



Synthèse d'antibactériens analogues de l'acide rhodotorulique

Timothée Garnerin

► To cite this version:

Timothée Garnerin. Synthèse d'antibactériens analogues de l'acide rhodotorulique. Autre. Université de Picardie Jules Verne, 2017. Français. NNT : 2017AMIE0030 . tel-03692890

HAL Id: tel-03692890

<https://theses.hal.science/tel-03692890>

Submitted on 10 Jun 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.

Thèse de Doctorat de Chimie

Spécialité Chimie Thérapeutique

présentée à

l'Université de Picardie Jules Verne

par

Timothée GARNERIN

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

Synthèse d'antibactériens analogues de l'acide rhodotorulique

Soutenue le 27 octobre 2017, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. Olivier DUVAL,

Professeur, Université d'Angers

Rapporteur

M. Marc Le BORGNE,

Professeur, Université de Lyon

Rapporteur

M. Stéphane GERARD,

Maître de conférences-HDR, Université de Reims

Examineur

M^{me} Alexandra DASSONVILLE-KLIMPT,

Maître de conférences-HDR, Université de Picardie Jules Verne

Directrice de Thèse

M. Pascal SONNET,

Professeur, Université de Picardie Jules Verne

Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à la région des Hauts de France et au Fond Européen de Développement Régional (FEDER) pour le financement alloué à ces travaux de thèse.

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources (LG2A) CNRS UMR 7378 sous la direction du Docteur Alexandra DASSONVILLE-KLIMPT et du Professeur Pascal SONNET.

Je souhaite exprimer mes remerciements au Professeur Olivier DUVAL de l'Université d'Angers et le Professeur Marc Le BORGNE de l'Université Claude Bernard Lyon 1 pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également le Docteur Stéphane GERARD de l'Université de Reims d'avoir accepté d'être examinateur pour ce travail.

Je remercie également le Professeur José KOVENSKY, directeur du Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources (LG2A CNRS UMR 7378) de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son établissement.

Je tiens à remercier le Professeur Pascal SONNET, de m'avoir accepté au sein de son équipe. Je le remercie également, ainsi que le docteur Alexandra DASSONVILLE-KLIMPT, de m'avoir proposé ce sujet de thèse. Je souhaite leur faire part de ma reconnaissance pour leurs conseils et l'aide qu'ils m'ont apportés au cours de ces trois années de thèse.

Je tiens aussi à remercier particulièrement le Docteur Catherine DEMAILLY-MULLIE pour son aide précieuse lors de la réalisation des tests biologiques, ainsi que les Docteurs Christina AMARANDEI, Pierre VANLEMMENS et le Professeur Emmanuel BAUDRIN pour la réalisation des tests physico-chimiques. Un grand merci également à André SASAKI pour ses conseils précieux.

Je remercie tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, qui m'ont aidé et permis d'accomplir ce travail au quotidien : Jean-François, Viviane, Christine, Sophie, Elodie, Guillaume, François-Yves.

Aux amis qui m'ont aidé au cours de ces trois années, Quentin, Jimmy, Jean-Pierre, Jérémy, Nicolas, Jason, Jean-Paul, Elodie, Lynda, Marine: un grand merci pour tous ces bons moments partagés et pour votre soutien.

Un grand merci également à Henri et Marido, à toute ma famille, ma maman, mon frère, mes cousins, cousines et leurs enfants, mes oncles et tantes, pour leur soutien constant. Chaque moment à vos côtés aura été formidable. Je remercie également Lucille, sans qui je n'aurais pu terminer cette thèse.

Enfin une grosse pensée pour mon papi et ma mamie, Théo et Paulette, cette thèse est également pour vous.

Abréviations

AIBN : azo-*bis*-isobutyronitrile

AcOEt: acétate d'éthyle

ADN : acide désoxyribonucléique

AR : acide rhodotorulique

ARN : acide ribonucléique

ARN_m : acide ribonucléique messenger

ARN_t : acide ribonucléique de transfert

Boc₂O : dicarbonate de di-*tert*-butyle

CCl₄ : tétrachlorure de carbone

CCM : chromatographie sur couche mince

CHCl₃ : chloroforme

CLHP : chromatographie en phase liquide à haute performance

CMI : concentration minimum inhibitrice

Cs₂CO₃ : carbonate de césium

DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DCM : dichlorométhane

DIEA : *N,N*-diisopropyléthylamine

DMF : diméthylformamide

ed : excès diastéréoisomérique

EDCI : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ee : excès énantiomérique

éq : équivalent

ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,
Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter sp.*

FhuD : Ferric hydroxamate uptake D

H₂ : dihydrogène

HCl : acide chlorhydrique

HMPA : hexaméthylphosphoramide

HOBt : hydroxybenzotriazole

K₂CO₃ : carbonate de potassium

LDA : di-*i*-propylamidure de lithium

LiAlH₄ : tétrahydroaluminate de lithium

LiBHEt₃ : triéthylborohydrure de lithium

LiHMDS : Bis-(triméthylsilyl)amidure de lithium

MeCN : acétonitrile

MeOH : méthanol

NaCl : chlorure de sodium

NaH : hydrure de sodium

NaHCO₃ : monohydrogénocarbonate de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

Na₂SO₄ : sulfate de sodium

Et₃N : triéthylamine

NMO : *N*-méthylmorpholine

OMR : outer membrane receptors

PBP : penicillin-binding protein

$\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$: hydroxyde de palladium sur charbon ou catalyseur de Pearlman

Ph : Phényle

PhSH : thiophénol

PLP : protéine de liaison périplasique

PMB : *para*-méthoxybenzyle

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : espèces réactives de l'oxygène

TBAF : fluorure de tétrabutylammonium

TBDMSCl : chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle

THF : tétrahydrofurane

TMSCl : chlorure de triméthylsilyle

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	2
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	6
I. BACTERIE, ANTIBIOTHERAPIE ET MECANISMES DE RESISTANCE	7
A. LA BACTERIE	7
1. Généralités	7
2. La paroi bactérienne	8
3. L'infection bactérienne	9
a. Facteurs de virulence	9
b. Le Biofilm	10
B. LA NUTRITION BACTERIENNE ET LES MECANISMES D'ACQUISITION DU FER	11
1. Les besoins nutritifs bactériens	11
2. Les systèmes bactériens d'acquisition du fer	14
a. Acquisition du fer ferreux	14
b. Acquisition du fer ferrique	15
i. Assimilation du fer ferrique à partir de l'hémoglobine, la transferrine et la lactoferrine	16
ii. Assimilation du fer ferrique par la voie des sidérophores	18
C. L'ANTIBIOTHERAPIE : MOLECULES ACTUELLES	24
1. Découverte des antibiotiques	24
2. β -lactames : cibles et mécanisme d'action	28
a. Cible des β -lactames : la synthèse du peptidoglycane	28
b. β -lactames : mécanisme d'action	30
3. Quinolones : cibles et mécanisme d'action	32
a. Cible des quinolones : gyrase et topoisomérase IV	32
b. Les quinolones : mécanisme d'action	33
D. LES RESISTANCES BACTERIENNES	35
1. Mutation des cibles	36
2. Modification/dégradation de l'antibiotique	37
3. Limitation de la concentration intracellulaire en antibiotique	38
a. Réduction de la perméabilité membranaire	38

b. Amélioration des systèmes d'efflux.....	38
II. NOUVELLES AVANCEES EN ANTIBIOTHERAPIE : MOLECULES EN ESSAIS CLINIQUES ET UTILISATION DES SYSTEMES D'ACQUISITION DU FER COMME CIBLE THERAPEUTIQUE	41
A. ANTIBIOTIQUES EN ESSAIS CLINIQUES	41
B. LES SYSTEMES D'ACQUISITION DU FER COMME CIBLE THERAPEUTIQUE	45
1. Les conjugués sidérophore-antibiotique	45
2. Les complexes sidérophore gallium	48
3. Autres potentialités des sidérophores	50
4. Travaux du laboratoire	50
III.SYNTHESE STEREOSELECTIVE D'OXOPIPERAZINES PLURISUBSTITUEES.....	59
A. SYNTHESE ASYMETRIQUE DE 2,5-DIOXOPIPERAZINES 3,6-DISUBSTITUEES	59
1. Biosynthèse de l'acide rhodotorulique	59
2. Synthèses totales de l'acide rhodotorulique et de ses analogues	61
3. Réactivité des carbones C ₃ et C ₆	67
a. Halogénéation radicalaire	67
b. Alkylation d'ions N-acyliminiums	68
c. Alkylation d'énolates	69
i. Avec la copule para-méthoxybenzyle	69
ii. Avec la copule phényléthyle	71
B. SYNTHESE STEREOSELECTIVE DE 2-OXOPIPERAZINES 3,6-DISUBSTITUEES	74
RESULTATS ET DISCUSSION.....	82
I. SYNTHESE DE PIPERAZINES 1,4-DISUBSTITUEES PORTANT DES FONCTIONS CHELATRICES DU FER	85
A. FORMATION DE PIPERAZINES 105B ET 105C 1,4-DISUBSTITUEES PAR DES CHELATEURS DU FER DE TYPE 1,5-DIHYDROXY-2-(HYDROXYMETHYL)PYRIDINONE	86
B. FORMATION DE LA PIPERAZINE 105D 1,4-DISUBSTITUEES PAR DES FONCTIONS HYDROXAMATES	89
1. Synthèse des dérivés halogénés 3 et 117 et 118.....	90
2. Synthèse de la pipérazine 1,4-disubstituée 105d par la voie 2.....	92

II. SYNTHÈSE DE DIOXOPIPERAZINES 3,6-DISUBSTITUÉES : ACIDE RHODOTORULIQUE ET ANALOGUES	95
A. SYNTHÈSE DES DIOXOPIPERAZINES 3,6-DISUBSTITUÉES : VOIES A ₁ ET A ₂	97
1. Synthèse des intermédiaires chloracétamides 99-(S) et -(R).....	100
2. Synthèse des copules chirales 2-(allyloxy)-1-phényléthanamine 134-b	100
3. Formation des dioxopipérazines 103, 124 et 127.....	101
a. Synthèse de la dioxopipérazine 103-(1S,4S).....	101
b. Synthèse des dioxopipérazines 124 et 127	103
4. Synthèse de l'acide rhodotorulique : voie A ₁	103
a. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine 124-(1S,4S) avec le bromure de benzyle	105
b. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine 124-(1S,4S) avec le dérivé bromé 117 : voie A _{1a}	107
c. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine 124b-(1S,4S) avec des 1,3-dihalogénopropanes : voie A _{1b}	110
d. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine 124-(1S,4S) avec le bromure d'allyle : voie A _{1c}	112
5. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine 127-(1S,4S) avec le bromure d'allyle : voie A ₂	117
B. SYNTHÈSE DES DIOXOPIPERAZINES 3,6-DISUBSTITUÉES : VOIES B ₁ ET B ₂	129
1. Synthèse de la N ^δ -hydroxy-L-ornithine	131
2. Synthèse de dioxopipérazines à partir du glutamate : voie B ₂	136
III.FORMATION DE COMPLEXES SIDEROPHORE-GA(III).....	148
IV.ÉTUDES PHYSICO-CHIMIQUES	150
A. MÉTHODE EXPERIMENTALE POUR L'ÉTUDE DES ÉQUILIBRES EN SOLUTION	150
B. ÉTUDE DES COMPLEXES EDTA-Fe(III).....	152
C. LIGANDS BIDENTES SIMPLES	155
1. Défériprone	155
2. Acide kojique 109.....	157
3. Hydroxypyridinone 111	161
D. PIPÉRAZINE DISUBSTITUÉE 105A.....	163
V. TESTS BIOLOGIQUES	168

A. SOUCHES ET PROTOCOLES	168
B. EVALUATION ANTIBACTERIENNE	169
1. Evaluation antibactérienne des complexes au gallium	170
2. Evaluation antibactérienne des pipérazines 105a et 182 disubstituées par des chélateurs du fer	171
C. MESURE DE L'ACTIVITE « SIDEROPHORE-LIKE »	172
a. Tests réalisés sur le composé 182	172
b. Tests réalisés sur le composé 105a	174
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	177
PARTIE EXPERIMENTALE.....	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	247
ANNEXES : PUBLICATIONS.....	259

Introduction générale

Les phénomènes de résistance bactérienne aux antibiotiques sont aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Les infections nosocomiales touchent 750 000 personnes par an, en France, et sont impliquées dans près de 10 000 décès chaque année. Dans son dernier rapport, l'OMS appelle à prendre des mesures d'urgence et fait état d'un niveau de résistance dangereusement élevé dans toutes les régions du monde. Le traitement de certaines infections telles que la gonorrhée, la tuberculose ou les pneumonies devient de plus en plus délicat, voire impossible, du fait de la perte d'efficacité des antibiotiques. Plusieurs souches sont particulièrement surveillées : *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*. De nombreuses bactéries à Gram négatif se révèlent également multi-drogues résistantes, telles que *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*. Ces dernières années, seules deux nouvelles classes d'antibiotiques ont été développées alors que l'apparition des résistances est de plus en plus rapide. Il est donc urgent de mettre au point de nouvelles antibiothérapies pour palier ces phénomènes au plus tôt.

Notre équipe, de l'axe Chimie du Vivant du Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Aggroressources (LG2A, UMR-CNRS 7378), s'intéresse à cette problématique et plus particulièrement à deux mécanismes de résistance bactérienne que sont : i) la diminution de la perméabilité membranaire bactérienne aux antibiotiques et ii) l'efflux actif de ces molécules. Ces deux phénomènes induisent une diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques et peuvent conduire à la perte d'efficacité de ces thérapies. Pour contourner le premier mécanisme de résistance, auquel nous nous sommes intéressés plus particulièrement au cours de cette thèse, nous souhaitons utiliser une voie d'entrée pour l'antibiotique différente de celle qu'il emprunte généralement chez les bactéries à Gram-négatif (voie des porines). Cette voie d'accès doit être la plus spécifique possible pour limiter la toxicité vis-à-vis des cellules de l'hôte. Elle doit également être essentielle à la virulence afin de restreindre les résistances et doit être en mesure d'accepter des xénobiotiques. Les voies bactériennes d'acquisition du fer répondent à ces critères et semblent appropriées pour la vectorisation de molécules antibiotiques ou de complexes toxiques. En effet, le fer est un élément essentiel à la croissance bactérienne, et les micro-organismes utilisent une voie qui leur est spécifique pour internaliser cet élément, celle des sidérophores.

Pour croître de manière optimale, les bactéries nécessitent une concentration en fer ferrique libre de l'ordre de 10^{-6} M. Du fait de son insolubilité et de sa toxicité, le fer présent dans l'organisme humain est majoritairement lié à des protéines (transferrine, lactoferrine) ou

retrouvé sous des formes inorganiques telles que $\text{Fe}(\text{OH})_3$. La concentration en fer ferrique libre est alors extrêmement basse, de l'ordre de 10^{-15}M , ne permettant pas le développement bactérien. Les micro-organismes ont développé des stratégies afin de combler leurs besoins en fer. Les bactéries sécrètent notamment des chélateurs multidentés, spécifiques du fer ferrique, nommés sidérophores. Leur forte affinité pour le fer ferrique leur permet d'entrer en compétition avec les protéines de l'hôte pour leur soutirer ce métal. Les complexes sidérophore- $\text{Fe}(\text{III})$ ainsi formés sont ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques enchâssés dans la membrane externe, puis transportés activement dans le périplasme ou le cytoplasme bactérien.

L'étude de composés naturels tels que l'albomycine a permis de démontrer qu'il était possible de vectoriser un antibiotique au travers de ces récepteurs spécifiques, en adoptant la stratégie dite du « Cheval de Troie ». Celle-ci repose sur la conception d'un conjugué sidérophore-antibiotique pouvant être reconnu par des récepteurs spécifiques et internalisé à l'aide d'un transport actif. Cette vectorisation permet ainsi de rétablir une concentration intracellulaire en antibiotique suffisante chez les souches résistantes pour que la thérapie soit efficace.

Une seconde stratégie thérapeutique, consiste à former des complexes au $\text{Ga}(\text{III})$. Le $\text{Fe}(\text{III})$ et le $\text{Ga}(\text{III})$ possèdent des propriétés atomiques voisines (charge, rayon ionique...) à la différence que le $\text{Ga}(\text{III})$ ne peut être réduit par les systèmes biologiques. Les modèles de chélation étant similaires, la différenciation des complexes ferrique et gallique ne pourra être opérée par les bactéries. Il semble que le gallium, lorsqu'il est présent dans le cytoplasme, interfère avec les voies de signalisation du fer conduisant ainsi à l'inhibition de la croissance bactérienne.

L'objectif de cette thèse est de synthétiser un sidérophore ainsi que des analogues de ce-dernier et de les coupler à un antibiotique (l'ampicilline pour une action périplasmique, la ciprofloxacine pour une action cytoplasmique) *via* un espaceur clivable ou de les complexer avec du gallium. Comme nous ciblons plus particulièrement les bactéries à Gram négatif *Acinetobacter baumannii* et *Escherichia coli*, nous avons choisi un sidérophore reconnu par le récepteur FhuE qu'ils possèdent en commun : l'acide rhodotorulique (**AR**).

Ce sidérophore, produit par *Rhodotorula pilimanae*, est une dioxopipérazine (3S,6S)-disubstituée par des fonctions chélatrices du fer de type hydroxamate. La stéréochimie de ce composé joue un rôle crucial dans sa reconnaissance par ses récepteurs spécifiques. Dans un

premier temps, nous souhaitons obtenir des pipérazines analogues 1,4-disubstituées par des ligands du fer. L'étude des propriétés physico-chimiques de ces molécules permettra alors d'établir une relation entre la nature des groupements chélateurs du fer et l'affinité des analogues pour le fer ferrique. Cependant, l'objectif principal de cette thèse est de réaliser une synthèse originale et convergente pour obtenir l'**AR** mais également des analogues dioxopipéraziniques énantiomériquement purs. Notre stratégie repose sur le développement d'une réaction d'alkylation stéréosélective de dioxopipérazines. Nous souhaitons ainsi pouvoir étudier l'influence sur la complexation: i) de la nature des ligands du fer, ii) de la stéréochimie des composés, iii) de la longueur des chaînes portant les fonctions chélatrices du fer. Par la suite, des conjugués sidérophore-antibiotique ou des complexes au gallium seront formés et leurs propriétés antibactériennes seront évaluées.

Après un rappel bibliographique sur la bactérie et les mécanismes par lesquels elle acquiert le fer indispensable à sa survie, nous discuterons des principales molécules utilisées actuellement en antibiothérapie et des mécanismes de résistance développés par les bactéries. Nous dresserons ensuite un portrait non exhaustif des principales molécules antibiotiques actuellement en essais cliniques, puis nous nous attarderons sur l'utilisation des systèmes bactériens d'acquisition du fer comme cibles thérapeutiques en argumentant la place des conjugués sidérophore-antibiotiques et des complexes sidérophore-gallium dans l'antibiothérapie actuelle. Au vu de la structure chimique du sidérophore choisi comme modèle, l'**AR**, un état de l'art sur la synthèse stéréosélective de dioxopipérazines plurisubstituées sera détaillé.

Les voies d'accès aux molécules visées seront ensuite développées et les difficultés rencontrées seront discutées avant de présenter les premiers résultats biologiques.

Rappels Bibliographiques

I. Bactérie, antibiothérapie et mécanismes de résistance

A. La bactérie

1. Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires qui constituent un règne qui leur est propre, différent de celui des plantes, des animaux, des champignons, des protozoaires et des chromistes. Elles ne possèdent pas d'organites ou de noyau : ce sont des procaryotes. Leur matériel génétique est contenu principalement dans un chromosome circulaire unique et partiellement dans différents plasmides. Ces derniers sont des éléments génétiques extra-chromosomiques qui peuvent contenir des gènes importants pour la survie de la bactérie, notamment ceux lui permettant d'acquérir une résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, ces organismes peuvent également posséder des intégrons qui constituent un système naturel de capture, d'expression et de dissémination des gènes.

