 105.42 (Ar-CH-3), 116.70 (Ar-CH-8), 122.33 (Ar-CH-6), 122.93 (Cq-4a), 124.65 (alkenyl-CH), 125.56 (Ar-CH-5), 132.76 (Ar-CH-7), 136.60 (alkenyl-CH), 140.36 (Cq-8a), 155.19 (Cq-2). Carbon 4 signal was not observed.

LC-UV/MS: 314.2 g/mol

(E)-2-(dodec-2-en-1-yl)-1-hydroxyquinolin-4(1H)-one (3c)Chemical Formula: C₂₀H₂₉NO₂

Molecular Weight: 327,44 g/mol



In a 25 mL round-bottom flask, the mixture **17c/18c** (35 mg, 0.087 mmol, 1 eq.) was dissolved in ethanol (1.2 ml). 17 eq. of an aqueous solution of KOH (5M) was added to the reaction mixture and it was stirred for 1h at room temperature. The reaction was quenched with 6 mL of water and some drops of HCl (conc.), until pH 1-2, consequently a milky suspension is formed. Normally, the final product **3c** should be recovered by filtration, in this case suspension was filtered and washed with distilled water. The filtered product was dissolved with dichloromethane in order to recover it. White solid. (15 mg, 53%)

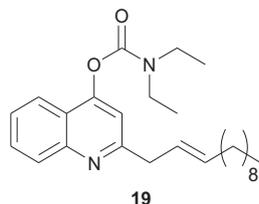
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.15 – 7.92 (m, 2H, Ar-H5-7), 7.60 (m, 1H, Ar-H8), 7.31 (m, 1H, Ar-H6), 6.51 (s, 1H, Ar-H3), 5.51 (m, 2H, 2x alkenyl-H), 3.53 (m, 2H, CH₂-9), 1.95 (q, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-12), 1.50 – 1.05 (m, 14H, CH₂-13-19), 0.86 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 14.26 (CH₃), 22.82 (CH₂-19), 29.33 (CH₂-18), 29.45 (CH₂-17), 29.65 (CH₂-16), 29.74 (CH₂-15), 29.85 (CH₂-14), 32.05 (CH₂-13), 32.74 (CH₂-12), 34.95 (CH₂-9), 105.29 (Ar-CH-3), 116.72 (Ar-CH-8), 122.13 (Ar-CH-6), 122.60 (Cq-4a), 124.52 (CH-alkenyl), 125.69 (Ar-CH-5), 132.95 (Ar-CH-7), 136.77 (CH-alkenyl), 140.24 (Cq-8a), 155.51 (Cq-2), 171.32 (Cq-4).

HRMS (ESI) : calcd. For C₂₁H₃₀NO₂: 328.2271 found [M+H]⁺: 328.2276

(E)-2-(dodec-2-en-1-yl)quinolin-4-yl diethylcarbamate (19)Chemical Formula: C₂₆H₃₈N₂O₂

Molecular Weight: 410,60 g/mol



In a 50 mL round-bottom flask, **1g** (0.272 g, 0.87 mmol, 1 eq.) was introduced, then anhydrous THF (8 mL) was added and the mixture was magnetic stirred. The tBuOK (0.122 g, 1.09 mmol, 1.25 eq.) was added and the reaction was led at room temperature for 1 h. Further, the diethylcarbamyl chloride (0.164 mL, 1.30 mmol, 1.5 eq.) was slowly added to the solution and the reaction was led to react overnight. Reaction was stopped with 10 mL of water. THF was evaporated and supplementary 10 mL of water was added. Extractions with EtOAc (3x 40 mL) were done, the organic phases were concentrated under vacuum and final crude was purified by flash chromatography with EtOAc (100 %). R_f= 0.95. Yellow oil, 160 mg, 44%.

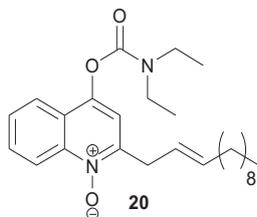
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H5), 7.77 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.57 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H, Ar-H3), 5.78 – 5.60 (m, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.59 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-9), 2.04 (q, *J* = 6.1, 5.4 Hz, 2H, CH₂-12), 1.44 – 1.13 (m, 23H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.42 (CH₃), 14.26 (CH₃), 14.62 (CH₃), 22.82, 29.35, 29.38, 29.48, 29.65, 29.71, 32.04, 32.75, 42.53, 42.88, 112.07, 121.37, 121.44, 125.31, 126.88, 131.16, 135.20, 140.90, 145.44, 152.30, 162.18, 181.74.