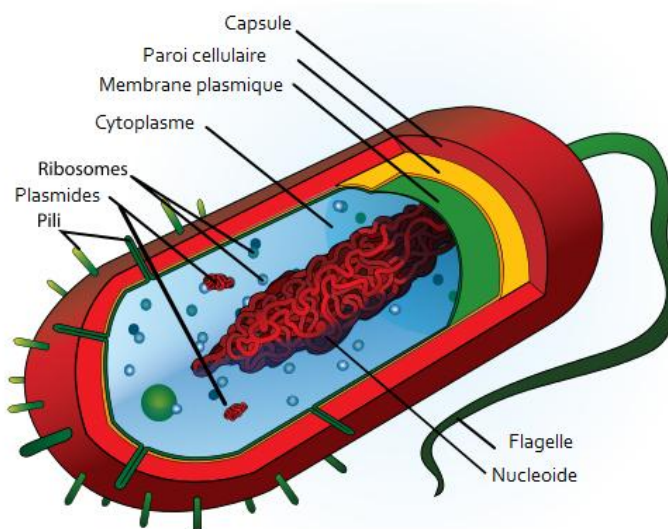


Figure 1. Représentation schématique d'une bactérie [1].

La cellule bactérienne est délimitée par une membrane constituée d'une bicouche lipidique contenant des protéines impliquées entre autres dans le transport passif ou actif ainsi que dans l'excrétion de différentes molécules ou sels. Cette membrane est recouverte d'une paroi composée de peptidoglycane, lui permettant de contenir la pression osmotique interne.

Au-delà de la protection physique qu'elle confère, la paroi protège également la bactérie des agressions chimiques générées par les enzymes ou les toxines produites par d'autres organismes. Elle est, par ailleurs, le support de structures, comme les pili ou les flagelles, qui permettent le déplacement de la cellule. Sur la surface externe de cette paroi, une capsule de nature polysaccharidique est parfois présente, dont le rôle est notamment de protéger la cellule de la phagocytose (Figure 1).

2. La paroi bactérienne

Les bactéries peuvent être classifiées en deux grands groupes suivant les propriétés physiques et chimiques de leur paroi (Figure 2). La coloration différentielle de Gram, découverte en 1884 par le médecin Danois Hans Christian Gram, permet de distinguer facilement les bactéries à Gram négatif, apparaissant en rouge, de celles à Gram positif, possédant une teinte violette [2].

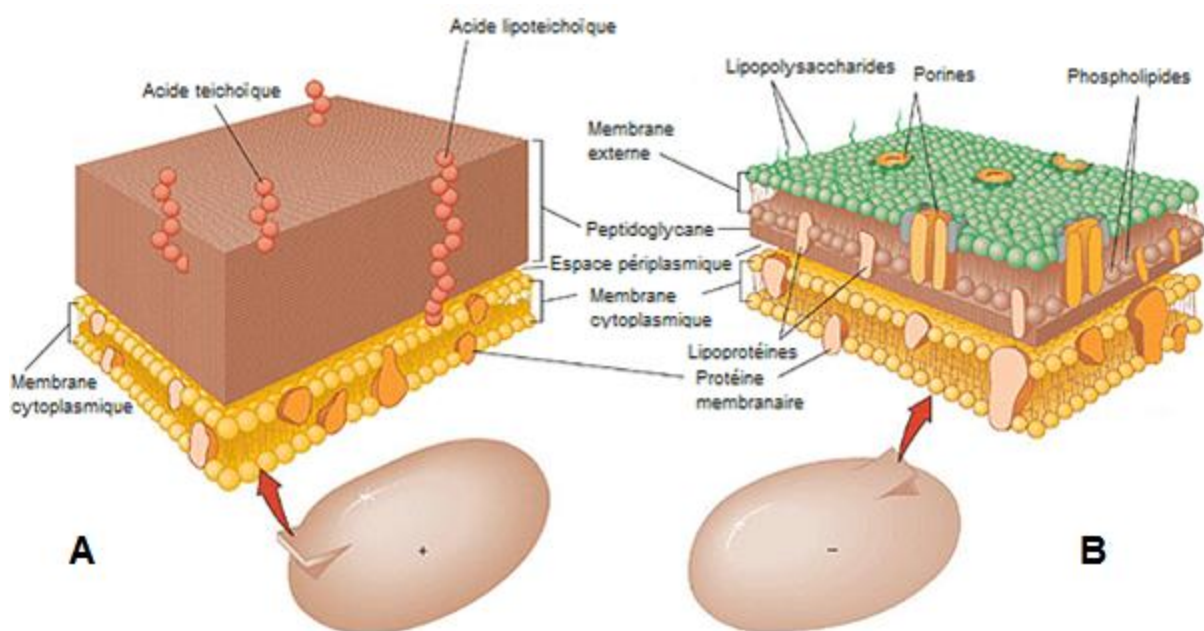


Figure 2. Représentation schématique des parois des bactéries à Gram positif (A) et à Gram négatif (B) [3].

Les bactéries à Gram positif :

Chez les bactéries à Gram positif, les couches de peptidoglycane peuvent représenter jusqu'à 90% des constituants de la paroi des bactéries. Des acides teichoïques, polymères de glycérol et de ribitol, s'associent au peptidoglycane pour former un feutrage assurant la

rigidité de la paroi. Enfin, ces bactéries ne possèdent qu'une seule membrane contrairement aux bactéries à Gram négatif.

Les bactéries à Gram négatif :

Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi n'est constituée que d'une ou deux couches de peptidoglycane représentant au maximum 20% des constituants de celle-ci. En outre, ces bactéries disposent d'une membrane supplémentaire composée d'une bicouche de phospholipides. Cette membrane est constituée essentiellement de lipopolysaccharides qui remplacent partiellement ou intégralement les phospholipides retrouvés dans la membrane interne. Au sein de cette membrane externe, deux types de protéines sont associées : d'une part des protéines de structure qui consolident cette bicouche et d'autre part, des protéines qui permettent le transport, passif ou actif, de différentes molécules au sein du cytoplasme. Les porines autorisent la diffusion passive, tandis que les récepteurs membranaires prennent en charge l'absorption de composés spécifiques tels que les sidérophores.

3. L'infection bactérienne

En 1872, le médecin Trousseau remarqua des résultats déconcertants concernant l'alimentation de patients atteints de tuberculose. En effet, ceux suivant des régimes alimentaires riches en fer présentaient une aggravation de leur maladie en comparaison avec les patients suivant un régime pauvre en fer. Les sidérophores, molécules chélatrices du fer, font partie des facteurs de virulence : les bactéries, en sécrétant ce type de composés, parviennent à survivre chez l'hôte qu'elles infectent. Afin d'accroître leur chance de survie, les bactéries peuvent également s'associer en un biofilm qui se révèle difficilement pénétrable par les défenses immunitaires.

Lorsqu'un pathogène parvient à pénétrer chez un hôte, il tente de se multiplier et de s'installer dans l'organisme. Sa capacité à se développer en présence des mécanismes de défense de l'hôte dépend fortement de facteurs de virulences.

a. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence sont des molécules produites par les pathogènes afin de permettre leur survie au cours de l'infection. Parmi celles-ci, nous distinguerons les toxines, les enzymes immunosuppressives, les facteurs nutritionnels et les adhésines.

Les toxines peuvent être sécrétées (exotoxines) ou présentes sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif et libérées seulement lors de la lyse du pathogène (endotoxines). Les endotoxines déclenchent des réponses inflammatoires en se liant à des récepteurs présents sur les monocytes et peuvent entraîner des septicémies. Les exotoxines, quant à elles, peuvent être responsables d'effets indésirables sur l'hôte tels que des contractions musculaires (tétanos, tétanospasme) ou une déshydratation (diphtérie, toxine diphtérique). D'autres exotoxines, telles que la lécithinase C, agissent en dégradant la membrane plasmique des cellules de l'hôte.

Les enzymes immunosuppressives sont des protéases spécifiques des immunoglobulines qui détruisent les anticorps inhibant ainsi l'opsonisation. La protéine A produite par *S. aureus* permet à ce micro-organisme d'échapper, dans de nombreux cas, aux anticorps humains.

Les facteurs nutritionnels sont des enzymes qui dégradent les protéines de l'hôte pour en extraire les nutriments tels que le fer, indispensables à leur croissance. Durant l'infection, les bactéries produisent des molécules uniques appelées sidérophores pour capter le fer de l'hôte. La reconnaissance des complexes sidérophore-Fe(III) s'effectue *via* des mécanismes de reconnaissance spécifique qui sont propres aux bactéries.

Les adhésines permettent aux pathogènes de pouvoir adhérer aux cellules de l'hôte lors de l'infection. Ces facteurs d'adhérence permettent l'élaboration de structures, appelées biofilms, qui protègent les bactéries du système immunitaire plus efficacement.

b. Le Biofilm

En milieu aqueux, les bactéries tendent à former des structures complexes comprenant un réseau cellulaire dont les unités sont reliées par une matrice constituée d'exopolysaccharides. Ce biofilm suit une évolution précise (Figure 3):

Dans un premier temps, les pathogènes modifient la surface à coloniser en sécrétant des protéines qui leur permettent de se fixer à cette surface grâce à des liaisons non covalentes (Van der Waals, hydrogènes, ioniques). Les bactéries augmentent ensuite leur capacité d'ancrage par la formation de protéines et l'utilisation de leurs pili si elles en possèdent.

Lorsque la colonie bactérienne atteint un certain seuil de densité, les micro-organismes commencent à synthétiser la matrice exopolysaccharidique. La division bactérienne permet d'étendre le biofilm, celui-ci pouvant devenir macroscopique si les conditions le permettent. Enfin, le vieillissement et l'érosion du biofilm entraînent un stress ou des carences induisant la dispersion de micro-organismes le constituant et le cycle de formation peut recommencer.

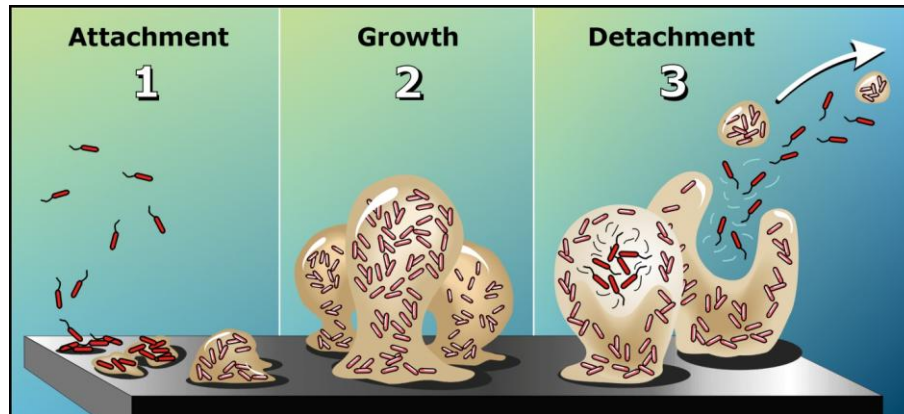


Figure 3. Cycle de vie du biofilm bactérien [4].

Parmi les facteurs de virulence, les facteurs bactériens d'acquisition du fer sont des cibles thérapeutiques intéressantes dont l'inhibition permet de limiter l'approvisionnement en fer des pathogènes et dont l'utilisation rend possible la vectorisation d'antibiotiques.

B. La nutrition bactérienne et les mécanismes d'acquisition du fer

1. Les besoins nutritifs bactériens

Afin de pouvoir survivre et croître, les bactéries nécessitent une source énergétique qui peut être d'origine lumineuse ou chimique (phototrophie et de chimiotrophie). Les micro-organismes phototrophes tirent leur énergie de la lumière grâce à des processus biochimiques tels que la photosynthèse. Les bactéries chimiotrophes, quant à elles, obtiennent leur énergie à partir d'une source chimique d'origine minérale ou organique. Comme tous les êtres vivants, les micro-organismes ont également besoin d'eau. Cet élément, qui représente jusqu'à 90% de la masse cellulaire, joue un rôle fondamental en permettant la solubilisation et le transport passif des nutriments.

Enfin, plusieurs nutriments sont nécessaires au développement bactérien :

Une source de carbone

Les bactéries autotrophes parviennent à assimiler le dioxyde de carbone tandis que les bactéries hétérotrophes nécessitent des substrats organiques.

Une source d'azote

Pour la majorité des bactéries, l'azote peut être absorbé sous forme inorganique (sels d'ammonium, nitrates...) ou organique (acides aminés)

Des facteurs de croissance

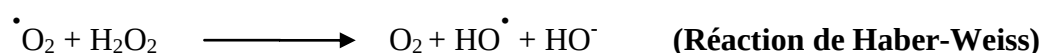
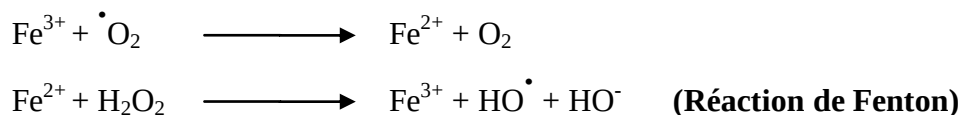
Ce sont des composés tels que des bases puriques, des vitamines ou des acides gras qui sont essentiels mais que la bactérie ne peut synthétiser.

Des éléments minéraux

Le soufre et le phosphore sont importants respectivement pour la synthèse de la cystéine et des acides nucléiques. Des ions tels que le sodium, le chlore, le potassium ou encore le magnésium sont essentiels pour l'équilibre physico-chimique de la bactérie. Enfin à de très faibles concentrations, le manganèse, le molybdène, le calcium, le cobalt ou le fer représentent des oligoéléments indispensables à la survie bactérienne. Le fer constitue un micronutriment nécessaire à la survie de presque toutes les formes de vie connues. Dans les conditions physiologiques, cet élément est présent sous deux formes liées à son état d'oxydation: le fer ferreux, Fe(II), et le fer ferrique, Fe(III). Le potentiel oxydoréducteur du couple Fe(II)/Fe(III) ($= 0,77 \text{ V}$ [5]) rend le fer extrêmement polyvalent lorsqu'il est incorporé dans des protéines où il joue le rôle de centre catalytique ou de transporteur d'électrons. Cet élément est donc essentiel pour de nombreux processus biologiques tels que la photosynthèse, la respiration, le cycle de Krebs, le transport du dioxygène, la synthèse de l'ADN...

Bien que le fer soit abondant dans la nature, il n'apparaît pas principalement sous sa forme ferreuse. Dans des conditions aérobies le fer est retrouvé sous sa forme ferrique, l'ion Fe(II) étant instable et pouvant conduire à la réaction de Fenton. Des ions ferriques et des

espèces réactives de l'oxygène peuvent alors être créés, ces dernières pouvant endommager les macromolécules biologiques.



Par ailleurs, à pH physiologique, les ions ferriques tendent à précipiter sous la forme d'hydroxydes de Fe(III) insolubles. Du fait de sa haute réactivité et de sa toxicité, le fer est séquestré/interné dans des protéines hôtes telles que les transferrines, les lactoferrines ou encore les ferritines. La concentration en fer ferrique libre, environ égale à 10^{-18} M, est alors trop faible pour permettre la survie de micro-organismes. En effet, les micro-organismes ont besoin d'une concentration en fer ferrique libre comprise entre 10^{-7} à 10^{-5} M.

Par conséquent, les bactéries ont développé des mécanismes pour acquérir le fer sous forme libre ou liée. Les bactéries sont ainsi capables de métaboliser les protéines stockant le fer de l'hôte telles que les transferrines et lactoferrines et/ou de sécréter des molécules possédant une haute affinité pour le fer ferrique, appelées sidérophores. Ces molécules forment des complexes avec le fer qui transitent par un système de transport bactérien spécifique.

Ces voies d'acquisition du fer par la bactérie, qui intéressent depuis plusieurs années l'équipe THERA du LG2A, ont été identifiées comme appropriées à l'internalisation de nouveaux antibactériens [6–8]

Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons principalement aux bactéries à Gram négatif. Après avoir décrit les différents systèmes d'acquisition du fer par les bactéries, nous étudierons les principales classes d'antibiotiques disponibles sur le marché et les résistances développées par les bactéries pour contrer l'action de ces molécules antimicrobiennes.

2. Les systèmes bactériens d'acquisition du fer

Différentes souches bactériennes, telles que *E. coli* et *S. aureus*, sont capables de se développer dans des milieux aérobies mais également dans des milieux anaérobies. En l'absence d'oxygène, le fer est majoritairement retrouvé sous sa forme ferreuse. Ainsi, selon le milieu dans lequel évolue la bactérie et donc, selon le degré d'oxydation du fer, ce métal sera assimilé différemment par les micro-organismes.

a. Acquisition du fer ferreux

Les bactéries se développant dans des milieux anaérobies ont à leur disposition du fer essentiellement sous forme ferreux dû à l'absence d'oxygène.

Ces bactéries utilisent alors un système de transport localisé sur la membrane cytoplasmique, appelé Feo qui a été décrit pour la première fois chez les *Enterobacteriaceae*. Le fer ferreux est d'abord absorbé par diffusion passive *via* une porine située sur la membrane externe de la bactérie à Gram négatif. L'ion ferreux est ensuite pris en charge par la perméase FeoB qui assure son transport actif vers le cytoplasme grâce à l'hydrolyse du GTP stimulée par FeoA. FeoA et FeoB font parti de l'opéron *feoABC* dont la transcription est régulée par FeoC (Figure 4) [9].

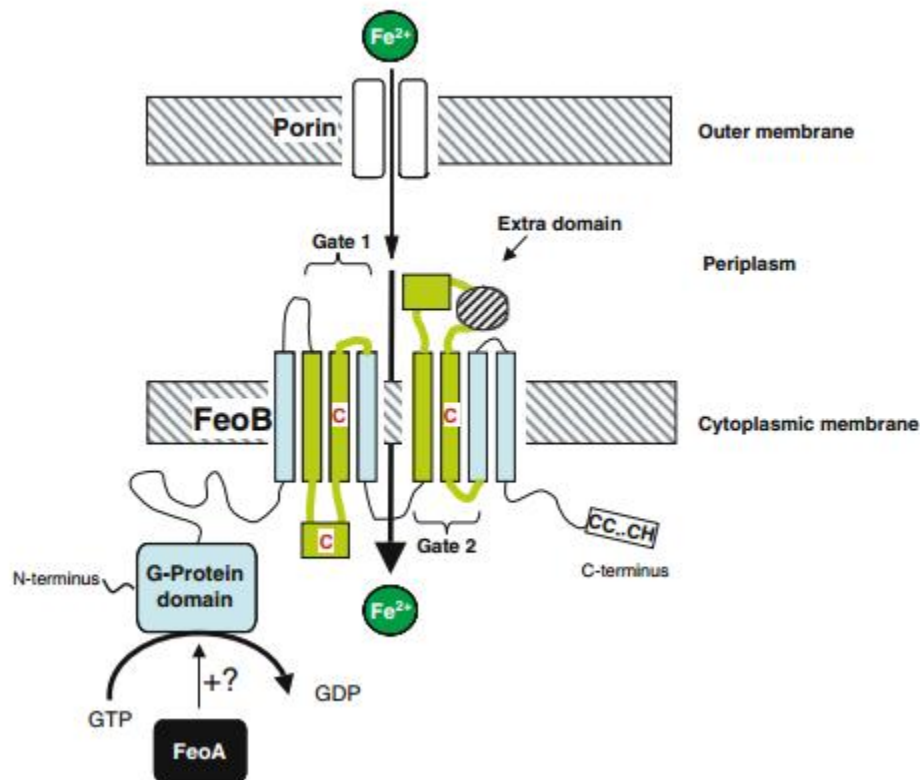


Figure 4. Absorption du fer ferreux par le système Feo [10].

Cependant, lors d'une infection, les bactéries sont dans des conditions aérobies et les ressources en fer sont alors limitées puisque ce métal est principalement sous forme ferrique. Afin de pouvoir survivre, les bactéries ont mis au point des stratégies pour acquérir le fer sous cette forme.

b. Acquisition du fer ferrique

Afin de satisfaire leurs besoins en fer, les bactéries à Gram négatif pathogènes ont développé deux stratégies d'acquisition du fer ferrique de l'hôte : i) *via* l'extraction du fer des protéines de l'hôte (transferrine, lactoferrine, ...), ii) *via* la biosynthèse et la reconnaissance de complexants du fer de faible poids moléculaire, appelées sidérophores.