LC-UV/MS: 411.3 g/mol

(E)-4-((diethylcarbamoyl)oxy)-2-(undec-2-en-1-yl)quinoline 1-oxide (20)Chemical Formula: C₂₅H₃₆N₂O₃

Molecular Weight: 426,60 g/mol



In a 25 round-bottom flask, compound **19** (0.107 g, 0.260 mmol, 1 eq.) was introduced and acetic acid (3 mL) was added. After few seconds, purified MCPBA (90% w/w, 0.090 g, 0.521 mmol, 2 eq.) was added to the solution. The reaction was firstly followed by TLC and it was stopped after 3h. The solvent was evaporated under vacuum and crude product was purified (R_f 0.56) by EtOAc: Cyclohexane (60:40). (13 mg, Yield 11%)

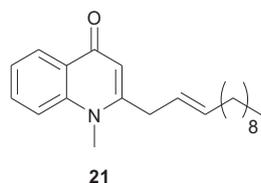
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.95 (m, 2H, Ar-H5-7), 7.90 – 7.70 (m, 1H, Ar-H8), 7.58 (m, Ar-H6), 7.45 (s, 1H, Ar-H3), 5.80 – 5.64 (m, 2H, alkenyl-H), 3.84 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.59 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.10 (m, 2H, CH₂), 1.82 – 1.03 (m, 28H, CH₂-11-21, CH₃-22-23), 0.88 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.46 (CH₃), 14.27 (CH₃-22), 14.61 (CH₃-23), 22.84 (CH₂-19), 29.39 (CH₂), 29.41 (CH₂), 29.50 (CH₂), 29.66 (CH₂), 29.72 (CH₂), 32.05 (CH₂), 32.79 (CH₂), 34.86 (CH₂), 42.39 (CH₂), 42.81 (CH₂), 113.77 (Ar-CH), 120.37 (Ar-CH), 127.99 (CH-alkenyl), 130.52 (Ar-CH), 131.09 (Ar-CH), 133.17 (Cq), 133.69 (Ar-CH), 135.45 (CH-alkenyl), 142.73 (Cq), 157.07 (Cq), 158.58 (Cq), 168.62 (Cq).

LC-UV/MS: 427.9 g/mol

(E)-2-(dodec-2-en-1-yl)-1-methylquinolin-4(1H)-one (21)Chemical Formula: C₂₂H₃₁NO

Molecular Weight: 325,49 g/mol



In a 30 mL-microwave reactor **5g** (172 mg, 0.61 mmol, 1.1 eq.) was, firstly, introduced; then **22** (114 mg, 0.54 mmol, 1 eq.) was added and consequently the dioxane (5.4 mL) and the two-molar solution of Na₂CO₃ (5.4 mL). Then, the catalyst (63 mg, 0.055 mmol, 0.1 eq.) was added to the mixture. Reaction was led in a microwave synthesizer at 120 °C for 1 h. Once reaction was over the reaction mix was filtered onto celite® which was washed with EtOAc (3x 5 mL). The reaction mixture was, subsequently, washed with brine (3x 15 mL), the organic phase separated and dried over MgSO₄. The crude product was recovered after evaporated under reduced pressure. The final product **21** was obtained after flash chromatography with dichloromethane: methanol (97:3) and evaporation under reduced pressure. (Oily-solid, 33%, 0.060 g)

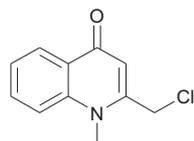
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.45 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, Ar-H5), 7.65 (ddd, J = 8.7, 7.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-H8), 7.49 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar-H7), 7.37 (ddd, J = 7.9, 7.1, 0.9 Hz, 1H, Ar-H6), 6.25 (s, 1H, Ar-H3), 5.68 – 5.42 (m, 2H, 2x alkenyl-H), 3.71 (s, 3H, CH₃-21), 3.42 (d, J = 4.2 Hz, 2H, CH₂-9), 2.03 (q, J = 6.1, 5.5 Hz, 2H, CH₂-12), 1.44 – 1.16 (m, 14H, CH₂-13-19), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃-20).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 14.25 (CH₃-20), 22.81 (CH₂-9), 29.29 (CH₂-19), 29.33 (CH₂-18), 29.44 (CH₂-17), 29.58 (CH₂-16), 29.68 (CH₂-15), 32.01 (CH₂-14), 32.71 (CH₂-13), 34.46 (CH₂-12), 38.04 (CH₃-21), 111.95 (Ar-CH-3), 115.40 (Ar-CH-8), 123.44 (Ar-CH-6), 123.88 (alkenyl-CH), 126.75 (Ar-CH-5), 126.84 (Cq-4a), 132.17 (Ar-CH-7), 135.48 (alkenyl-CH), 142.11 (Cq-8a), 153.19 (Cq-2), 178.08 (Cq-4).

LC-UV/MS: 326.2 g/mol

2-(chloromethyl)-1-methylquinolin-4(1H)-one (22)Chemical Formula: C₁₁H₁₀ClNO

Molecular Weight: 207,65 g/mol



22

In a 25 mL round-bottom flask, **4a** (0.100 g, 0.51 mmol, 1 eq.) was suspended in THF (5 mL). The suspension was cooled down to 0 °C and *n*-BuLi (2.5 M in hexane) was added (0.20 mL, 0.5 mmol, 0.97 eq.) drop-by-drop. After 45 minutes, dimethyl sulfate (0.060 mL, 0.63 mmol, 1.2 eq) was added. The reaction mixture was led to heat to room temperature and overnight under magnetic agitation. The work-up was done by adding liquid ammonia (5 mL) for 15 minutes. Reaction mixture was extracted with AcOEt, and washings with H₂O were also done. The combined organic phases were dried over MgSO₄. The crude product was purified by flash chromatography with dichloromethane: methanol (95:5).