Ces systèmes d'acquisition impliquent : i) un récepteur spécifique situé sur la membrane externe qui permet la reconnaissance de l'ion fer complexé, ii) une protéine de liaison périplasmique (PLP) et iii) un transporteur de type ABC situé sur la membrane cytoplasmique (Figure 5). Les bactéries à Gram négatif ne possèdent pas de gradient ionique

ou d'ATP au niveau de leur membrane externe afin de fournir l'énergie nécessaire au transport. Dans la majorité des cas, celle-ci est obtenue grâce à la force proton motrice située au niveau de la membrane cytoplasmique et dont l'énergie est transportée jusqu'à la membrane externe *via* trois protéines : TonB, ExbB, ExbD (Figure 5).

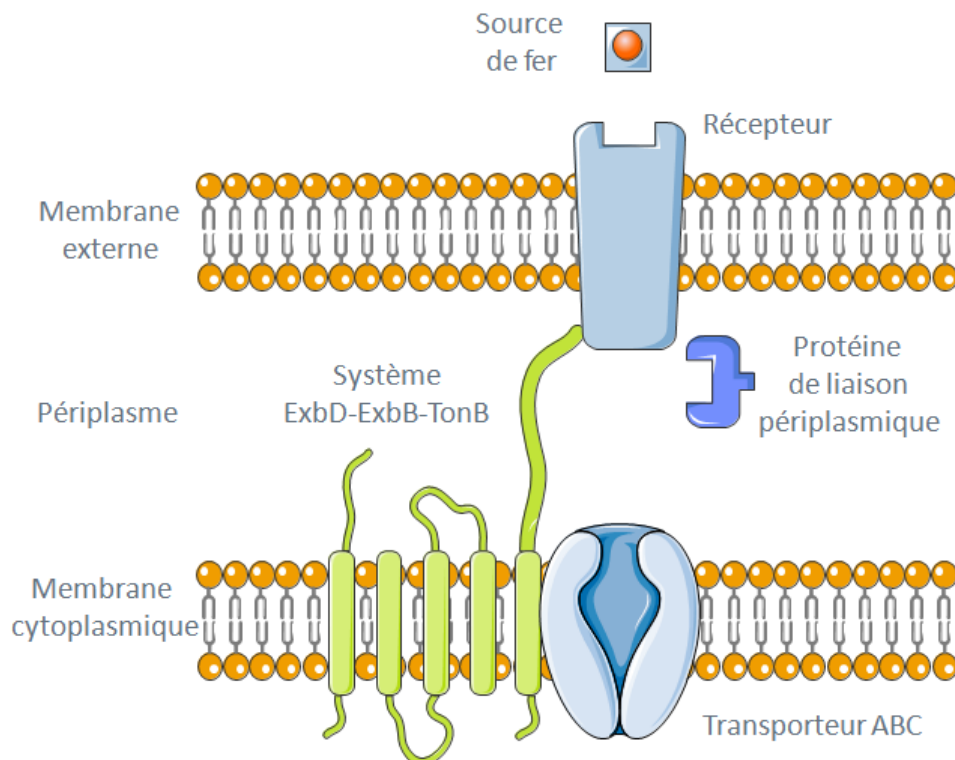


Figure 5. Représentation schématique d'un récepteur TonB dépendant chez une bactérie à Gram négatif [11].

Nous détaillerons maintenant les différents mécanismes permettant aux bactéries de satisfaire leurs besoins en fer ferrique.

i. Assimilation du fer ferrique à partir de l'hémoglobine, la transferrine et la lactoferrine

Pour les bactéries, la transferrine, la lactoferrine sont des sources ferriques de poids moléculaire élevé. Elles ne peuvent passer les porines qui autorisent uniquement la diffusion de composés dont le poids moléculaire est inférieur à 600 daltons [12].

A partir des hémophores

Le fer présent chez l'homme est essentiellement concentré dans deux protéines : l'hémoglobine et la ferritine. Afin d'accéder à ce fer, les bactéries pathogènes sécrètent couramment des exotoxines telles que les hémolysines, les cytolysines et des protéases capables d'entraîner la lyse des cellules et le relargage de l'hème. Par exemple, l'hémoglobine protéase Hbp dégrade l'hémoglobine notamment présente dans les érythrocytes afin de libérer l'hème. Deux mécanismes d'acquisition de l'hème ont été rapportés (en bleu, Figure 6). Le premier implique l'intervention d'un récepteur TonB dépendant, d'une protéine de liaison périplasmique et d'un transporteur ABC. L'hème, sous sa forme libre ou associée à des protéines de l'hôte (hémoglobine, hémoglobine-haptoglobine, hème-albumine, hème-hémopexine, myoglobine), est dégradé dans le cytoplasme par les hèmes mono-oxygénases pour en libérer le fer. Le second mécanisme implique l'utilisation d'hémophores, des protéines bactériennes qui acquièrent l'hème de l'environnement et le rapporte *via* un transporteur TonB dépendant nommé HxuC [13]. De même, une fois dans le cytoplasme bactérien, l'hème est dégradé.

A partir de la transferrine et la lactoferrine :

Ces protéines permettent de séquestrer le fer présent dans l'organisme de l'hôte. L'extraction du Fe(III) à partir de la transferrine et la lactoferrine s'effectue à la surface de la membrane externe grâce, respectivement, aux protéines membranaires TbpB/TbpA et LbpB/LbpA (en rouge, Figure 6). Ces protéines sont supposées posséder de grandes boucles qui se lient à la transferrine. Elles forcent ainsi la séparation des domaines avoisinant les sites de liaison du fer pour le libérer. Une fois le fer transféré dans le périplasme, il est complexé avec une protéine de liaison spécifique, FbpA et conduit vers la membrane cytoplasmique où il est internalisé *via* le transporteur membranaire FbpB/FbpC.

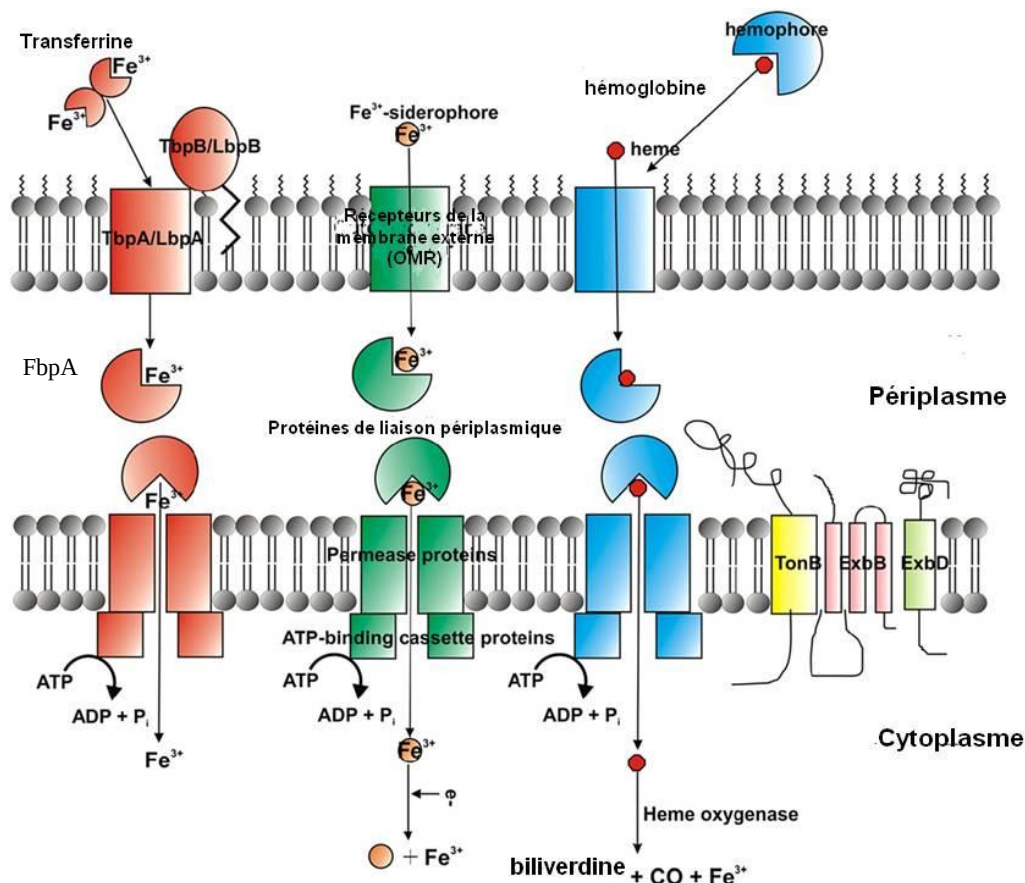


Figure 6. Absorption du fer ferrique par les bactéries à Gram négatif selon Krewulak *et al.*[14]. Acquisition de ce métal à partir de la transferrine (en rouge), de l'hème (en bleu) ou des sidérophores (en vert). Toutes ces voies de transport actif du fer requièrent l'action d'un OMR, d'une PLP et d'un transporteur membranaire de type ABC. Les bactéries ne possèdent pas obligatoirement ces trois voies d'acquisition du fer, mais elles en possèdent majoritairement plus d'une. Le transport au travers de la membrane externe nécessite l'action du complexe protéique TonB-ExbB-ExbD.

ii. Assimilation du fer ferrique par la voie des sidérophores

Dans des conditions limitantes en fer, de nombreuses bactéries synthétisent des chélateurs du fer de faible poids moléculaire, appelés sidérophores. A ce jour, plus de 500 structures de sidérophores ont été dénombrées. Toutefois, seules trois familles chimiques chélatantes différentes sont principalement retrouvées : les hydroxamates, les acides α -hydroxycarboxyliques et les catéchols (Figure 7). Ces groupements bidentates possèdent deux oxygènes impliqués dans la chélation de l'atome de fer. Le Fe(III) préférant les sphères de ligands hexacoordinés octaédrales, trois de ces groupements sont nécessaires pour une

chélation optimale de cet ion. Le Fe(III), étant un ion métallique dur, il préfère les ligands durs tels que l'oxygène. En revanche, le Fe(II) préfère les coordinations tétraédrales et les ligands mous tels que l'azote. Ceci explique en partie la spécificité plus importante des sidérophores pour le Fe(III) par rapport au Fe(II).

Comme pour les précédentes molécules étudiées, le poids moléculaire des sidérophores est souvent trop important pour qu'ils puissent diffuser au travers des porines. Un système d'absorption spécifique a été développé et se caractérise par un récepteur membranaire externe, une PLP et d'un transporteur ABC.

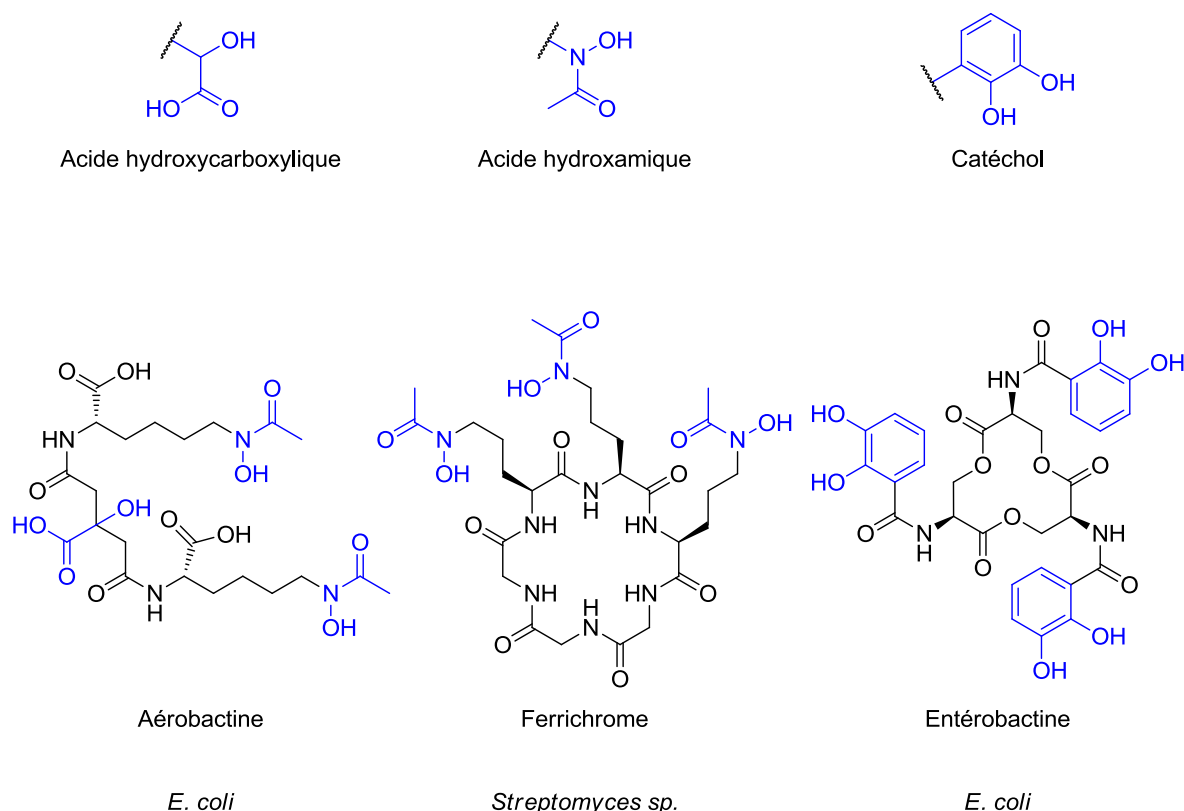


Figure 7. Structure des groupements chélateurs du fer et exemples de sidérophores dans lesquels ils apparaissent.

Les récepteurs de la membrane externe :

Une bactérie exprime différents récepteurs spécifiques sur sa membrane externe ce qui lui permet de reconnaître non seulement ses propres sidérophores (endogènes) mais également des sidérophores qu'elle n'est pas en mesure de produire (exogène) via le récepteur spécifique de ce sidérophore. *E. coli* est ainsi capable de reconnaître les sidérophores qu'elle biosynthétise (entérobactine, 2,3-dihydroxybenzoylsérine (DBS), salmochéline) mais aussi de

nombreux sidérophores exogènes tels que le ferrichrome, produit par des souches telles que *Aspergillus sp.*, ou *Penicillium sp.*, l'acide rhodotorulique (**AR**) biosynthétisé notamment par *Rhodotorula pilimanae* ou encore le coprogène produit par *Penicillium sp.*, grâce aux récepteurs FhuA et FhuE (Figure 8).

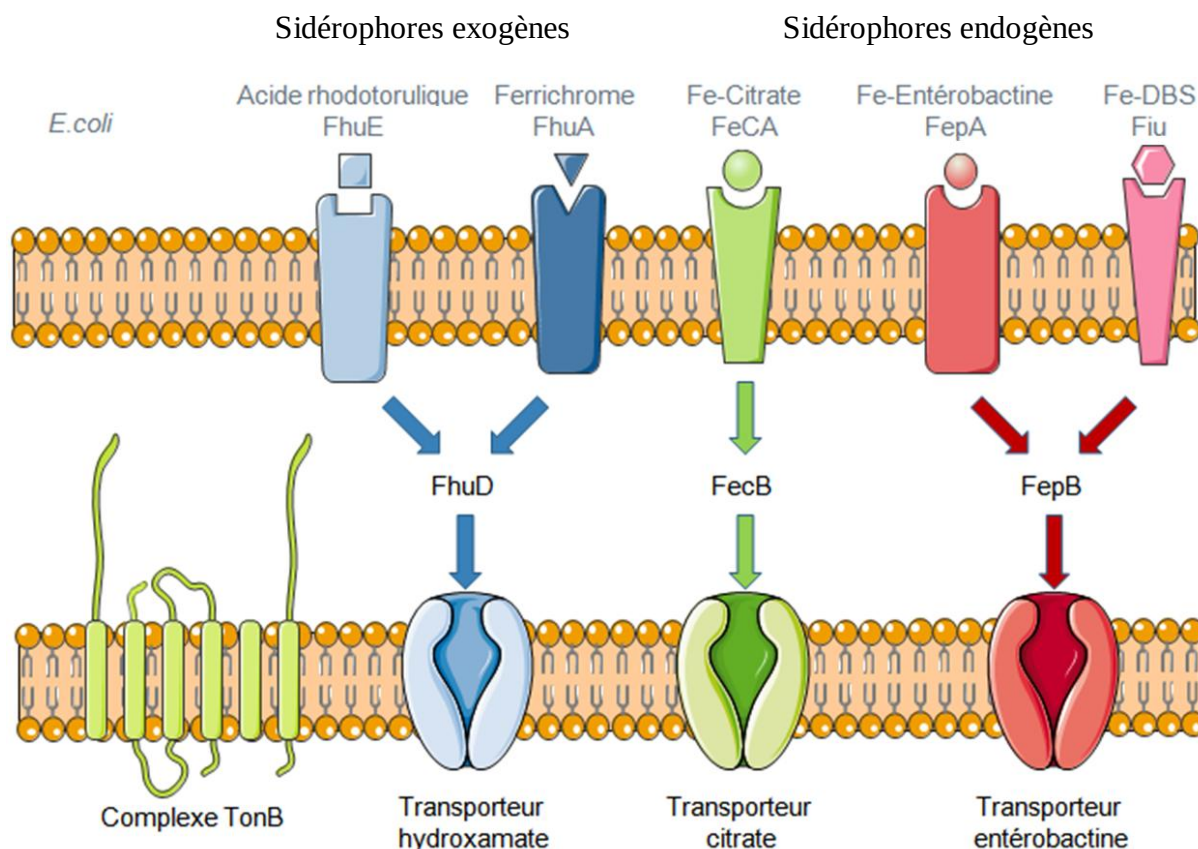


Figure 8. Représentation schématique des systèmes de transport des complexes sidérophore-Fe(III) chez *E. coli*. D'après Hider *et al* [15].

Bien que les séquences en acides aminés des récepteurs membranaires externes (OMR, Outer Membrane Receptor) diffèrent fortement, ils possèdent des structures secondaires similaires (Figure 9) : i) un domaine tonneau β transmembranaire composé de 22 brins formant un feuillet β antiparallèle et un domaine *N*-terminal capable d'obstruer la lumière du tonneau afin d'exercer un contrôle et ne laisser passer que le(s) sidérophore(s) spécifique(s) [14]. Ce « bouchon » est constitué d'un feuillet β composé de quatre brins. Il est maintenu en place grâce à de nombreuses liaisons hydrogènes (40 à 70) et à deux ponts salins extrêmement bien conservés (deux glutamates présents sur le tonneau β et deux arginines présentes sur le

domaine *N*-terminal). Ce domaine comprend trois boucles A, B et C, qui sont impliquées dans la liaison avec le sidérophore, et une boîte TonB.

Les structures cristallines de plusieurs récepteurs aux sidérophores ont été élucidées : FhuA (Ferrichrome) [16], FecA (Citrates) [17], FepA (Entérobactine) [18], FpvA (pyoverdine) [19] ou encore FptA (pyochéline) [20]. Afin d'interagir au mieux avec leur sidérophore, les récepteurs possèdent des sites de liaisons adaptés : FhuA utilise des résidus aromatiques pour se lier au ferrichrome [21,22] alors que FecA contient plusieurs arginines capables de créer des liaisons ioniques avec le citrate-ferrique chargé négativement [17,23].

Le système TonB-ExbB-ExbD :

Le transport des complexes sidérophore-Fe(III) au travers des récepteurs de la membrane externe (OMR) requiert de l'énergie. Cette énergie est fournie par le complexe protéique TonB comprenant trois domaines : i) le domaine *N*-terminal qui interagit avec ExbB et ExbD afin de coupler la force proton motrice à l'activité de TonB [24], ii) le domaine central qui permet de former une extension de la protéine au travers du périplasme pouvant atteindre 10 nm [25], iii) le domaine *C*-terminal qui interagit avec la partie *N*-terminale du bouchon de l'OMR, appelée la boîte TonB. Des études sur ce complexe protéique ont montré que l'absence ou la mutation de TonB rend impossible le transport des sidérophores [26,27].

Les protéines de liaison périplasmiques :

Les PLPs présentent chez les bactéries à Gram négatif, assurent le transport actif de substrat entre un OMR et un récepteur retrouvé sur la membrane cytoplasmique. L'une des PLPs les plus étudiées est FhuD (Ferric hydroxamate uptake D), spécifique des sidérophores hydroxamates [28]. Des études suggèrent que TonB pourrait placer une PLP près de l'OMR, facilitant ainsi la liaison entre le complexe sidérophore-Fe(III) et la PLP [29].

Les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) :

Une fois le complexe sidérophore-Fe(III) lié à la PLP, il est conduit à un transporteur de type ABC qui permet à ce complexe d'accéder au cytoplasme. Quand la PLP s'amarre au transporteur ABC, un changement de conformation se produit au niveau de la PLP. Ce changement de conformation est transmis au transporteur ABC permettant la liaison avec une molécule d'ATP. La PLP, ayant alors une plus faible affinité pour son substrat, le relâche dans le canal formé par le transporteur ABC. Lors de l'hydrolyse de l'ATP, un changement de conformation de la protéine rapproche les deux motifs liant l'ATP, permettant le relargage du

complexe sidérophore-Fe(III) dans le cytoplasme.

Modèle proposé pour le transport des complexes sidérophore-Fe(III) :

Deux modèles sont actuellement proposés quant à la reconnaissance du complexe sidérophore-Fe(III) par l'OMR. Le premier propose qu'une liaison entre un récepteur vide et le complexe se forme, alors que le second affirme qu'un sidérophore libre de Fe(III) déjà présent dans l'OMR est substitué par le complexe. Une fois le substrat Fer(III)-sidérophore fixé sur l'OMR, un changement de conformation du récepteur entraîne le complexe sidérophore-Fe(III) dans la lumière du tonneau β . A la sortie de l'OMR, le complexe est certainement pris en charge par la PLP placée à proximité par TonB. Le complexe sidérophore-Fe(III)-PLP se dirige vers un transporteur de type ABC. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet alors le transport du complexe sidérophore-Fe(III) jusqu'au cytoplasme. Afin de libérer le fer, deux mécanismes ont été mis en évidence : i) l'hydrolyse du complexe et ii) la réduction du complexe catalysée par une réductase et en présence de NADPH. L'affinité des sidérophore pour le Fe(II) est largement inférieure à celle pour le Fe(III). Ce métal est ainsi libéré plus facilement et peut ensuite être assimilé par des apoprotéines. Le sidérophore, quant à lui, peut être excrété grâce à des pompes à efflux.

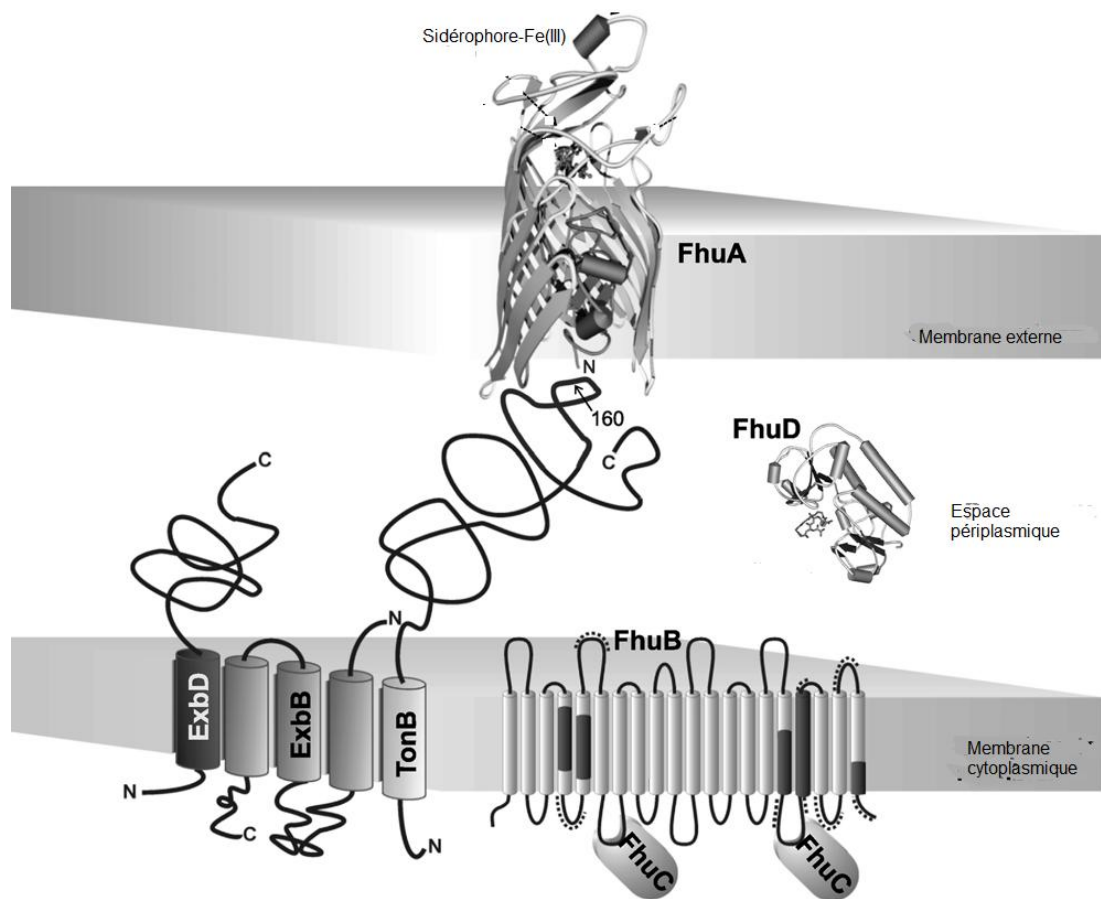


Figure 9. Modèle de transport des sidérophores hydroxamates par le système FhuA-FhuD-FhuBC₂. D'après Braun *et al* [30].

Dans ce chapitre, nous venons de voir les mécanismes d'acquisition du fer par les bactéries à Gram négatif. Le chapitre suivant établira le lien qui existe entre ces systèmes d'acquisition et le développement de nouvelles antibiothérapies.

C. L'antibiothérapie : molécules actuelles

1. Découverte des antibiotiques

Depuis leur découverte dans le milieu du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont révolutionné la médecine en permettant de lutter efficacement contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. De nombreuses épidémies ont ainsi pu être endiguées telles que la lèpre, la peste ou encore la tuberculose.

Suite aux travaux de Louis Pasteur et de Robert Koch, la « théorie microbienne » est validée à la fin du XIX^{ème} siècle. En 1900, Paul Ehrlich développe l'idée selon laquelle les bactéries pathogènes peuvent être éliminées sans blesser le corps humain. Ses travaux de recherche s'orientent vers la synthèse de molécules à pouvoir antibactérien et, en 1908, il découvre le Salvarsan qui se révèle très efficace pour lutter contre la syphilis [31]. Les premiers agents antibactériens sont ainsi issus de la synthèse organique.

Il faudra toutefois attendre la découverte de la pénicilline pour entrer dans l'ère des antibiotiques et bouleverser la médecine [32]. En 1942, la pénicilline G est introduite, quatorze ans après sa découverte (Figures 10, 11). Rapidement, cette forme intraveineuse est remplacée par une forme orale, la pénicilline V. De nombreux composés naturels possédant un pouvoir bactéricide sont découverts durant cette période. Les tétracyclines, produites par des souches *Streptomyces* commencent à être commercialisées à la fin des années 1940. En interagissant avec la sous-unité ribosomale 30S, les tétracyclines inhibent la traduction des ARN_m en protéines. Puis les aminoglycosides apparaissent au début des années 1950. La gentamycine et la streptomycine, produites respectivement, par *Micromonospora purpurea* et par *Streptomyces griseus*, en sont les premiers représentants. Ces composés agissent également sur la synthèse protéique bactérienne en perturbant la fiabilité de la traduction des ARN_m. Cette découverte de nouveaux antibiotiques se poursuit pendant cette période avec les macrolides, tels que l'érythromycine synthétisée par *Saccharopolyspora erythraea*, les rifamycines et les glycopeptides tels que la vancomycine. Une grande partie des antibiotiques découverts sont d'origine naturelle. Cependant, une classe particulière d'antibiotiques, les quinolones, apparaît au début des années 1960. Ces molécules, dérivées de l'acide nalidixique, sont issues de la synthèse organique. Elles sont très efficaces mais possèdent une toxicité élevée pour l'Homme.

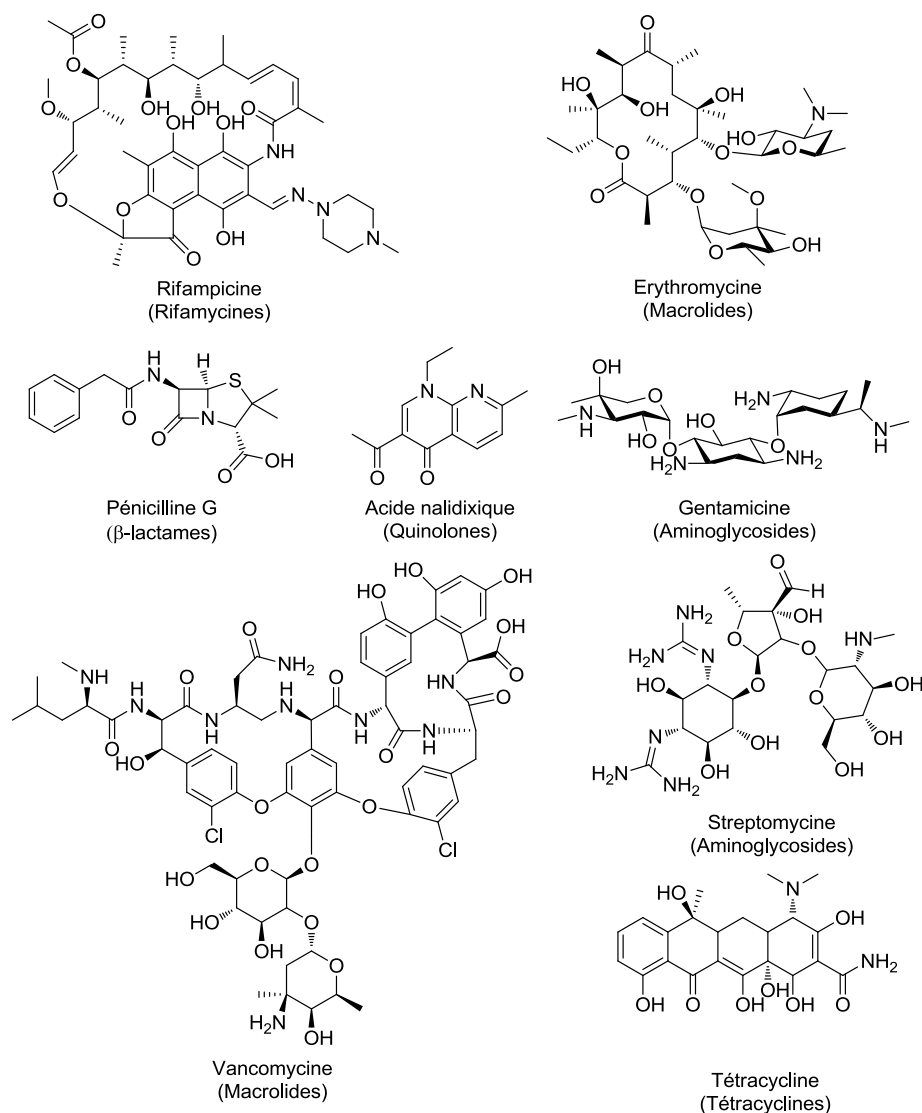


Figure 10. Structure des premiers antibiotiques découverts: Rifampicine, Erythromycine, Pénicilline G, Acide nalidixique, Gentamicine, Vancomycine, Streptomycine et Tétracycline.

L'utilisation de ces antibiotiques entraîne inévitablement l'apparition de bactéries résistantes après quelques années d'utilisation. Dès les années 1960, ces phénomènes de résistance sont répertoriés. Ainsi des résistances respectivement à la tétracycline, aux pénicillines ou encore à l'érythromycine sont observées pour des souches du genre *Shigella*, *Pneumococcus*, ou *Streptococcus* (Figure 11). Suite à l'apparition de ces phénomènes de résistance, de nouvelles molécules sont apparues afin de restaurer l'activité des premiers antibiotiques découverts et de réduire la toxicité observée.

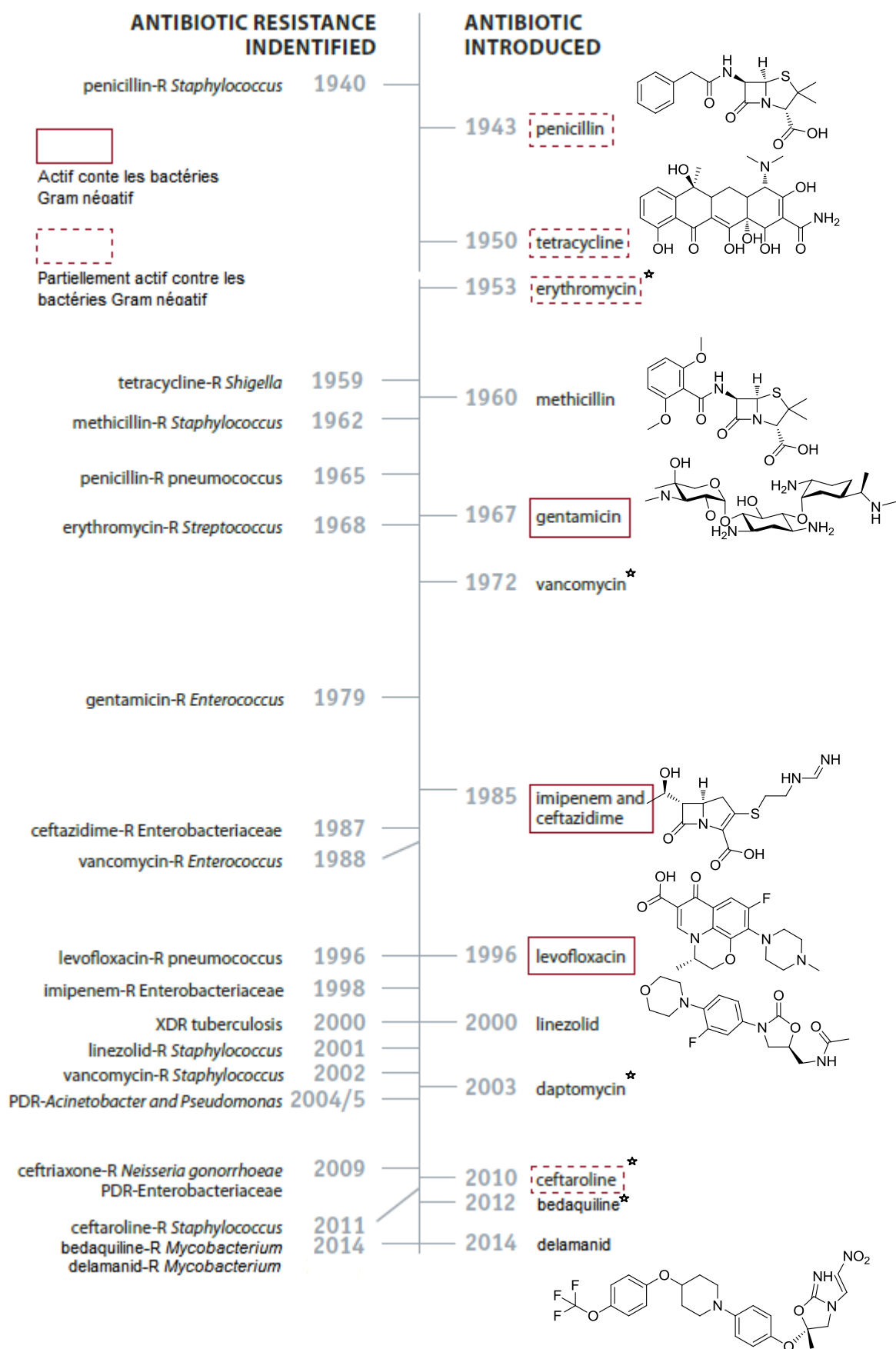


Figure 11. Découverte des différents antibiotiques et apparition des résistances [33] (*: pour les structures, cf Figures 10 et 12).

Alors qu'aucune famille d'antibiotique n'apparaît pendant 40 ans, les résistances bactériennes n'ont cessé de croître. Les bactéries ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter*) représentent aujourd'hui une sérieuse menace pour la santé publique.

En 2000, une nouvelle classe d'antibiotiques fait toutefois son apparition. Il s'agit des oxazolidinones représentés par le linézolide. Ce composé permet de traiter efficacement une large gamme de bactéries à Gram positif et notamment les *S. aureus* résistants à la méthicilline et les enterococci résistants à la vancomycine. La daptomycine est également commercialisée en tant que lipopeptide antibiotique. Plus récemment, deux antituberculeux ont fait leur apparition, la bédaquiline et le délamanide [34,35]. Ils sont actifs contre les formes latentes de *M. tuberculosis* et ont permis ainsi de réduire la durée de traitement extrêmement longue pour cette pathologie, particulièrement pour les souches résistantes.

Les antibiotiques peuvent agir différemment, soit en bloquant la croissance bactérienne (antibiotique bactériostatique) soit en détruisant ces micro-organismes (antibiotiques bactéricides). Aujourd'hui, plus de cent antibiotiques sont répertoriés par la pharmacopée européenne. Pour la plupart, ils sont classés, en fonction du mode d'action de la molécule, en trois grandes catégories :

- les inhibiteurs de la synthèse de peptidoglycane (β -lactames...)
- les inhibiteurs de la synthèse protéique (macrolides, tétracyclines...)
- les inhibiteurs de la transcription ou de la réplication de l'ADN (quinolones, ansamycines, sulfonamides)

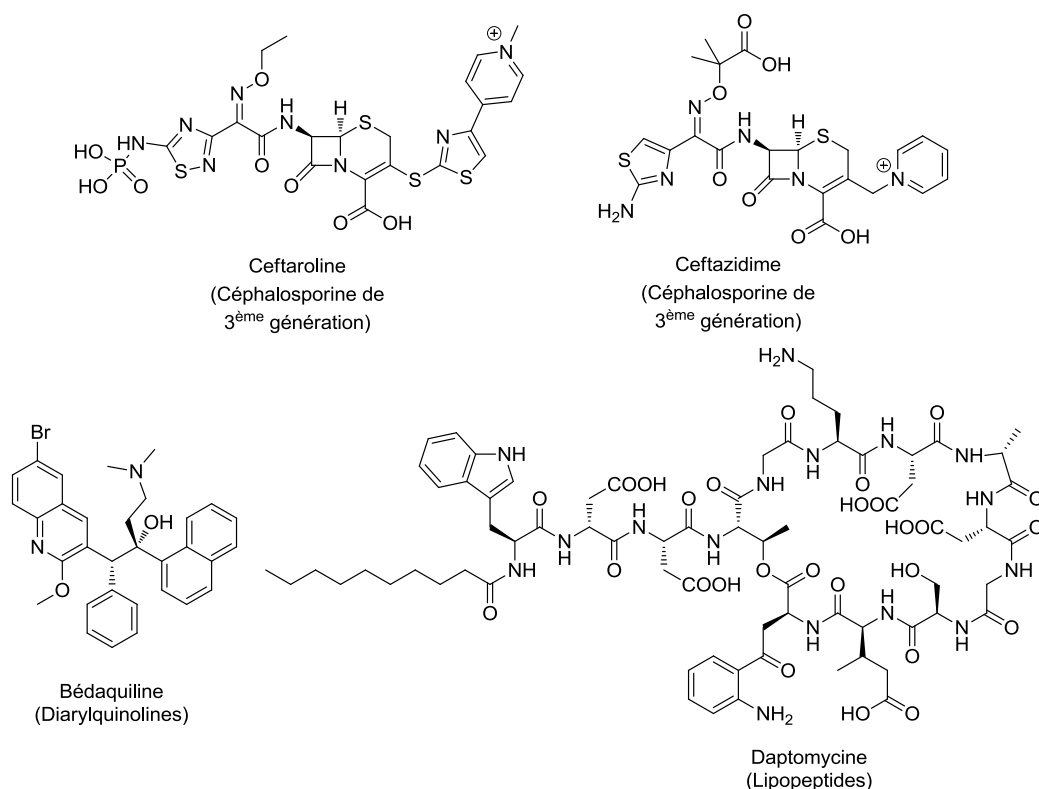


Figure 12. Structure de quelques exemples d'antibiotiques : Ceftaroline, Ceftazidime, Bédacilline, Daptomycine.