Pale-yellow oil (37%, 0.040 g)

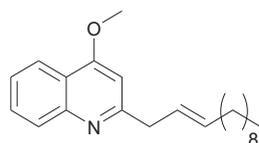
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.37 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-H5), 7.65 (ddd, *J* = 8.7, 7.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-H7), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H8), 7.35 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 0.9 Hz, 1H, Ar-H6), 6.26 (s, 1H, Ar-H3), 4.50 (s, 2H, CH₂), 3.78 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 34.65 (CH₃), 43.90 (CH₂), 112.67 (Ar-CH-3), 115.68 (Ar-CH-8), 123.86 (Ar-CH-6), 126.57 (Ar-CH-5), 126.83 (Cq-4a), 132.79 (Ar-CH-7), 142.02 (Cq-8a), 148.03 (Cq-2), 178.06 (Cq-4).

LC-UV/MS: 208.4 g/mol

(E)-2-(dodec-2-en-1-yl)-4-methoxyquinoline (23)Chemical Formula: C₂₂H₃₁NO

Molecular Weight: 325,49 g/mol



23

In a 25 ml round bottom **1g** (0.426 g, 1.37 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetone (8 mL). K₂CO₃ (0.568 g, 4.11 mmol, 3 eq.) was added to the solution and after few minutes iodomethane (0.255 mL, 4.11 mmol, 3 eq) was added. The reaction was heated to reflux temperature (79 °C) overnight. Then, the reaction mixture was quenched with H₂O (15 mL). The aqueous phase was extracted with AcOEt (2x20 mL). The combined organic phases were dried over MgSO₄, and it was evaporated under reduced pressure. The final product **23** was obtained after flash chromatography with AcOEt : Cyclohexane (20:80)

Pale yellow oil (30%, 135 mg)

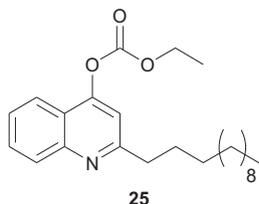
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.13 (m, 1H, Ar-H5), 7.97 (dt, J = 8.4, 0.6 Hz, 1H, Ar-H8), 7.65 (ddd, J = 8.4, 6.9, 1.5 Hz, 1H, Ar-H7), 7.43 (ddd, J = 8.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H, Ar-H6), 6.65 (s, 1H, Ar-H3), 5.76 – 5.60 (m, 2H, 2x alkenyl-H), 4.04 (s, 3H, CH₃-21), 3.65 (d, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂-9), 2.06 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-12), 1.43 – 1.20 (m, 14H, CH₂-13-19), 0.91 – 0.84 (m, 3H, CH₃-20).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 14.25 (CH₃-20), 22.80 (CH₃-19), 29.33 (CH₂-18), 29.47 (CH₂-17), 29.51 (CH₂-16), 29.66 (CH₂-15), 29.74 (CH₂-14), 32.03 (CH₂-13), 32.74 (CH₂-12), 43.34 (CH₂-9), 55.65 (CH₂-21), 99.85 (Ar-CH-3), 120.23 (Cq-4a), 121.73 (Ar-CH-8), 125.07 (Ar-CH-6), 127.01 (alkenyl-CH), 128.39 (Ar-CH-5), 129.86 (Ar-CH-7), 133.76 (alkenyl-CH), 148.80 (Cq-8a), 162.61 (Cq-2), 162.74 (Cq-4).

LC-UV/MS: 326.3 g/mol

2-dodecylquinolin-4-yl ethyl carbonate (25)Chemical Formula: C₂₄H₃₅NO₃

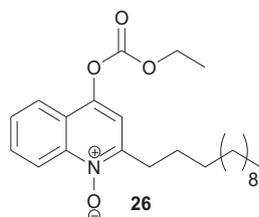
Molecular Weight: 385,54 g/mol



In a 50 mL round-bottom flask, compound **2g** (0.230 g, 0.73 mmol, 1 eq.) was suspended in anhydrous THF (6 mL). The tBuOK (0.102 g, 0.91 mmol, 1.25 eq.) was added and the resulting suspension was stirred at room temperature for 1 h. Further, the ethyl chloroformate (0.343 mL, 1.56 mmol, 2.15 eq.) was slowly added to the solution and the reaction was quenched after 30 min with 7 mL of water. THF was evaporated and the residue was diluted with more 7 mL of water. Extractions with EtOAc (3x 30 mL) were done, the combined organic phases were concentrated under reduced pressure. The final crude was purified by flash chromatography with EtOAc (100 %). R_f=0.95. The final product **25** was obtained as an oil with 55% yield (157 mg, yellow oil).