Dans le chapitre suivant, nous développerons les mécanismes d'action de deux classes d'antibiotiques, les β -lactames et les fluoroquinolones, qui nous intéressent particulièrement. En effet, nous souhaitons greffer des représentants de ces deux familles d'antibiotiques à des analogues de sidérophores obtenus au cours de cette thèse, afin de combattre les résistances bactériennes.

2. β -lactames : cibles et mécanisme d'action

a. Cible des β -lactames : la synthèse du peptidoglycane

La paroi est une structure essentielle pour la bactérie. Le peptidoglycane qui entre dans sa composition est un hétéropolymère qui lui confère sa rigidité en formant un réseau hautement réticulé. Ce polymère est composé d'une chaîne linéaire glycane alternant une unité *N*-acétylglucosamine et une unité d'acide *N*-acétylmuramique reliées à une chaîne pentapeptidique.

La biosynthèse du peptidoglycane implique une trentaine d'enzymes bactériennes et comprend trois étapes principales détaillée à la Figure 13.

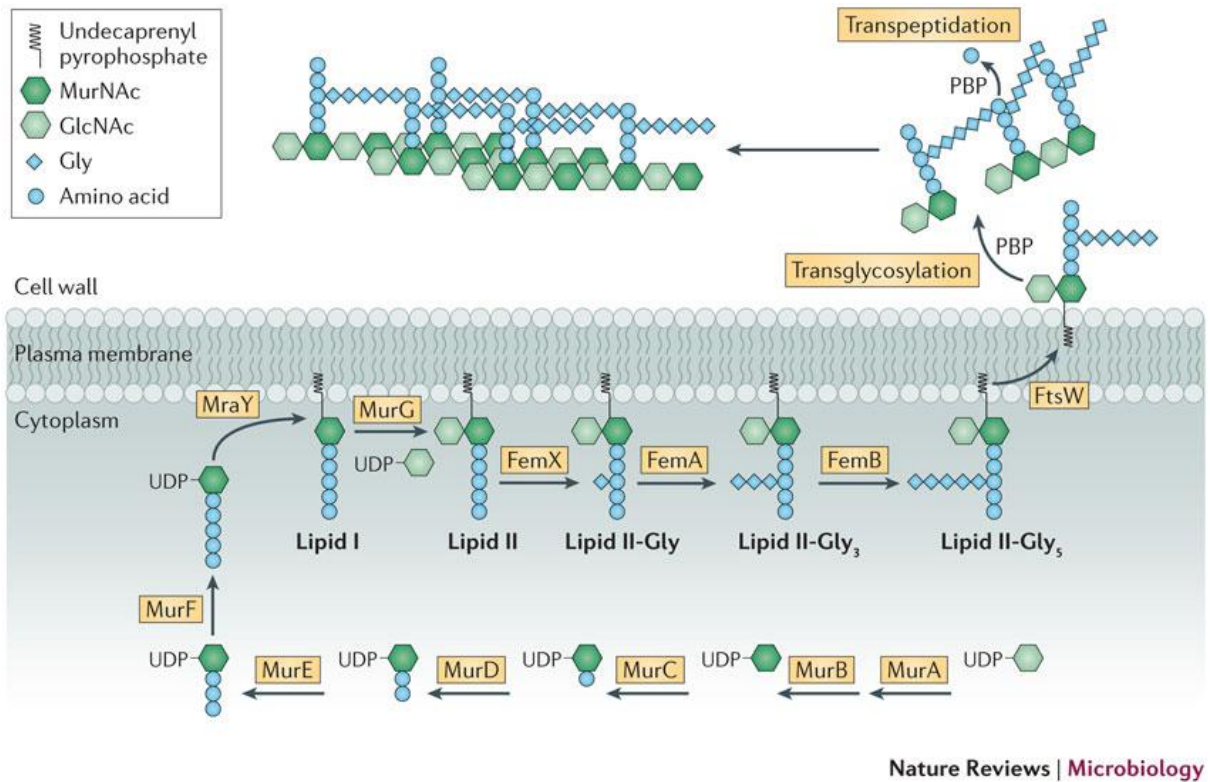


Figure 13. Synthèse du peptidoglycane [36].

La première étape, cytoplasmique, consiste en la synthèse des précurseurs nucléosidiques, l'UDP-*N*-acétylmuramyl-pentapeptide (UDP-MurNAc-pentapeptide) et l'UDP-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc). L'UDP-MurNAc est obtenu enzymatiquement à partir de la glucosamine, puis le pentapeptide est assemblé à cette unité.

La deuxième étape, membranaire, réside en la condensation de l'UDP-*N*-acétylmuramyl-pentapeptide avec l'UDP-*N*-acétyl glucosamine. Le précurseur UDP-MurNAc se lie à un transporteur lipidique, l'undécaprényl pyrophosphate. Une première réaction permet de former le disaccharide puis, un pont interpeptidique est greffé sur le troisième acide aminé du pentapeptide. Enfin l'unité formée est transférée vers le périplasme et le transporteur est régénéré.

La dernière étape, pariétale, permet l'allongement des chaines de peptidoglycane déjà présentes. Les penicillin-binding proteins (PBPs) catalysent les réactions de transpeptidation

et de transglycosylation qui conduisent à la réticulation du polymère. La glycine en position terminale du pont interpeptidique est liée à la D-alanine 4^{ème} position sur le pentapeptide L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala, relargant le 5^{ème} acide aminé de cette chaîne.

b. β -lactames : mécanisme d'action

Les β -lactamines appartiennent à une grande classe d'antibiotiques comprenant de nombreux dérivés tels que les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames ou encore les carbapénèmes. Tous possèdent un cycle azétidin-2-one, appelé β -lactame et qui joue un rôle primordial dans l'activité de ces molécules (Figure 14).

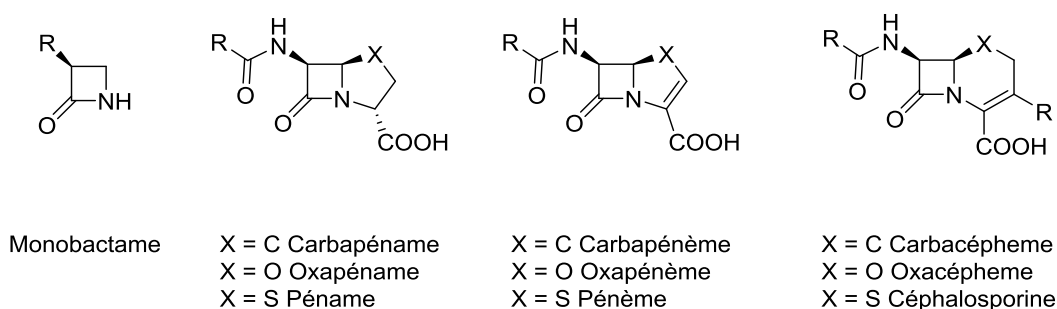


Figure 14. Structure des différentes classes de β -lactames.

L'un des exemples particulièrement aboutis en mesure de conception d'antibiotiques est celui des céphalosporines. Cette classe d'antibiotiques est la seconde famille découverte parmi les β -lactames et se distingue des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine. Les premières molécules découvertes et commercialisées possédaient une faible activité contre les bactéries Gram négatif telles que *Pseudomonas sp.* ou *Acinetobacter sp.* Une seconde génération de molécules, issues de l'hémisynthèse, a alors été développée et a permis d'élargir légèrement le spectre d'activité sur les bactéries à Gram négatif. Puis, une troisième génération a vu le jour, particulièrement active contre les bactéries à Gram négatif résistantes, avec par exemple, la ceftazidime (Figure 12). En plus de posséder une bonne résistance vis-à-vis des bêta-lactamases, ces antibiotiques ont d'excellentes propriétés pharmacocinétiques, leur permettant de pénétrer le système nerveux central. La ceftaroline, une des dernières céphalosporines, commercialisée en France en 2012, est remarquable pour son activité contre les souches *S. aureus* résistantes à la méticilline et les bactéries Gram positif. Elle conserve l'activité des céphalosporines des générations

précédentes en possédant un large spectre contre les bactéries Gram négatif. Au total, plus de cinquante molécules appartenant à cette classe ont été développées et certaines sont encore couramment utilisées telles que la ceftazidime. Les carbapénèmes et notamment l'imipénème ont également apporté des solutions efficaces pour lutter contre les bactéries Gram négatif.

Les β -lactames possèdent un pouvoir bactéricide en inhibant les PBPs, impliquées dans la réticulation du peptidoglycane. L'intégrité de cette structure rigide est essentielle pour que la cellule conserve une stabilité osmotique et soit protégée du milieu hostile dans lequel elle évolue. Le cycle β -lactame, présent dans les molécules de cette famille, possède une similarité stérique avec le motif D-alaninyl-D-alanine situé à l'extrémité du pentapeptide L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala impliqué dans la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (Figures 13 et 15).

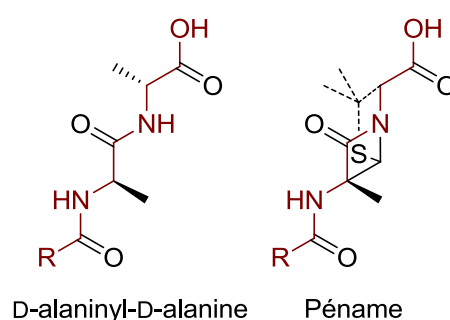


Figure 15. Analogie structurale entre un pénème et le dipeptide D-alaninyl-D-alanine impliqué dans la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane.

Les PBPs utilisent de ce fait l'antibiotique β -lactamique comme substrat suicide, entraînant la formation d'un complexe stable qui l'inactive de façon permanente (Figure 16). En effet, la sérine présente dans le site actif de ces PBPs ouvre le cycle β -lactame présent sur l'antibiotique par addition nucléophile créant ainsi une liaison covalente entre ces deux molécules. La synthèse de la paroi bactérienne ainsi ralentie, voire stoppée, induit la dégradation progressive du peptidoglycane allant jusqu'à la lyse de la cellule.

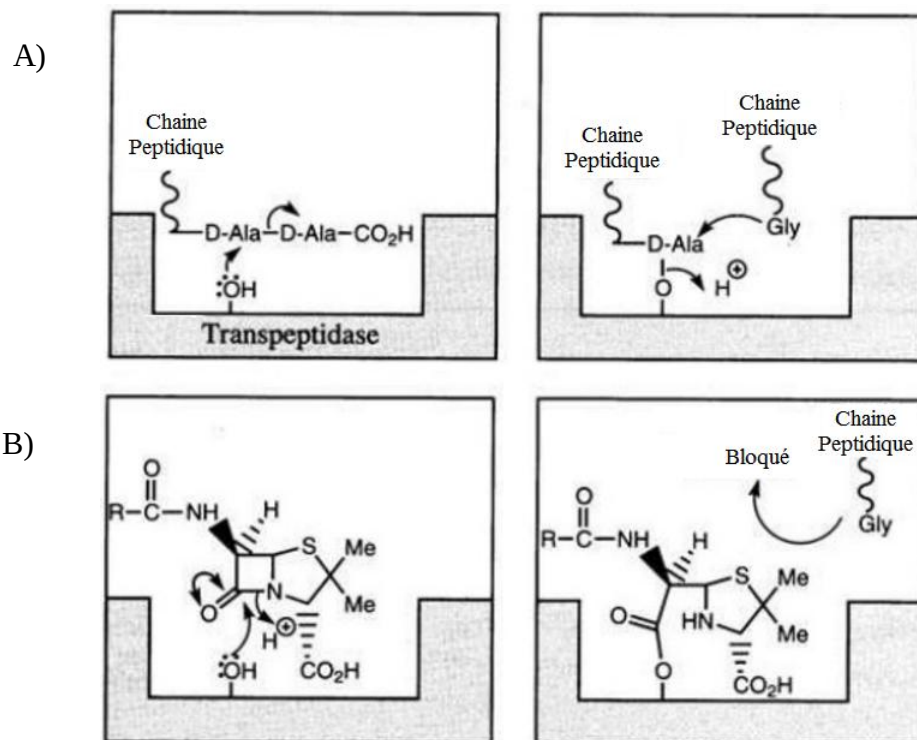


Figure 16. A) Rôle de la PBP dans la biosynthèse du peptidoglycane ; B) Mécanisme d'inhibition des PBPs par les β -lactames.

3. Quinolones : cibles et mécanisme d'action

a. Cible des quinolones : gyrase et topoisomérase IV

La réplication de l'ADN, sa transcription en ARN et la division cellulaire nécessitent la régulation de la densité chromosomique. Les topoisomérases de type II possèdent la capacité d'altérer la topologie du matériel génétique en passant un fragment de double hélice à travers la fracture provisoire d'un second segment d'ADN double brin. Les bactéries possèdent généralement deux enzymes appartenant à cette classe : la gyrase et la topoisomérase IV. La première possède la propriété inhabituelle d'induire un surenroulement négatif de l'ADN en amont de la fourche de réplication. Cela facilite la réplication future de l'ADN car ce surenroulement négatif neutralisera le surenroulement positif induit lors de l'ouverture de la double hélice. Elle joue également un rôle essentiel dans la recombinaison, la transcription et le maintien de la densité chromosomique.

La figure ci-dessous (Figure 17) représente le mécanisme d'action de la gyrase. Deux protomères GyrA (violet) et deux protomère GyrB (orange) forment cette enzyme. Dans un

premier temps, la gyrase se lie au segment G (en bleu) au niveau de son site actif (1). Le domaine C-terminal d'une unité GyrA (cercle violet) permet de former une boucle avec un surenroulement positif entre le segment G et le segment T (en rouge) (2). En se liant aux sous-unités GyrB, les molécules d'ATP induisent un changement de configuration, ouvrant le segment G et faisant passer le segment T au travers de l'ouverture formée (3). L'hydrolyse de l'ATP et la libération du segment T permettent d'induire deux surenroulements négatifs (4-6).

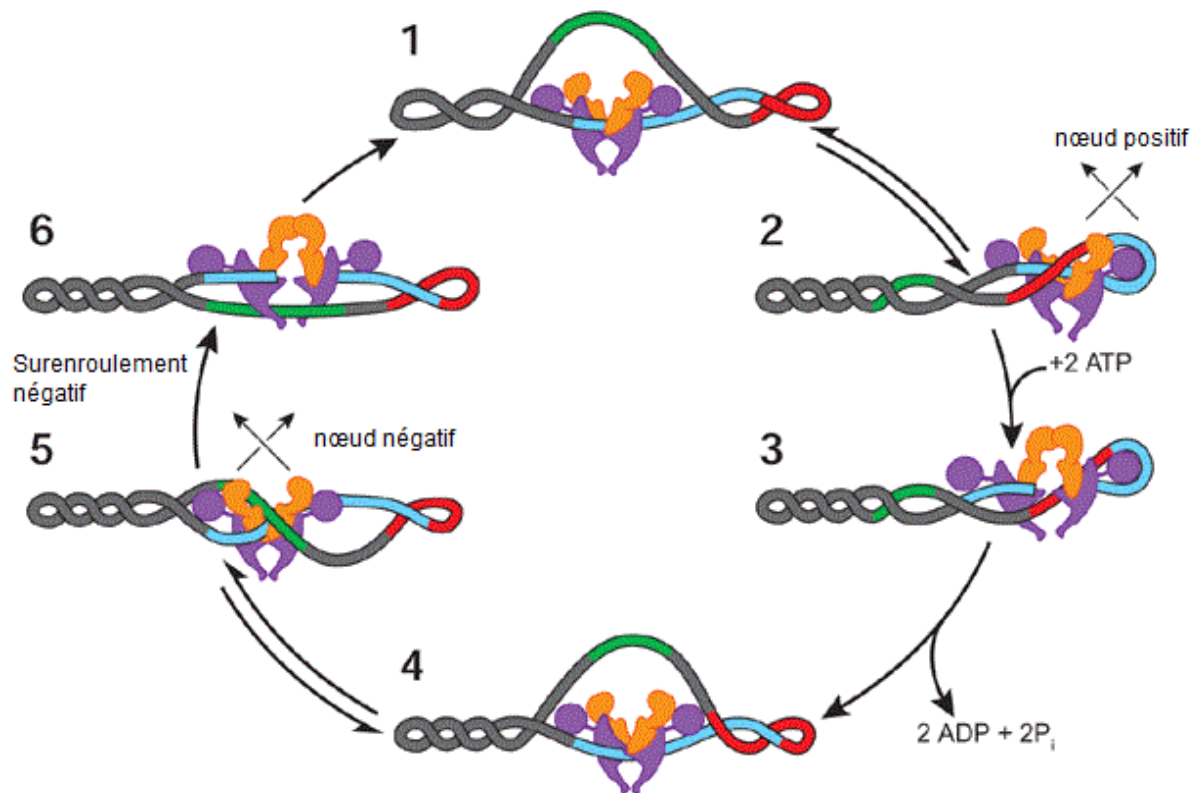


Figure 17. Induction d'un surenroulement négatif de l'ADN par la gyrase [37].

La topoisomérase IV, quant à elle, joue un rôle essentiel dans la ségrégation des chromosomes frères intriqués. En effet cette enzyme catalyse principalement les réactions intermoléculaires de caténation/décaténation.

b. Les quinolones : mécanisme d'action

Les quinolones sont une famille de composés synthétiques particulièrement actifs contre les bactéries à Gram négatif (Figure 18). Les quinolones connaissent une évolution

visant à limiter leur toxicité tout en élargissant leur spectre d'activité. Les fluoroquinolones de quatrième génération, de par leur action sur la gyrase et la topoisomérase IV, parviennent à limiter l'apparition de résistances. La levofloxacin est aujourd'hui un antibiotique incontournable possédant une excellente activité contre de nombreuses souches résistantes telles que *Staphylococcus aureus* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Toutefois, de nombreux effets secondaires accompagnent la prise de ces dérivés et leur prescription est notamment contre-indiquée pour les enfants.

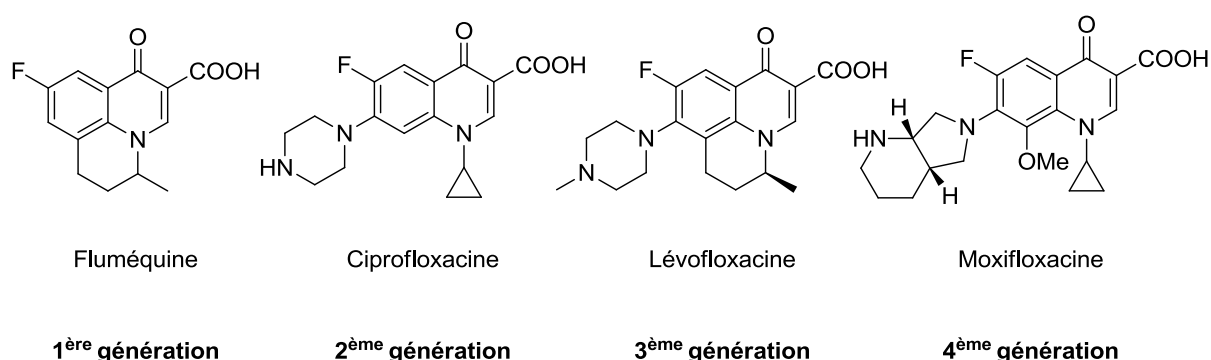


Figure 18. Exemples de structure de fluoroquinolones.