2-dodecyl-4-((ethoxycarbonyl)oxy)quinoline 1-oxide (26)Chemical Formula: C₂₄H₃₅NO₄

Molecular Weight: 401,54 g/mol



In a 25 mL round-bottom flask, compound **25** (0.154 g, 0.4 mmol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (6 mL) at 0 °C. After few seconds, purified MCPBA (90% w/w, 0.076 g, 0.44 mmol, 1.1 eq.) was added to the solution and the mixture was stirred at 0 °C for 3h. The reaction was stopped with Na₂CO₃ (0.5 M, 2x 15 mL) and with H₂O (1x 15 mL). Combined organic phases were dried by filtration on PS filter and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by EtOAc (100%). The corresponding *N*-oxide **26** was isolated as a pale-yellow oil (R_f= 0.66) (Yield 34%, 54 mg)

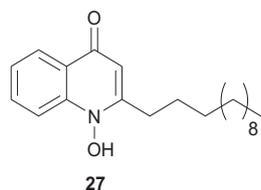
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.35 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.65 (ddd, J = 8.6, 7.1, 1.5 Hz, 1H), 7.37 (ddd, J = 8.1, 7.2, 0.9 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.47 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.66 – 2.48 (m, 2H), 1.77 – 1.61 (m, 2H), 1.48 – 1.20 (m, 28H), 0.91 – 0.84 (m, 4H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 14.25, 14.32, 22.82, 27.45, 29.23, 29.37, 29.47, 29.57, 29.72, 29.75, 29.76, 30.87, 32.04, 68.05, 108.58, 112.36, 124.33, 125.15, 126.83, 132.92, 139.33, 152.41, 153.21, 177.51.

LC-UV/MS: 402.3 g/mol

2-dodecyl-1-hydroxyquinolin-4(1H)-one (27)Chemical Formula: C₂₁H₃₁NO₂

Molecular Weight: 329,48 g/mol



In a 25 mL round-bottom flask, compound **26** (54 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) was dissolved in ethanol (2 ml). 17 eq. of an aqueous solution of KOH (5M) was added to the reaction mixture and it was stirred for 1h at room temperature. The reaction was quenched with 5 mL of water and some drops of HCl (conc.), until pH 1-2, consequently a milky suspension is formed. Normally, the final product was recovered by filtration, and it was washed with distilled water. The filtered product **27** was dissolved with dichloromethane in order to recover it.

White solid (21 mg, 49%)

LC-UV/MS: 330.3 g/mol

Experimental biological section

General information

Sa strains:

Strain *Sa* ATCC 29213 was purchased from the ATCC: The Global Bioresource Center and stocked at -80°C in LB + 20 % Glycerol. The 3 clinical strains were originally isolated by the Institute for Infectious Agents from sputum samples of patients followed in the two CF Centers of Lyon (Hospices civils de Lyon, France). In the following table, we describe the *Sa* clinical strains according to the lungs' status regarding to *Sa* and *Pa* colonization.

Table G Selected *Sa* clinical strains for biological evaluation

Code	<i>Sa</i> status	Presence/absence of <i>Pa</i>
<i>Sa</i> MiSt	First colonization	Absent
<i>Sa</i> BeSi	Chronic colonization	Absent
<i>Sa</i> CoSo	Chronic colonization	Chronic colonization

Before used, all the strains were stocked in LB broth + 20% of glycerol at -20 °C.

Initial screening

All molecules, including intermediates, were solubilized in Dimethyl sulfoxide (DMSO, HPLC grade 99.9+% under Argon, Fisher Scientific[®]) at the concentration of 10 µM. Each sample was diluted to concentration of DMSO under 3 % (C₀) with Mueller-Hinton II (MH II). Then C₀ was diluted twice 10-fold to obtain two additional concentrations (C₁ and C₂).

From overnight cultures on LB Petri dishes at 37°C, each *Sa* strain was suspended in saline solution. Turbidity was measured in order to obtain 0.5 McFarland. With a sterile swab, each *Sa* suspension was spread uniformly onto MH II plates. Five µL of each molecule at the 3 concentrations (C₀, C₁ and C₂) were added onto bacterial lawn. The plates were incubated 24h at 37°C. Molecules having anti-*Sa* activity were characterized by inducing an inhibition halo of *S. aureus* growth.

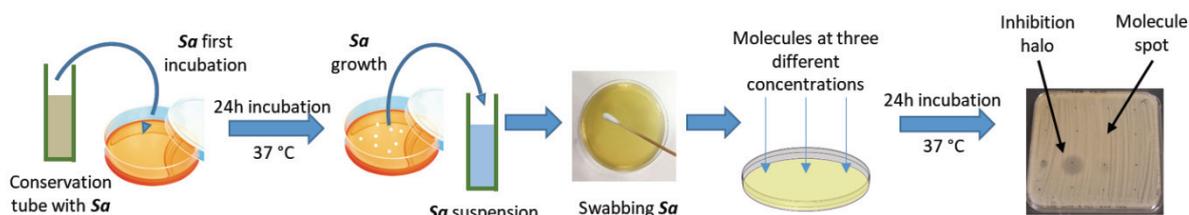


Figure C Screening of the molecules regarding to their anti-*Sa* activity

MICs evaluation

After the first screening, the bacterial susceptibility was assessed by the determination of antimicrobial MIC values. The broth microdilution method was used according to the methodologies of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM), using MH II.