Le pouvoir bactéricide des quinolones est dépendant de la stabilité du complexe qu'elles forment avec les topoisomérases de type II et l'ADN clivé. Des études tendent à prouver que la fracture du double brin s'effectue une fois que l'antibiotique s'est lié à l'enzyme. Les quinolones possèdent ainsi le pouvoir de générer des fractures du double brin qui sont piégées par les topoisomérases, compromettant alors l'activité de ces enzymes. Le complexe quinolone-topoisomérase-ADN stoppe la réplication au niveau des fourches de réplication, entraînant l'arrêt de la synthèse d'ADN, provoquant un effet bactériostatique et pouvant conduire à la mort cellulaire.

L'apparition de fractures doubles brins dans l'ADN de la bactérie induit la mise en application du système de réparation SOS. Des enzymes de réparation de l'ADN sont alors activées. Il a été démontré qu'empêcher l'activation de ce système de survie augmente les propriétés bactéricides des quinolones [38].

D'autres études ont démontré l'importance de la synthèse protéique lors de ces traitements. En effet, lors d'un cotraitement quinolone-chloramphénicol, l'activité bactéricide des quinolones les moins puissantes est inhibée [39]. Il semblerait donc qu'il y ait une relation entre la formation des complexes quinolone-topoisomérase-ADN et la réponse bactérienne (via l'expression, induite par le stress, de protéines) concernant les propriétés bactéricides des quinolones.

Ces enzymes sont ciblées par les quinolones. La ciprofloxacine, qui appartient à cette famille d'antibiotiques, est la plus active et possède le spectre d'activité le plus large parmi les antibactériens actuellement utilisés en clinique. Ces molécules agissent en augmentant le nombre de complexes covalents enzyme-ADN clivé. Bien que nécessaire, cette étape doit être transitoire. Les quinolones empoisonnent les topoisomérases de type II en les transformant en toxines qui créent des ruptures du double brin d'ADN dans le génome bactérien. D'autre part, ces enzymes inhibent l'activité catalytique des topoisomérases de type II. Ainsi, les cellules bactériennes sont privées des fonctions cruciales réalisées par ces enzymes omniprésentes.

Cette famille de composés possède des candidats extrêmement efficaces pour lutter contre les bactéries à Gram négatif. Toutefois, leur toxicité vis-à-vis de l'Homme et les phénomènes de résistances de plus en plus présents tendent à limiter leur utilisation.

Comme nous l'avons vu précédemment, des souches résistantes sont rapidement apparues après la commercialisation des antibiotiques. Comprendre ces phénomènes est essentiel afin de pouvoir les limiter et de proposer de nouvelles antibiothérapies toujours plus efficaces.

D. Les résistances bactériennes

Il existe deux grandes catégories de résistances nommées intrinsèques et acquises. Les résistances intrinsèques comprennent les caractères que possèdent toutes les souches d'une même espèce pour résister aux antibiotiques. La présence d'une membrane peu perméable chez les bactéries à Gram négatif telles que *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*, ou la présence de pompes à efflux constitutives en sont des exemples. Ce type de résistance est transmis verticalement, c'est-à-dire aux descendants issus de l'espèce.

Les résistances acquises sont le résultat d'une mutation ou de l'incorporation de matériel génétique (plasmide, transposon, intégron etc) permettant de tolérer des concentrations en antibiotique plus élevées que celles inhibant les souches sensibles. Seul

certaines individus de l'espèce possèdent ou acquièrent ces caractéristiques. Sa diffusion se fait de manière latérale, c'est-à-dire que la résistance se propage dans le monde bactérien et n'est pas nécessairement transmise à la descendance.

Les mécanismes de résistance acquise peuvent être classés en trois catégories :

- la mutation et protection des cibles de l'antibiotique,
- la modification/dégradation de l'antibiotique,
- la limitation de la concentration intracellulaire en antibiotique.

1. Mutation des cibles

L'action des antibiotiques est étroitement liée à la haute affinité qu'ils possèdent pour leur cible. Suite à une modification particulière de la structure de la cible, l'interaction de l'antibiotique est ainsi réduite confiant à la bactérie une résistance à l'antibiotique. Les souches pathogènes qui posséderont cette mutation seront sélectionnées car celles non mutées seront éliminées sous l'action de l'antibiotique.

Par exemple, *Neisseria gonorrhoeae* possède quatre PBPs, nommées PBP 1, 2, 3, et 4. Seules les deux premières sont essentielles à la survie de cette bactérie et sont particulièrement ciblées par les antibiotiques de type pénicilline. Les souches résistantes de cette espèce possèdent le gène *penA* qui code pour des formes modifiées de PBP 2. La cinétique d'action de l'antibiotique sur ces protéines est réduite d'un facteur 10, en comparaison avec les souches sauvages. De même, le gène *ponA* induit la formation de PBP 1 modifiées, moins sensibles aux β -lactames. Ce gène ne change qu'un seul acide aminé dans la séquence primaire mais contribue à réduire la cinétique d'action de l'antibiotique d'un facteur quatre.

Ces souches sont capables d'effectuer des transgénèses et des recombinaisons homologues, conduisant à la dissémination de la résistance et contribuant à l'émergence de souches hautement résistantes aux β -lactames. La résistance aux fluoroquinolones suit un processus similaire. Les gènes codant pour les sous-unités de la gyrase ou celles de la topoisomérase IV peuvent être mutés sans modifier l'action de cette protéine. L'affinité des molécules thérapeutiques pour ces molécules est ainsi diminuée, ce qui entraîne une baisse de l'activité de l'antibiotique.

Les bactéries peuvent également diminuer l'affinité des antibiotiques pour leurs enzymes en effectuant des modifications post-traductionnelles. Les gènes codant pour les protéines cibles ne sont pas mutés, mais les protéines une fois synthétisées pourront être ensuite méthylées afin de diminuer l'affinité des antibiotiques pour ces enzymes. Par exemple, ce mécanisme de méthylation est très fréquent chez les bactéries résistantes aux macrolides. Une méthylase (gène *erm*) permet une méthylation de la protéine, modifiant le site où se fixent ces antibiotiques. Les gènes codant pour ces enzymes permettant ces modifications post-traductionnelles sont souvent retrouvés sur des plasmides, induisant une large dissémination de la résistance au travers de la population bactérienne.

D'autres mécanismes de résistance aux antibiotiques existent. Certaines souches résistantes aux quinolones synthétisent une protéine codée par le gène *qnr*. Cette molécule interagit avec les gyrases et les topoisomérases IV complexées avec l'antibiotique, permettant la dissociation du complexe. L'activité de ces enzymes est ainsi rétablie

2. Modification/dégradation de l'antibiotique

Certaines bactéries ont développé la capacité de dégrader l'antibiotique. L'exemple des β -lactamases est certainement le plus connu, mais ils existent bien d'autres enzymes capables de dégrader différents antibiotiques, tels que les aminoglycosides ou les macrolides. Certaines enzymes ne peuvent dégrader que quelques antibiotiques appartenant à une même classe. Par exemple, parmi les β -lactames, les pénicillines, les carbapénèmes et les céphalosporines ne seront pas dégradées par les mêmes enzymes. Néanmoins la présence de β -lactamases à large spectre chez les souches résistantes est de plus en plus courante.

D'autres stratégies ont été développées par les bactéries afin d'inhiber l'action des antibiotiques. La présence d'enzyme catalysant l'ajout d'un groupement chimique sur l'antibiotique tel qu'un groupement acyle, phosphate, nucléotidyle ou encore ribosyle en est un exemple [40]. Cet ajout permet de limiter la fixation de la molécule thérapeutique sur sa cible, et donc de limiter son action. Les aminoglycosides qui possèdent de nombreuses fonctions alcools et amines sont particulièrement concernés. Il existe trois grandes classes d'enzymes modifiant cet antibiotique : les acyltransférases, les phosphotransférases et les nucléotidyltransférases. Ces enzymes sont toutes trois capables d'interagir avec les aminoglycosides car leur site actif imite le site de fixation du ribosome sur lequel agissent les antibiotiques.

3. Limitation de la concentration intracellulaire en antibiotique

L'efficacité d'un antibiotique est fortement liée à sa concentration intracellulaire. Les bactéries ont donc développé deux mécanismes afin de limiter l'action de ces molécules. D'une part, les micro-organismes sont capables de réduire leur perméabilité membranaire et d'autre part, l'expression de pompes à efflux leur permet de réduire la concentration cytoplasmique en antibiotique.

a. Réduction de la perméabilité membranaire

En comparaison avec les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif sont intrinsèquement moins perméables aux antibiotiques, leur membrane externe formant une véritable barrière. Les antibiotiques hydrophiles parviennent à traverser cette membrane en diffusant au travers de porines. La diminution du nombre de porines ou leur mutation permet à ces bactéries de réduire la perméabilité membranaire et ainsi de limiter la diffusion des antibiotiques.

b. Amélioration des systèmes d'efflux

Les pompes à efflux peuvent extraire un substrat spécifique ou une large gamme de molécules comprenant les composés bactéricides. Ces dernières sont souvent retrouvées chez les bactéries résistantes [41]. En effet, les pompes à efflux bactériennes permettent de transporter de manière active de nombreux antibiotiques du milieu intérieur vers le milieu extérieur. De ce fait, la concentration cytoplasmique en antibiotique diminue et les pathogènes parviennent à survivre [42].

Cinq grandes familles de pompes à efflux actif ont été répertoriées chez les bactéries : MF (Major Facilitator), MATE (MultiDrug and Toxic Efflux), RND (resistance-nodulation-resistance), SMR (Small Multidrug Resistance), et ABC (ATP Binding Cassette) [43]. Les pompes à efflux MF et RND sont les plus abondantes. La famille MF possède un spectre d'activité étroit (généralement limité à une ou deux classes d'antibiotiques). Elle est retrouvée à la fois chez les bactéries à Gram négatif et positif. En revanche, la famille de pompes à efflux RND est essentiellement présente chez les bactéries à Gram négatif. Elle est capable de

reconnaitre de nombreuses classes d'antibiotiques, des composés antiseptiques, des colorants ou encore des détergents [44].

Il a été démontré que tous les génomes bactériens contiennent différentes pompes à efflux mais les gènes codant pour les pompes à efflux peuvent également être retrouvés dans des plasmides [43]. Dans la plupart des cas, ces gènes font partie d'un opéron comprenant un gène de régulation de l'expression. Chez *E. coli*, la surexpression de *acrAB* confère à cette bactérie une résistance pour certains antibiotiques [45]. Il est maintenant communément admis que l'expression de pompes à efflux est une première étape vers la résistance aux antibiotiques [46].

Ces systèmes d'efflux sont plus régulièrement responsables des phénomènes de résistances chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif. Dans la famille des *Enterobacteriaceae*, les pompes RND sont les plus exprimées et confèrent différents types de résistance: i) une résistance croisée pour une classe d'antibiotiques, ii) une résistance inhérente pour certains agents spécifiques, iii) une résistance non spécifique acquise par la surexpression des pompes à efflux.

De nombreuses stratégies sont actuellement étudiées afin de combattre les résistances bactériennes. Certaines antibiothérapies se révèlent parfois inefficaces contre les micro-organismes formant des biofilms. Les pathogènes présents dans ces structures, en sécrétant une matrice extracellulaire polymérique, parviennent en effet à limiter la diffusion des antibiotiques.

Enfin, un autre défi pour les antibiothérapies réside dans le traitement de pathogènes intracellulaires. Certaines souches telles que *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, ou encore *Plasmodium falciparum* parviennent à survivre dans les cellules humaines, rendant l'infection latente ou récurrente. Cette capacité leur fournit une excellente protection vis-à-vis des défenses de l'hôte et des antibiotiques. En effet, certaines familles d'antibiotiques, telles que les β -lactames et les aminoglycosides, ne parviennent pas à pénétrer les cellules humaines du fait de leur caractère hautement hydrophile. Ainsi, la concentration en antibiotique intracellulaire est souvent trop faible pour posséder un effet bactéricide. Il résulte de ce phénomène une augmentation des résistances qui ne peut être solutionnée que par de fortes concentrations en antibiotique, qui se révéleraient trop toxique pour l'hôte.

L'utilisation de nouvelles générations d'antibiotiques, de nouvelles substances naturelles possédant des propriétés bactéricides, de thérapies combinées ou encore la vectorisation de composés antibactériens sont des approches largement étudiées dans ce domaine. Mais, en dépit des besoins urgents, la découverte de nouvelles antibiothérapies et la conception de nouveaux agents bactéricides progressent lentement [47]. De plus, parmi les molécules en essais cliniques, une grande majorité n'est efficace que contre les bactéries à Gram positif.

II. Nouvelles avancées en antibiothérapie : molécules en essais cliniques et utilisation des systèmes d'acquisition du fer comme cible thérapeutique

A. Antibiotiques en essais cliniques

Pour combattre plus efficacement les résistances bactériennes, la recherche de nouvelles antibiothérapies est nécessaire. Nous retrouvons comme antibiotiques actuellement en essais cliniques, quelques produits naturels (l'acide tannique, la novobiocine, le gallate d'épigallocatechine et le sesquiterpène) et des molécules appartenant aux classes d'antibiotiques telles que les néoglycosides, les fluoroquinolones, les tétracyclines ou encore les macrolides. Les principaux antibiotiques actuellement en essais cliniques, et actifs contre les bactéries à Gram négatif, sont des fluoroquinolones et des tétracyclines (Tableaux 1a et b). Ces molécules sont développées afin de lutter plus efficacement contre les souches résistantes.

Tableau 1a. Molécules synthétiques actuellement en essais cliniques.

Classe d'antibiotiques	Nouvel agent antibactérien	Mécanisme d'action	Avantages	Phase/AMM
Neoglycoside	Plazomycine	Inhibiteur de la synthèse protéique	Résistance à l'inhibition enzymatique Actif contre les souches hospitalières résistantes	III
Fluoroquinolone	Delafloxacin	Inhibiteur de la gyrase	Efficace pour lutter contre les souches résistantes aux quinolones	Juin 2017
	Finafloxacin	Inhibiteur des topoisomérases de type II	Efficace contre <i>Helicobacter pylori</i> Activité accrue à pH acide	Dec. 2014
	Nemonoxacin	Inhibiteur de la topoisomérase IV	Large spectre d'activité, notamment contre les souches résistantes à la vancomycine	III
Tétracycline	Omadacycline	Inhibiteur de la synthèse protéique	Actif contre les <i>Enterobacteriaceae</i> produisant des β -lactamases à large spectre.	III
	Eeavacycline	Inhibiteur de la synthèse protéique	Large spectre d'activité contre les bactéries à Gram négatif	III
Pleuromutiline	Lefamuline	Inhibiteur de la synthèse protéique	Innocuité et bonne tolérance	III
Macrolide	Cethromycine	Inhibiteur de la synthèse protéique	Fiable pour traiter les infections respiratoires	III

Tableau 1b. Molécules naturelles actuellement en essais cliniques.

Produit naturel	Famille	Mécanisme d'action	Spectre d'activité
Gallate d'épigallocatechine	Catéchines	Rupture de la membrane et perte d'ATP	Gram positif et Gram négatif
Acide tannique	Tannins	Inactivation des adhésines microbiennes et des protéines de transport de la membrane externe	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>
Novobiocine	Coumarines	Inhibiteur de la gyrase	<i>Corinebacterium diphtheria</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptomyces pneumoniae</i> , <i>Streptomyces pyogenes</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Pasteurella</i>
Sesquiterpène	Terpénoïdes	Rupture de la membrane	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Les combinaisons thérapeutiques ont également été largement étudiées pour des infections qui impliquent des bactéries particulièrement virulentes pour l'Homme. Ces stratégies sont régulièrement utilisées lorsqu'une thérapie avec un seul antibiotique se révèle inadaptée de par sa toxicité et/ou son inefficacité. Les combinaisons thérapeutiques possèdent de nombreux avantages justifiant leur utilisation : i) un effet synergique entre les antibiotiques permettant de lutter efficacement contre les bactéries résistantes, ii) une limitation de l'apparition de résistances, iii) une activité bactéricide élevée y compris contre les micro-organismes associés sous forme de biofilm, iv) une pénétration des tissus et des cellules accrue, v) une réduction de la production d'enzymes et de toxines [48]. Ainsi, la combinaison quinupristine/dalfopristine [49] montre un effet synergique entre ces deux antibiotiques et est utilisée pour traiter des infections dues au genre *Enterococcus* résistant à la vancomycine.

L'efficacité des antibiotiques peut également être améliorée en utilisant des techniques de vectorisation. Appliquée à un antibiotique seul ou en combinaison, la vectorisation permet de contourner les phénomènes de résistances. Un système idéal de vectorisation doit être capable d'internaliser spécifiquement l'agent thérapeutique au sein du pathogène sans être reconnu par les cellules des tissus de l'hôte. La vectorisation peut se faire par la mise en place d'une formulation spécifique de l'antibiotique (encapsulation dans des liposomes) [50] ou par l'utilisation d'un système de transport spécifique du pathogène visé et impliqué dans la virulence de l'infection.

Dans ce contexte, la voie des sidérophores est de plus en plus étudiée. En utilisant la stratégie du « Cheval de Troie », des antibiotiques incapables de traverser la paroi bactérienne

peuvent alors être couplés de façon covalente aux sidérophores ou à des analogues. Le pathogène, en reconnaissant les complexes sidérophore-Fe(III), absorbera également l'antibiotique (β -lactame, fluoroquinolone,...) lié au sidérophore (Figure 19B). L'antibiotique pourra être vectorisé dans le périplasme ou dans le cytoplasme bactérien en fonction de la nature du sidérophore et la souche ciblée. Cette approche peut ainsi permettre de véhiculer des antibiotiques nouveaux mais également de « recycler » d'anciens antibiotiques moins utilisés à cause des résistances. Elle peut également i) donner une nouvelle vie aux antibiotiques sujets aux problèmes de perméabilité membranaire (antibiotiques actifs contre les bactéries à Gram positif mais pas contre les bactéries à Gram négatif), ii) réduire les chances de résistances dues à un défaut de concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique, et iii) de limiter la toxicité de certains antibiotiques.

La stratégie du « Cheval de Troie » permet aussi de réduire la toxicité de métaux aux propriétés antibactériennes comme le gallium (Figure 19C). En effet, d'un point de vue atomistique le Ga(III) et le Fe(III) présentent la même charge, une configuration électronique similaire et un rayon ionique voisin. Ainsi, ces deux ions présentent des modèles de chélation identiques. Les organismes vivants ne pouvant pas différencier ces complexes, le complexe sidérophore-Ga(III) serait donc reconnu de la même manière que le complexe sidérophore-Fe(III). Mais, contrairement au Fe(III), le Ga(III) n'est pas réduit par les systèmes biologiques [51]. Il semble alors que le gallium puisse interférer avec les voies bactériennes de signalisation du fer et diminuer le transport de ce nutriment, induisant ainsi une inhibition de la croissance [52,53].