Selected molecules from the initial screening test were diluted with MH II to obtain concentrations ranging between 32 $\mu\text{g/ml}$ and 0.25 $\mu\text{g/ml}$. One hundred μL of each solution were introduced on a 96-well microtiter plates. From overnight cultures on LB Petri dishes at 37°C, each *Sa* strain was suspended in saline solution. Turbidity was measured in order to obtain 0.8 McFarland. A 100-fold dilution was then achieved to obtain bacterial suspensions containing 10^6 UFC/ml. One hundred μL of this final suspension were added to the molecule in the 96-well microtiter plates. Molecules final concentration was ranging between 16 $\mu\text{g/ml}$ and 0.125 μg . After 24h of incubation at 37 °C, activity was quantified for each molecule. The MIC was the lowest concentration that showed no visible growth after incubation. Experiments were performed in triplicate.

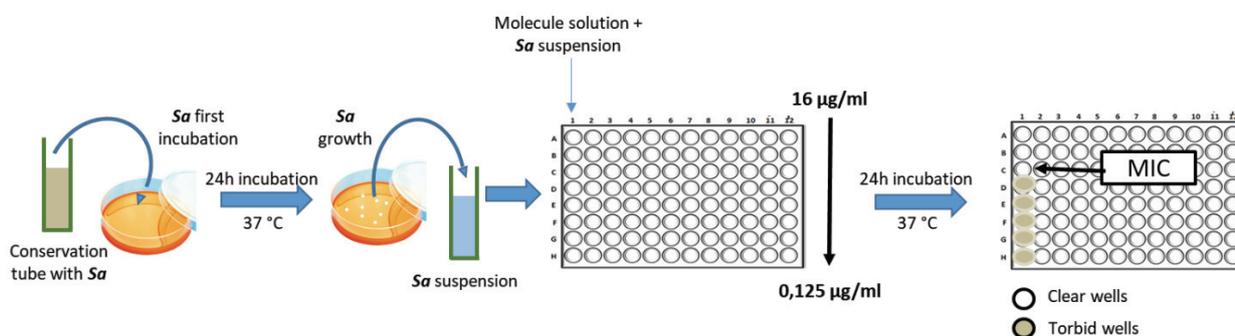


Figure D MIC evaluation



ANNEXE

ANNEXE

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY INFORMATION FOR

Solvent- and metal-free hydroboration of alkynes under microwave irradiation

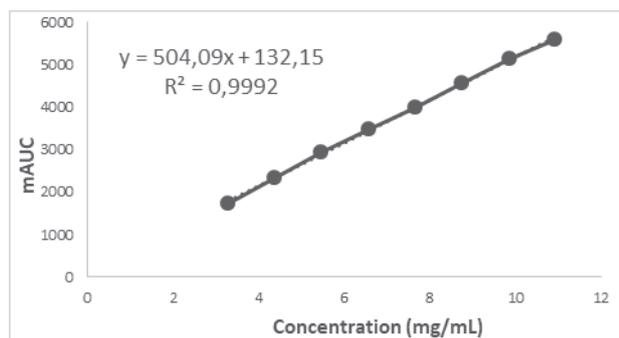
Bruna Gioia,^a Alexandre Arnaud^a, Sylvie Radix^a, Nadia Walchshofer^a, Anne Doléans-Jordheim^b, Luc Rocheblave^{a*}

a) Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISPB-Faculté de Pharmacie, EA 4446, B2MC, F-69373, Lyon Cedex 08, France

b) Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, VetAgro Sup, UMR CNRS 5557, Ecologie Microbienne, F-69622, Villeurbanne, France; Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon (HCL), F-69000, Bron, France

1. Calibration curve

In order to find the best conditions of reaction we decided to calculate yields using a LC/UV method. Firstly, a calibration curve was made, linearity ($R^2 = 0.9992$) and repeatability (coefficient of variation 0,02%) were verified. An exact mass of commercial (E)-2-styrylboronic acid pinacol ester (**2a**) ester was weighed to make a stock solution (50 mg/mL). Afterward, progressive dilutions were done using Optima HPLC grade acetonitrile. One mL of each solution was then analyzed through LC/UV method and the calibration curve was established based on the AUC data at 254 nm. The retention time was 1.55 min and an isocratic mode with acetonitrile : water (60:40) was used.



2. Experimental section

2.1. General information

Microwave reactions were performed in an Anton Paar Monowave 300 synthesizer. Liquid chromatography (LC) analyses were performed using an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) Agilent 1290 Infinity system (Agilent Technologies). Chromatographic separations were performed on a reversed phase column Poroshell 120 SB-C18 Agilent (50 mm x 2.1 mm; 2.7 μm). ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker DRX400 Fourier transform NMR spectrometer, operating at 400 MHz and using an internal deuterium lock. ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker DRX400 Fourier transform NMR spectrometer operating at 100 MHz and using an internal deuterium lock. The chemical shift of the solvent residual signal was used as the reference. Chemical shifts were indicated in part per million (ppm). Carbon multiplicity was determined by DEPT 135 experiments. High resolution mass spectroscopy was analysed on a Bruker MicroTOF Q mass spectrometer using an electrospray ionization (ESI). Melting point (mp) was measured with a BUCHI B-540. Chromatographic separations were performed on silica gel columns (Kieselgel 300–400 mesh) with eluent indicated for each compound. All reactions were monitored by TLC on GF254 plates purchased from Merck and spots were detected under a UV lamp (254 nm and 356 nm) or by spraying plates with 0.5% w/v aqueous KMnO_4 , followed by drying with heat gun.

Pinacol borane (4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane) was purchased from Sigma Aldrich. Alkynes and carboxylic acids were purchased from Sigma-Aldrich, Fisher Scientific or Fluorochem. Optima LC/MS grade acetonitrile was

purchased from Fisher Scientific. 1,4-Dioxane was purchased from Carlo Erba, acetonitrile and dimethylformamide were purchased from Fisher Scientific and octane was purchased from Sigma-Aldrich. All purchased compounds were used as received.

2.2. General procedures for the synthesis of boronic esters 2a-t

GENERAL PROCEDURE A

Pinacol borane (1.4 mL, 9.44 mmol, 4 eq.), phenylacetylene (0.26 mL, 2.36 mmol, 1 eq.), 4-(dimethylamino)benzoic acid (5 mol%) and octane (2.4 mL) were introduced in a 10 mL round bottom flask. The reaction mixture was heated at 100 °C for 7 hours in an oil bath.

Once the reaction was over, samples were prepared following the same procedure applied for the calibration curve: the reaction medium was transferred into a 50 mL graduated flask and the volume was filled up with Optima LC/MS grade acetonitrile. After analysis by UV-LC, the result of AUC at 254 nm was used to determine the reaction yield using the previous calibration curve.

GENERAL PROCEDURE B

Pinacol borane (1.4 mL, 9.44 mmol, 4 eq.), phenylacetylene (0.26 mL, 2.36 mmol, 1 eq.), 4-(dimethylamino)benzoic acid (5 mol%) and solvent (2.4 mL) were introduced in a 10 mL microwave sealed flask. Time and temperature were set as described in the manuscript. Once the reaction was over, samples were prepared following the same procedure applied for the calibration curve: the reaction medium was transferred into a 50 mL graduated flask and the volume was filled up with Optima LC/MS grade acetonitrile. After analysis by UV-LC, the result of AUC at 254 nm was used to determine the reaction yield using the previous calibration curve.

GENERAL PROCEDURE C

Pinacol borane (1.4 mL, 9.44 mmol, 4 eq.), phenylacetylene (0.26 mL, 2.36 mmol, 1 eq.), acid catalyst (5 mol%) were introduced in a 10 mL microwave sealed flask and the reaction mixture was heated at 120 °C for 15 minutes. Once the reaction was over, samples were prepared following the same procedure applied for the calibration curve: the reaction medium was transferred into a 50 mL graduated flask and the volume was filled up with Optima LC/MS grade acetonitrile. After analysis by UV-LC, the result of AUC at 254 nm was used to determine the reaction yield using the previous calibration curve.

GENERAL PROCEDURE D

Pinacol borane (1.4 mL, 9.44 mmol, 4 eq.), alkyne (2.36 mmol, 1 eq) and 4-(dimethylamino)benzoic acid (5 mol%) were introduced in a 10 mL microwave sealed flask. Reactions conditions depended on alkyl or aromatic alkynes, time was set respectively at 30 and 15 min and temperature was set at 120 °C for both alkyne types. The reaction medium was directly purified by flash chromatography to obtain the final product. Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) was used for crystallization attempts.

2.3. Analytical data for compounds 2a-t

(E)-2-styrylboronic acid pinacol ester (**2a**)¹

Purification by flash chromatography with cyclohexane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (336 mg, 62%).

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 7.58 (d, J= 8.0, 2H); 7.40-7.28 (m, 4H); 6.14 (d, J=18.5 Hz, 1H); 1.24 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ= 149.21; 136.86; 129.14; 128.68; 127.02; 116.53; 83.02; 24.63.

(E)-2-(3-methoxystyryl)boronic acid pinacol ester (**2b**)²

Purification by flash chromatography with cyclohexane : diethyl ether (70:30) to obtain a colorless oil (374 mg, 60%).

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ = 7.32 (d, J= 18.4 Hz, 1H); 7.25 (m, 1H); 7.10-7.02 (m, 2H); 6.87 (m, 1H); 6.10 (d, J= 18.4, 1H); 3.80 (s, 3H); 1.29 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CD₃OD) δ= 161.44; 150.94; 149.38; 130.64; 120.69; 118.05; 115.83; 113.06; 84.62; 55.67; 25.13.