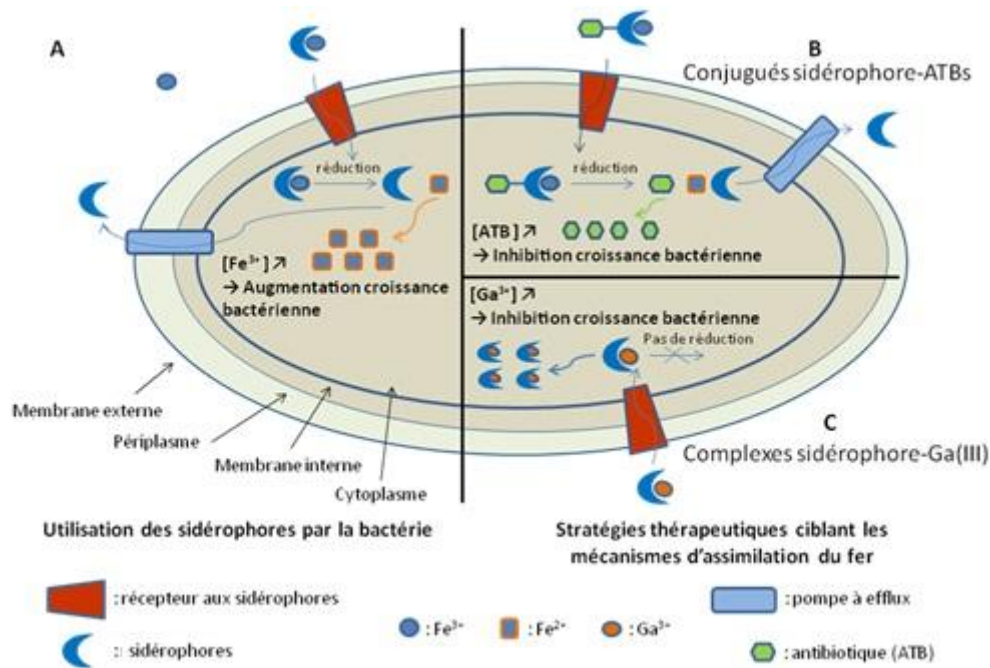


Figure 19. Représentation d'une bactérie à Gram-négatif. A. Représentation schématique du système d'acquisition du fer *via* les sidérophores. B. Représentation schématique de la stratégie thérapeutique utilisant des conjugués sidérophore-antibiotiques. C. Représentation schématique de la stratégie thérapeutique utilisant des complexes sidérophore-Ga(III).

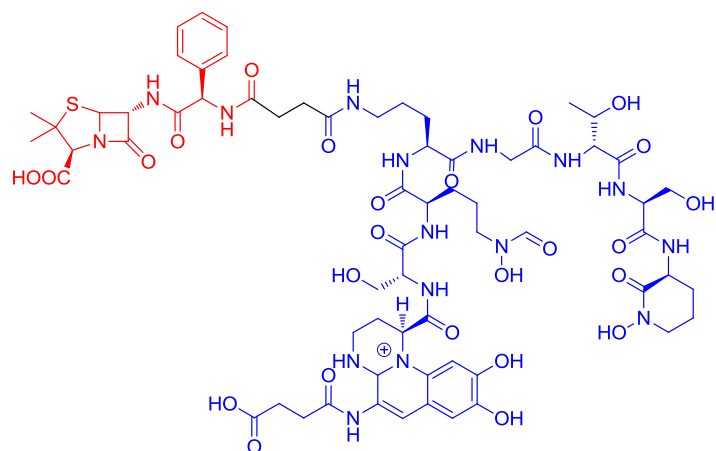
Afin de lutter contre les bactéries, les antibiotiques ciblent généralement les voies métaboliques essentielles à la survie de la bactérie telles que la synthèse de la paroi ou la réplication/transcription. Cependant, des stratégies se focalisant sur les facteurs de virulence, en les utilisant ou en les inhibant, apparaissent aujourd'hui comme d'excellentes alternatives pour contourner les problèmes de résistance. Deux types de molécules sont particulièrement étudiées : les conjugués sidérophore-antibiotique et les complexes sidérophore-Ga(III).

B. Les systèmes d'acquisition du fer comme cible thérapeutique

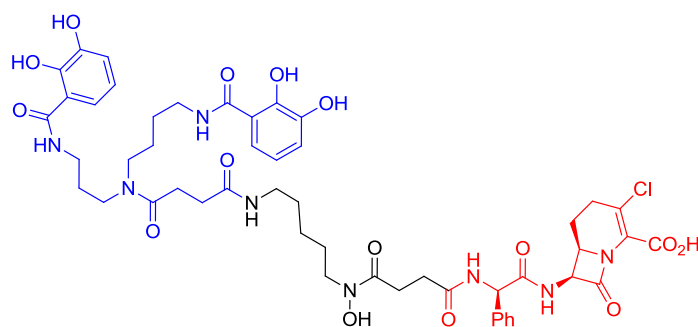
1. Les conjugués sidérophore-antibiotique

La stratégie du « cheval de Troie » a d'abord été observée chez des bactéries à Gram positif et négatif produisant des conjugués sidérophore-antibiotique naturels, les sidéromycines, impliqués dans la compétition microbienne. Quatre grandes familles ont été répertoriées : les albomycines, les ferrimycines, les salmycines et les microcines. L'albomycine δ_2 (Figure 20) possède une partie sidérophore similaire au ferrichrome et un fragment cytotoxique thioribosyl-pyrimidine. Ces deux parties sont reliées par une sérine qui peut être hydrolysée *in vivo* par la peptidase N. L'albomycine est reconnue et transportée activement sous l'action de FhuA et FhuD. Après internalisation, l'action de l'estérase permet de libérer la partie antibiotique inhibitrice de la séryl-ARN_t synthase. Les albomycines ont démontré leur efficacité lors d'études *in vitro* et *in vivo*, chez des modèles murins. Des concentrations inhibitrices minimales de 5 ng.mL⁻¹ ont été reportées. Enfin la partie antibiotique seule s'est révélée 30 000 fois moins active que l'albomycine contre des bactéries telles que *S. aureus* et *E. coli*, confirmant l'efficacité de cette vectorisation [54].

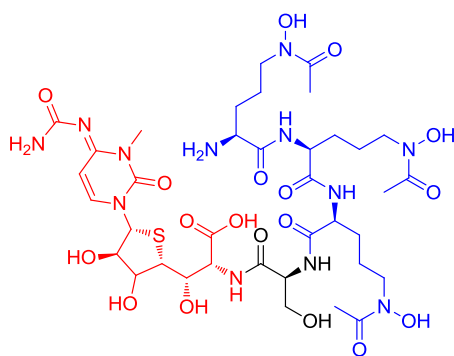
Inspirés par cette approche naturelle, des conjugués hémisynthétiques reliant la pyoverdine, sidérophore endogène de *P. aeruginosa*, à des antibiotiques classiquement utilisés en thérapeutique ont été étudiés. Par exemple, des Pvd- β -lactames (PvdATC27853-ampicilline, Figure 20) et des Pvd-fluoroquinolones ont été synthétisés et testés contre plusieurs souches *P. aeruginosa*. Les conjugués Pvd- β -lactames se sont souvent montrés plus actifs que le β -lactame seul tandis que les conjugués Pvd-fluoroquinolones se sont révélés moins actifs que la fluoroquinolone correspondante seule. Cette différence s'explique en partie par le fait que *P. aeruginosa* a un système d'internalisation du fer différent des autres bactéries à Gram négatif. En effet, chez cette espèce, le fer complexé au sidérophore est libéré dans le périplasme, lieu d'action des β -lactames, sous l'action d'une réductase [55]. Les fluoroquinolones, ayant une cible intracellulaire, ne seront pas vectorisées à proximité de leur cible. Miller *et al.* a également utilisé cette stratégie « cheval de Troie » en synthétisant le conjugué A qui est composé d'un ligand synthétique hexadentate lié à une carbacéphalosporine (lorabid) *via* un espaceur succinique. Le conjugué A s'est révélé 2 000 fois plus actif que le lorabid seul contre *A. baumannii* (Figure 20).



Pvd(ATCC27853)-ampicilline



Conjugué A



Albomycine δ_2

Figure 20. Structure de quelques conjugués sidérophore-antibiotique.

Curieusement, des conjugués de structure simple, composés d'un ligand bidentate (catéchol, hydroxypyridinone, hydroxamate), présentent une excellente activité contre les souches multirésistantes à Gram négatif. C'est le cas des conjugués MC-1[56], BAL30072 [57] et Cefiderocol [58] décrits à la figure 21.

Le conjugué MC-1 (Pfizer, 2012) est un monobactame qui s'est révélé efficace lors d'études *in vitro*. Cependant, son développement s'est montré problématique suite à une perte d'activité lors des tests *in vivo*. Suite à ces résultats, il semblerait que les tests précliniques aient été stoppés.

Le composé BAL30072 (Basilea Pharmaceutica, 2010) est, quant à lui, un conjugué composé d'une fonction hydroxypyridinone connecté à un monosulfactame. Il a montré une activité *in vitro* contre de nombreux bacilles multirésistants à Gram négatif. Bien que le motif hydroxypyridinone soit synthétique, il peut être reconnu par les récepteurs spécifiques aux sidérophores catéchols. Cette fonction chélatrice combine les avantages des fonctions hydroxamates et catécholates : i) les complexes formés sont de stœchiométrie 3 : 1 empêchant la formation de radicaux, ii) le complexe n'est pas chargé et peut diffuser au travers des membranes, iii) formation d'un cycle à cinq chaînons avec les oxygènes vicinaux lors de la chélation, iv) une affinité pour les protons plus faibles que pour le Fe(III). La phase I des essais cliniques pour cette molécule a révélé une hépatotoxicité. Des études sont actuellement en cours pour comprendre les mécanismes induisant des lésions au niveau des cellules hépatiques [59].

Enfin, le Cefiderocol/S-649266 (Glaxo Smith Kline, 2015) est le composé le plus récent et le plus prometteur. Grâce à sa résistance à l'hydrolyse par les β -lactamases, comprenant les carbapénémases et les lactamases à large spectre, ce composé possède une activité antimicrobienne importante notamment contre les *Enterobacteriaceae* multirésistantes. Cette molécule est actuellement en phase III des essais cliniques avec pour indication le traitement d'adultes ayant acquis différentes pathologies nosocomiales (notamment des pneumonies bactériennes). Dans cette étude, son activité antibiotique est comparée à celle du méropénème, utilisé comme molécule de référence.

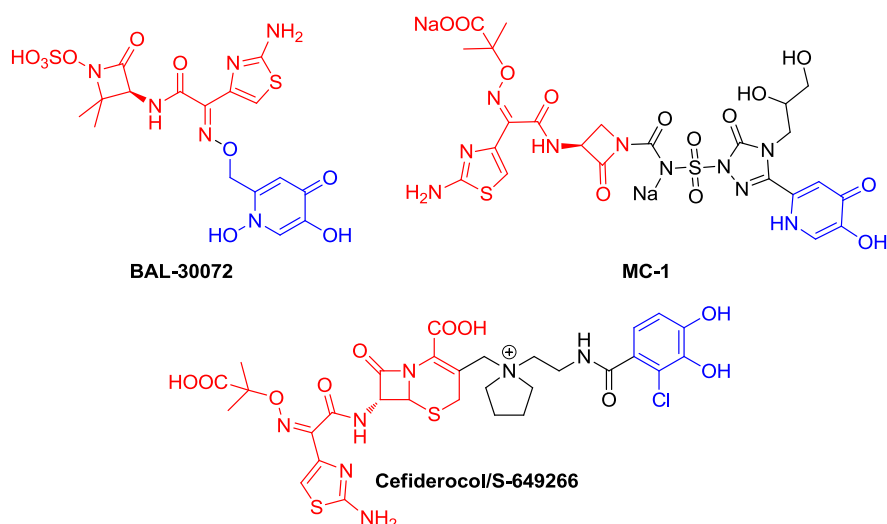


Figure 21. Conjugués sidérophore-antibiotique en essais cliniques.

La voie des sidérophores est également exploitée pour faire transiter des éléments autres que les antibiotiques. Des métaux tels que le gallium pouvant perturber le métabolisme du fer chez la bactérie, peuvent ainsi être vectorisés sous forme de complexes sidérophore-Ga(III).

2. Les complexes sidérophore gallium

Comme nous l'avons souligné précédemment, le gallium possède des caractéristiques atomistiques similaires au fer ferrique (rayon ionique, affinité électronique,...). Ainsi le Ga(III) peut entrer en compétition avec le Fe(III) et s'associer à des enzymes fer-dépendantes. Le Ga(III) ne pouvant être réduit, les réactions biologiques catalysées par ces enzymes, telles que la synthèse de l'ADN et de l'ARN, seront inhibées.

En 2007, Kaneko *et al.* [53] ont reporté que le nitrate de gallium possède des propriétés antibactériennes en inhibant la croissance de souches *Pseudomonas aeruginosa*. Ce complexe est également capable d'inhiber la croissance de bactéries présentes sous la forme d'un biofilm, en interagissant avec le système d'absorption bactérien du fer. Plus récemment, Banin *et al.* ont étudié l'effet d'un complexe Déféroxamine(DFO)-Ga(III) sur l'inhibition de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* [60]. Le choix de la DFO (Figure 22) se justifie par le fait que *P. aeruginosa* possède deux systèmes de transport pour le complexe DFO-Fe(III) [61,62]. Leurs résultats ont mis en évidence que le complexe DFO-Ga(III) est 10 à 100

fois plus efficace que le chlorure de gallium seul ou la gentamycine seule (antibiotique de référence). Ils ont également observé un effet synergique de l'association DFO-Ga(III)/gentamycine. L'effet antibactérien du nitrate de gallium a également été mis en évidence sur d'autres souches bactériennes et notamment sur des souches d'*Acinetobacter baumannii* multi-drogues résistantes qui nous intéresse plus particulièrement ainsi que sur des souches *M. tuberculosis* et *S. aureus* [63]. L'effet synergique de l'association colistine (antibiotique de référence) et du nitrate de gallium a également été souligné. Toutefois aucune étude n'a montré l'utilisation de complexe sidérophore-gallium chez *Acinetobacter baumannii*.

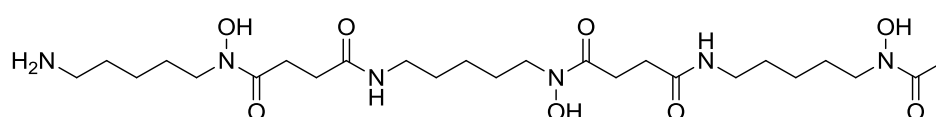


Figure 22. Structure de la DFO.

L'intérêt d'utiliser des complexes sidérophore-Ga(III) par rapport à un sel de gallium inorganique est double. D'une part si le sidérophore est convenablement choisi, il devrait y avoir une meilleure reconnaissance et donc une meilleure sélectivité pour la bactérie visée. D'autre part, même si le gallium est déjà utilisé en thérapeutique pour traiter notamment les hypercalcémies, son utilisation est limitée dû à sa néphrotoxicité. La partie sidérophore devrait donc permettre de vectoriser le gallium à l'intérieur de la bactérie tout en limitant sa toxicité chez l'hôte. Par exemple, il a été montré que le complexe DFO-Ga(III) avait des propriétés antioxydantes sur cellules humaines [64,65].

Quelques études ont montré l'intérêt de l'utilisation du gallium mais aussi des complexes sidérophore-Ga(III) dans la lutte antibactérienne. Toutefois, cette récente approche nécessite d'être développée afin notamment de mieux comprendre le mécanisme par lequel ces complexes agissent.

3. Autres potentialités des sidérophores

Les applications médicales des sidérophores ne sont pas limitées à la vectorisation de composés à propriétés antimicrobiennes. Les composés NBRI16716 sont des sidérophores produits par *Perisporiopsis melioides* qui ont montré une activité antitumorale intéressante (Figure 23). Des pharmacomodulations ont permis de montrer l'importance du groupement hydroxyle sur la position R₁, le composé NBRI16716C ne possédant pas ce groupement n'a pas montré d'activité. La croissance de la tumeur peut être contrôlée par les cellules saines l'entourant, notamment en inhibant la néovascularisation de la tumeur. Les molécules impliquées dans la régulation de ces phénomènes sont des cibles prometteuses. Les premiers tests *in vivo* ont confirmé l'activité antitumorale sur un modèle murin.

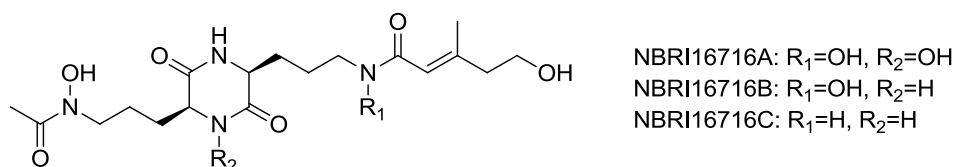


Figure 23. Structures des composés NBRI16716A, B et C.

4. Travaux du laboratoire

Notre laboratoire s'intéresse, depuis plusieurs années, au développement de nouvelles antibiothérapies pour lutter contre les pathogènes résistants ESKAPE. Dans ce but, de nouveaux conjugués sidérophore-antibiotique ciblant ces bactéries ont été synthétisés et testés afin d'estimer leur potentiel antibactérien. Des conjugués catéchol-ciprofloxacine, tels que A, B et C décrits à la figure 24, ont ainsi été obtenus et ont démontré une activité modérée de 8 à 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sur des souches *P. aeruginosa* sensibles (DSM 1117). Le composé C s'est révélé le plus actif contre la souche résistante (AM 85) avec une activité de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [66]. Par ailleurs, aucune activité hémolytique n'a été observée pour ces composés à des concentrations allant jusqu'à 384 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

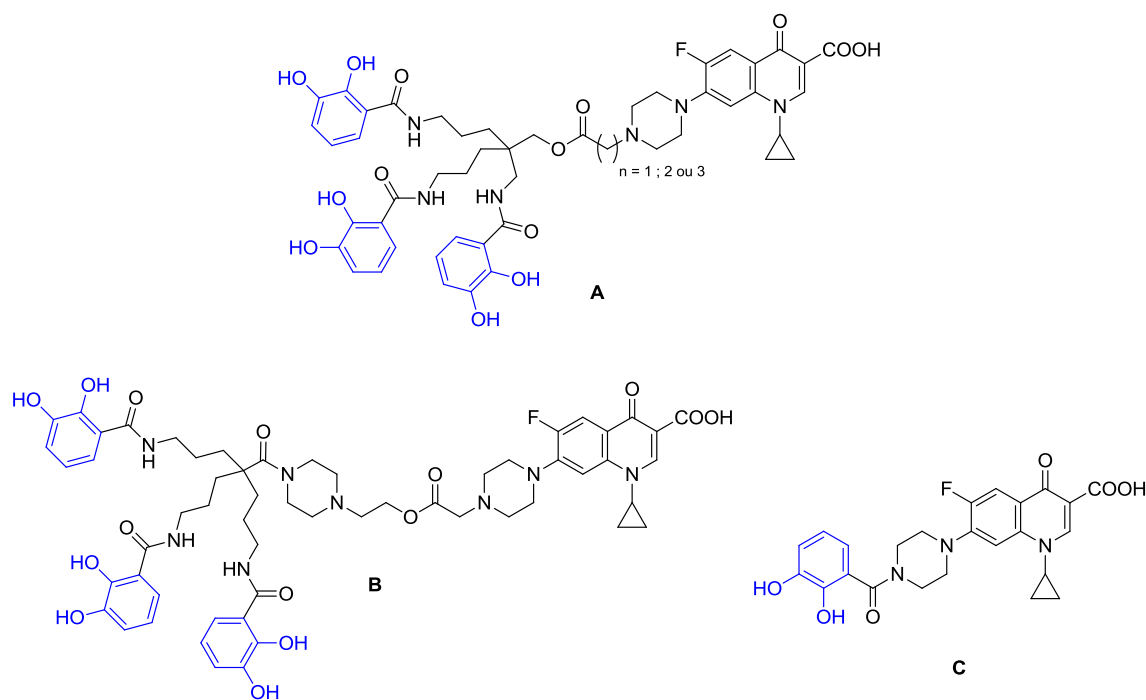


Figure 24 : conjugués catéchol-ciprofloxacine A, B et C obtenus au laboratoire.

L'hémisynthèse de conjugués antibiotiques avec le sidérophore principal de *P. aeruginosa*, tels que Pvd-ampicilline vu précédemment (Figure 20), est une stratégie intéressante pour lutter contre cette bactérie. Toutefois, l'utilisation de sidérophores naturels tels que la pyoverdine connaît certaines limites : i) la difficulté d'obtention de ces composés avec des rendements satisfaisants (nécessité d'effectuer des extractions de pyoverdines provenant de culture de *P. aeruginosa*), ii) les faibles possibilités de fonctionnalisation chimique qui compliquent la fixation d'un antibiotique sur des sidérophores tels que l'entérobactine, la parabactine, l'agrobactine..., iii) le potentiel antibiotique limité que possèdent ces conjugués au regard de la spécificité de la reconnaissance par les OMR bactériens.