(E)-2-(4-methoxystyryl)boronic acid pinacol ester (**2c**)¹

Purification by flash chromatography with cyclohexane : diethyl ether (70:30) to obtain a white solid (361.3 mg, 58%).

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ = 7.44 (m, 2H); 7.30 (d, J= 18.4 Hz, 1H); 6.89 (m, 2H); 5.94 (d, J= 18.4 Hz, 1H); 3.80 (s, 3H); 1.29 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CD₃OD) δ= 162.03; 150.72; 149.21; 131.60; 129.51; 115.04; 84.47; 55.75; 25.12.

(E)-2-(3-phenylprop-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (**2d**)³

Purification by flash chromatography with cyclohexane: diethyl ether (90:10) to obtain a colorless oil (455.2 mg, 79%).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 7.28 (m, 2H); 7.23 – 7.09 (m, 3H); 6.77 (dt, J = 17.8, 6.3 Hz, 1H); 5.46 (dt, J = 17.8, 1.5 Hz, 1H); 3.49 (dd, J = 6.3 Hz, 1.5 Hz, 2H); 1.26 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 152.58; 139.20; 129.05; 128.56; 126.27; 119.90; 83.24; 42.41; 24.92.

(Z)-2-(1,2-diphenylvinyl)boronic acid pinacol ester (**2e**)⁴

Purification by flash chromatography with pentane: diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow solid (202.2 mg, 28%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.36 (s, 1H); 7.28 – 7.24 (m, 2H); 7.21 – 7.18 (m, 1H); 7.17-7.14 (m, 2H); 7.11-7.09 (m, 3H); 7.05-7.03 (m, 2H); 1.20 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 143.29; 140.55; 137.11; 130.08; 128.98; 128.37; 127.97; 127.70; 126.39; 83.91; 24.93.

Carbon signal next to boron atom was not observed.

Methyl (E)-3-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)benzoate (**2f**)

Purification by flash chromatography with petroleum ether (40-60 °C) : ethyl acetate (90:10) to obtain a pale yellow solid (446.0 mg, 65%). mp 78.5 °C. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 8.16 (t, J = 1.6 Hz, 1H); 7.95 (dt, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H); 7.66 (dt, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H); 7.47 – 7.36 (m, 2H); 6.24 (d, J = 18.4 Hz, 1H); 3.91 (s, 3H); 1.31 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 166.99; 148.39; 137.95; 131.30; 130.69; 129.91; 128.80; 128.37; 118.28; 83.61; 52.31; 24.95.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₆H₂₂BO₄: 289.1606; found [M+H]⁺: 289.1604

Methyl (E)-4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)benzoate (**2g**)¹

Purification by flash chromatography with petroleum ether (40-60 °C) : ethyl acetate (90:10) to obtain a colourless solid (330.9 mg, 48%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 2H); 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 2H); 7.40 (d, J = 18.4 Hz, 1H); 6.27 (d, J = 18.4 Hz, 1H); 3.90 (s, 3H); 1.31 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 166.98; 148.25; 141.82; 130.25; 130.03; 127.02; 119.66; 83.69; 52.25; 24.94.

(E)-2-(3-methoxyprop-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (**2j**)⁵

Purification by flash chromatography with petroleum ether (40-60 °C) : ethyl acetate (50:50) to obtain a pale yellow oil (164.0 mg, 34%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.62 (dt, J = 18.2, 4.8 Hz, 1H); 5.68 (dt, J = 18.2, 1.8 Hz, 1H); 3.99 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 2H); 3.34 (s, 3H); 1.26 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 149.17; 119.40; 83.38; 74.29; 58.42; 24.98.

(E)-2-(3-chlorostyryl)boronic acid pinacol ester (**2k**)¹

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (348.48 mg, 55%).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 7.46 (s, 1H); 7.37 – 7.25 (m, 4H); 6.17 (d, J = 18.4 Hz, 1H); 1.32 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 147.65; 139.17; 134.39; 129.61; 128.57; 126.76; 125.01; 118.08; 83.32; 24.63.

(E)-2-(4-chlorostyryl)boronic acid pinacol ester (**2l**)¹

Purification by flash chromatography with cyclohexane : ethyl acetate (60:40) to obtain a pale yellow solid (573.2 mg, 92%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 7.41 (m, 2H); 7.37 – 7.24 (m, 3H); 6.13 (d, J = 18.4 Hz, 1H); 1.31 (s, 12H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 148.14; 136.12; 134.74; 128.92; 128.36; 117.42; 83.59; 24.95.

(E)-2-(pent-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (**2m**)

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (161.9 mg, 35%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.62 (dt, J = 18.0, 6.4 Hz, 1H); 5.42 (dt, J = 18.0, 1.6 Hz, 1H); 2.11 (m, 2H); 1.43 (sext., J = 7.4 Hz, 2H); 1.24 (s, 12H); 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 154.68; 118.63; 83.10; 38.06; 24.91; 21.55; 13.91.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₁H₂₂BO₂: 197.1707; found [M+H]⁺: 197.1711.

(E)-2-(hex-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (**2n**)

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (267.2 mg, 54%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.63 (dt, J = 17.9, 6.4 Hz, 1H); 5.42 (dt, J = 17.9, 1.6 Hz, 1H); 2.14 (m, 2H); 1.39 (m, 2H); 1.24-1.28 (m, 14H); 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 154.93; 118.42; 83.11; 35.65; 30.50; 24.92; 22.40; 14.06.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₂H₂₃BNaO₂: 233.1683; found [M+Na]⁺: 233.1685.

(E)-2-(hept-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (2o)

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (339.8 mg, 64%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.63 (dt, J=18, 6.4 Hz, 1H); 5.41 (d, J=18 Hz, 1H); 2.13 (m, 2H); 1.41 (m, 2H); 1.26-1.29 (m, 16H); 0.88 (m, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ= 154.97; 118.51; 83.10; 35.93; 31.55; 28.04; 24.92; 22.66; 14.14.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₃H₂₅BNaO₂: 247.1840 found [M+Na]⁺: 247.1842.

(E)-2-(oct-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (2p)

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (315.1 mg, 58%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.63 (dt, J=17.9, 6.4 Hz, 1H); 5.41 (dt, J=17.9, 1.6 Hz, 1H); 2.14 (m, 2H); 1.40 (m, 2H); 1.26 (s, 18H); 0.86 (m, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ= 154.98; 118.59; 83.10; 35.99; 31.87; 29.06; 28.34; 24.92; 22.74; 14.24.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₄H₂₈BO₂: 239.2177; found [M+H]⁺: 239.2178.

(E)-2-(non-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (2q)

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (282.4 mg, 50%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.63 (dt, J=17.9, 6.4 Hz, 1H); 5.42 (dt, J=17.9, 1.6 Hz, 1H); 2.13 (m, 2H); 1.40 (m, 2H); 1.26 (s, 20H); 0.86 (m, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ= 155.00; 118.41; 83.11; 35.99; 31.95; 29.35; 29.31; 28.37; 24.92; 22.81; 14.25.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₅H₂₉BNaO₂: 275.2153 found [M+Na]⁺: 275.2162.

(E)-2-(dec-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (2r)

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (388.4 mg, 62%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.63 (dt, J= 18.0, 6.4 Hz, 1H); 5.42 (dd, J= 18.0, 1.6 Hz, 1H); 2.14 (m, 2H); 1.40 (m, 2H); 1.26 (s, 22H); 0.86 (m, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ= 155.00; 118.60; 83.11; 35.99; 32.03; 29.60; 29.39 (2xCH₂); 28.37; 24.92; 22.82; 14.25.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₆H₃₁BNaO₂: 289.2309 found [M+Na]⁺: 289.2311.

(E)-2-(undec-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (2s)

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (405.4 mg, 61%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.63 (dt, J= 17.9, 6.4 Hz; 1H); 5.42 (dt, J= 17.9, 1.6 Hz; 1H); 2.13 (m, 2H); 1.40 (m, 2H); 1.30-1.25 (m, 24H); 0.86 (m, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ= 155.01; 118.58; 83.11; 35.99; 32.05; 29.69; 29.65; 29.48; 29.39; 28.38; 24.93; 22.83; 14.26.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₇H₃₃BNaO₂: 303.2466; found [M+Na]⁺: 303.2469.

(E)-2-(dodec-1-en-1-yl)boronic acid pinacol ester (2t)

Purification by flash chromatography with pentane : diethyl ether (97:3) to obtain a pale yellow oil (612.9 mg, 88%). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 6.63 (dt, J= 17.9, 6.4 Hz, 1H); 5.42 (dt, J= 17.9, 1.5 Hz, 1H); 2.13 (m, 2H); 1.40 (m, 2H); 1.30-1.25 (m, 26H); 0.87 (t, J= 6.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ= 155.00; 118.53; 83.11; 35.99; 32.05; 29.77; 29.73; 26.65; 29.49; 29.39; 28.38; 24.93; 22.84; 14.27.

HRMS (ESI) : calcd. for C₁₈H₃₆BO₂: 295.2803; found [M+H]⁺: 295.2804.

References and notes

- (1) Lu, W.; Shen, Z. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 142–146.
- (2) Liu, Z.; Wei, W.; Xiong, L.; Feng, Q.; Shi, Y.; Wang, N.; Yu, L. *New J. Chem.* **2017**, 3172–3176.
- (3) Tanaka, S.; Saito, Y.; Yamamoto, T.; Hattori, T. *Org. Lett.* **2018**, *20* (7), 1828–1831.
- (4) Fleige, M.; Möbus, J.; Vom Stein, T.; Glorius, F.; Stephan, D. W. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (72), 10830–10833.
- (5) Shirakawa, K.; Arase, A.; Hoshi, M. *Synthesis (Stuttg.)* **2004**, No. 11, 1814–1820.