Notre laboratoire s'est donc intéressé au développement et à l'étude de pyoverdines simplifiées possédant les acides aminés indispensables pour être reconnues par le récepteur Fpva, spécifique de ce sidérophore [67]. Dix analogues de la pyoverdine (aPvds) ont été synthétisés et leurs paramètres physico-chimiques ont été établis (pKa, pFe, stœchiométrie du complexe). L'analogue **aPvd3** s'est particulièrement distingué par son pFe supérieur à 20, démontrant sa haute affinité pour le Fe(III) (Figure 25).

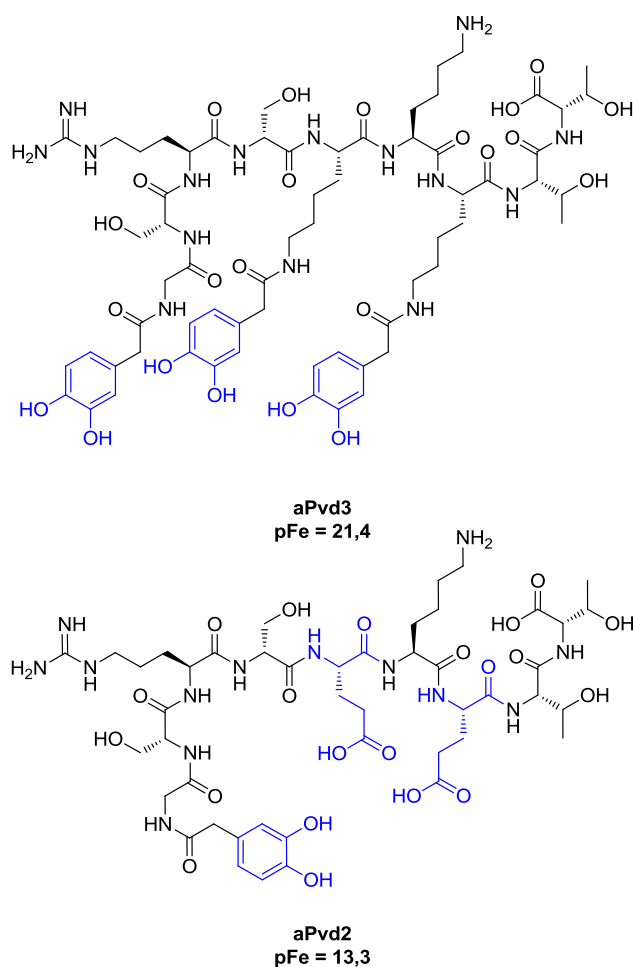


Figure 25. Analogues simplifiés de la pyoverdine synthétisés au laboratoire.

Des tests de reconnaissances ont été effectués sur deux souches *P. aeruginosa* avec les composés **aPvd2** et **aPvd3** dans un milieu appauvri en fer : i) PAO1, une souche sauvage exprimant ses sidérophores, ii) PAD07, une souche incapable de produire ses sidérophores principaux, la pyoverdine et la pyochéline. La stœchiométrie des complexes étant de un sidérophore pour un ion ferrique, lorsque le *ratio* des concentrations [sidérophore]/[Fe(III)] est supérieur à deux, la totalité du fer présent dans le milieu est séquestré. Une croissance bactérienne significative observée pourrait alors indiquer que le sidérophore est reconnu par la bactérie. Ces résultats sont d'autant plus concluants en ce qui concerne PAD07. Cette souche ne produisant pas ses sidérophores principaux, les échanges de Fe(III) entre sidérophores naturels et sidérophores synthétiques sont limités (Figures 26 et 27).

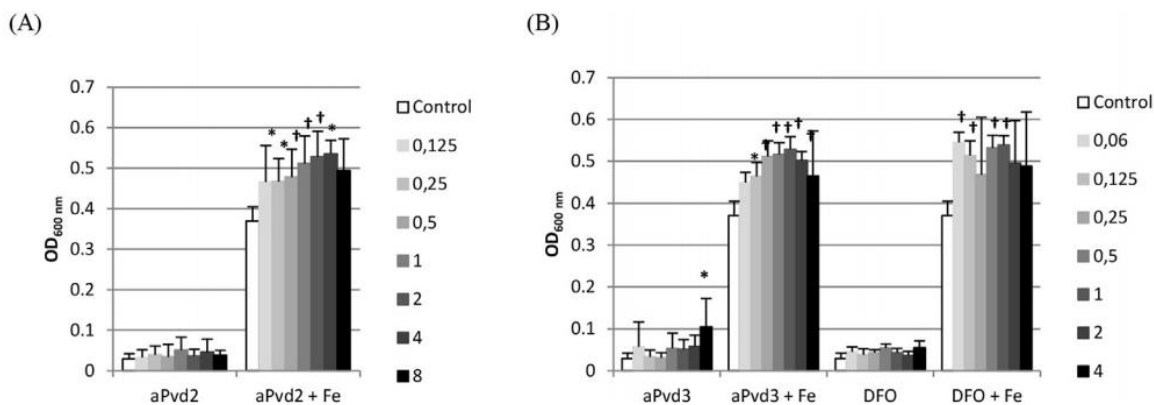


Figure 26. Croissance de *Pseudomonas aeruginosa* PAD07 dans un milieu minimum succinate en présence ou en absence de fer ferrique et avec **aPvd2** (A) et **aPvd3** (B). Les valeurs données sur la droite du diagramme correspondent au *ratio* des concentrations [sidérophore]/[Fe(III)].

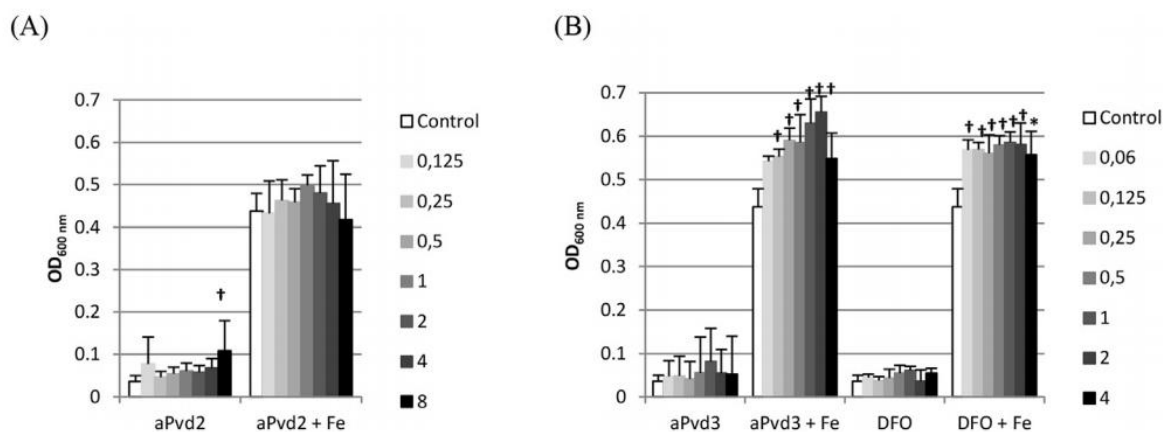


Figure 27. Croissance de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 dans un milieu minimum succinate en présence ou en absence de fer ferrique et avec **aPvd2** (A) et **aPvd3** (B). Les valeurs données sur la droite du diagramme correspondent au *ratio* des concentrations [sidérophore]/[Fe(III)].

Enfin, des études ont été menées sur des sidérophores artificiels pipéraziniques tels que le dicatéchol **MPPS0225** synthétisé au laboratoire.

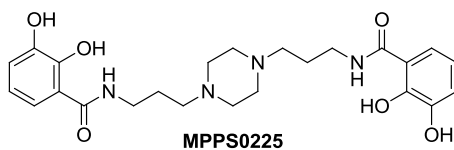


Figure 28. Structure du sidérophore synthétique **MPPS0225**.

La caractérisation des propriétés physico-chimiques de cette molécule a permis d'établir la stœchiométrie des complexes sidérophore-Fe(III). A pH = 5,70, celle-ci est de trois sidérophores pour deux ions ferriques, et, à pH physiologique, cette stœchiométrie est conservée. Une étude pHmétrique a également été effectuée sur **MPPS0225** et a révélé six sites déprotonables : i) les ammoniums du cycle pipérazinique possèdent les pKa les plus faibles (3,37 ; 6,95), ii) deux hydroxyles sont déprotonables à pH légèrement basique (pKa = 7,83 ; 8,60), iii) deux hydroxyles sont déprotonables à pH fortement basique (pKa > 13).

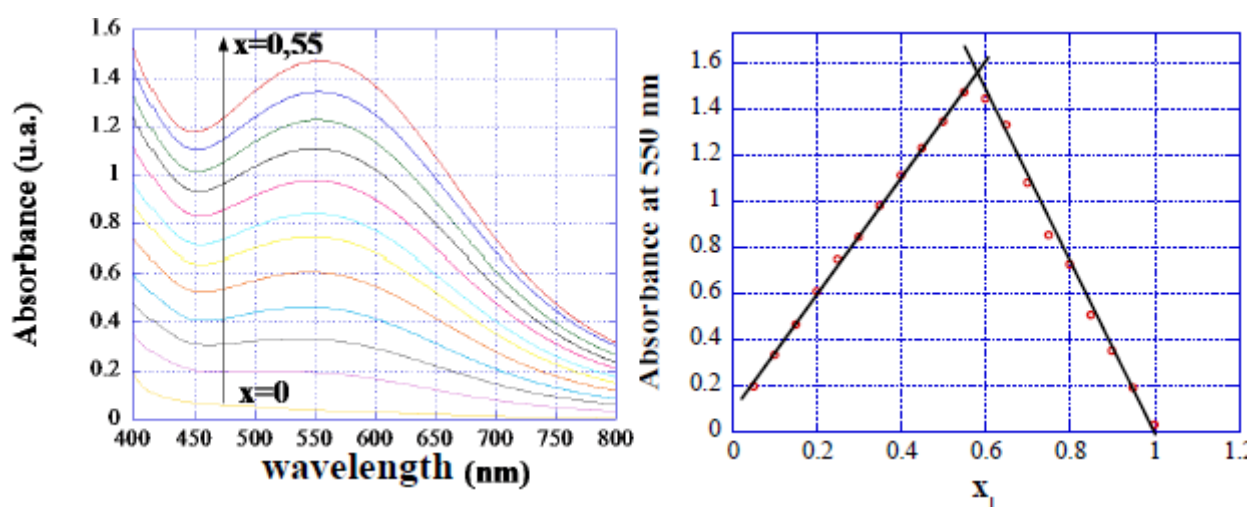


Figure 29. Détermination de la stœchiométrie des complexes **MPPS0225**-Fe(III).

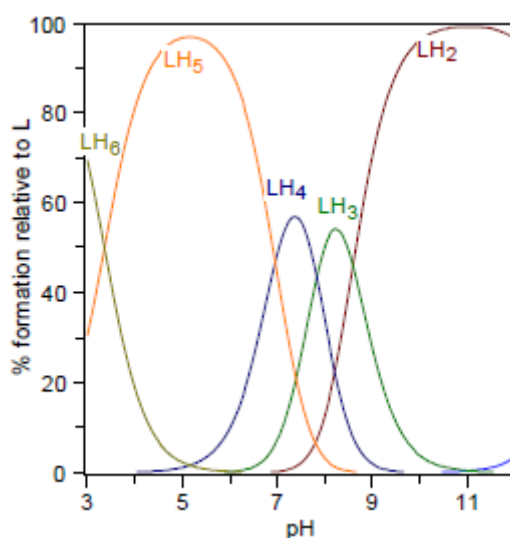


Figure 30. Diagramme de protonation de **MPPS0225** dans un mélange H₂O/DMSO.

Des tests de reconnaissance du sidérophore artificiel pipérazinique **MPPS0225** ont également été effectués sur des souches *P. aeruginosa* (PAD07 et DSM 117) (Figures 31a et b) dans un milieu appauvri en fer (MMS) supplémenté ou non en fer. Dans le milieu supplémenté en fer (courbe bleue), nous pouvons constater que lorsque le ratio est supérieur à 1,5 correspondant à la stœchiométrie Fe(III)/ligand 2:3, une croissance bactérienne est présente quelque soit la souche de *P. aeruginosa*. Ces données suggèrent que le complexe sidérophore-Fe(III) serait reconnu et internalisé par la bactérie.

A)

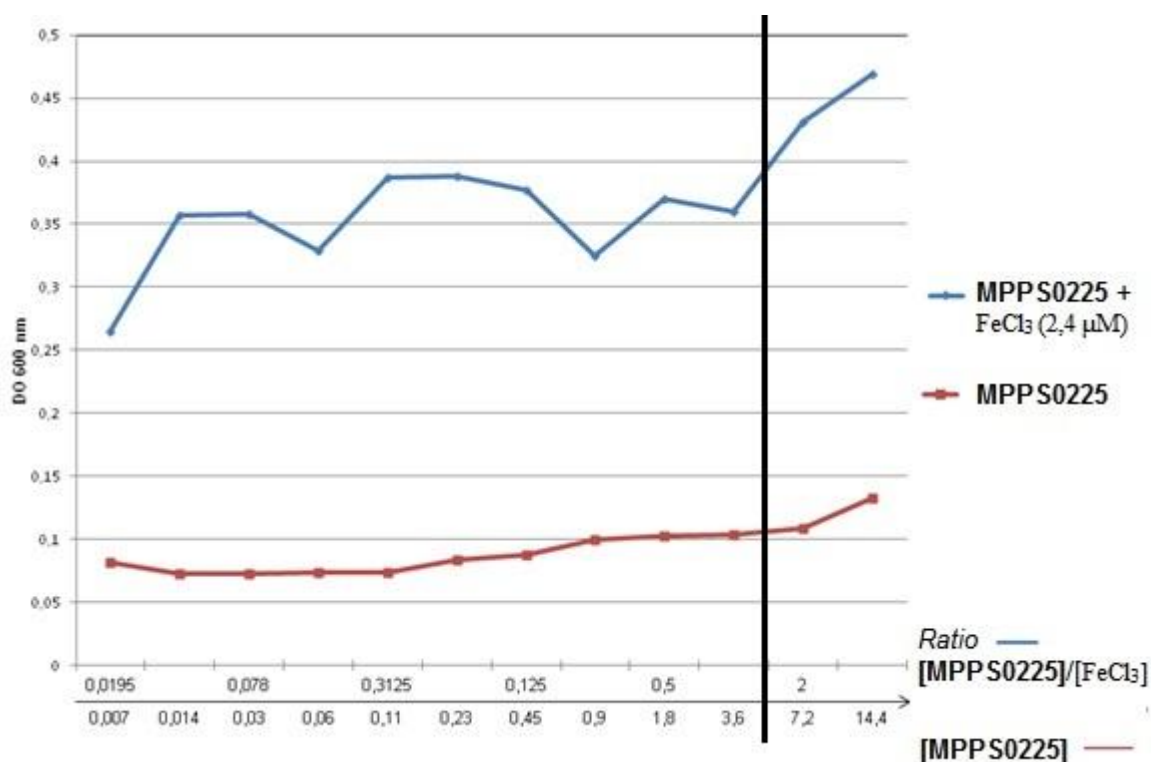


Figure 31a. Représentation de la croissance bactérienne (DSM1117) en fonction du ratio pipérazine **MPPS0225**/Fe(III).

B)

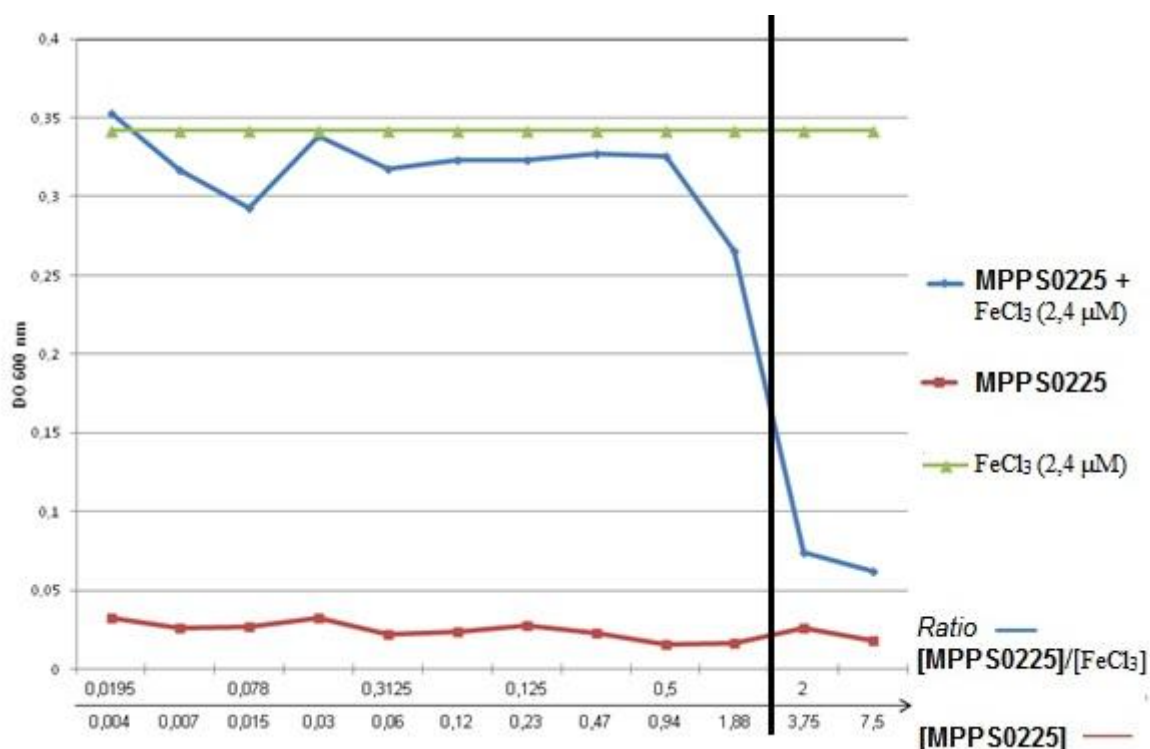


Figure 31b. Représentation de la croissance bactérienne (PAD07) en fonction du *ratio* pipérazine **MPPS0225**/Fe(III).

Suite à ce travail, nous proposons, pour cette thèse, de synthétiser de nouveaux analogues pipéraziniques 1,4-disubstitués qui seront étudiés afin de comparer différents groupements chélateurs du fer ferrique et leur capacité à être reconnus par les bactéries. Ces ligands seront de nature hydroxamate ou hydroxypyridinone. Enfin, des études physico-chimiques seront également menées afin de déterminer l'affinité de ces composés pour le Fe(III) et la stœchiométrie des complexes formés.

Cependant, le cœur de cette thèse reste la mise au point d'une synthèse totale, originale, convergente et asymétrique de l'acide rhodotorulique (**AR**) (Schéma 1). Cette stratégie devrait également permettre l'obtention d'analogues **aAR** variant par leur stéréochimie et/ou la nature des groupements chélateurs du fer. En effet, nous souhaitons, à travers la synthèse de ces chélateurs, étudier l'influence sur la complexation du fer: (i) de la nature de l'hétérocycle (pipérazinique ou dioxopipérazinique), (ii) de la nature des ligands du fer, (iii) de la régio- et stéréo-localisation de ces ligands sur le cycle pipérazinique. A la suite de ce travail de thèse, des études physico-chimiques seront effectuées au laboratoire et

permettront d'établir rapidement la relation entre la structure des composés et l'affinité de la molécule pour le fer et donc pour le gallium (pFe, pKa). Ces résultats seront comparés aux constantes physico-chimiques reportés pour l'**AR** qui complexe le fer ferrique avec un ratio **AR**-Fe(III) de 3:2 et qui possède une constante de complexation pour le Fe(III) (pFe) de 21,8 [68].

La mise au point d'une synthèse totale de l'**AR** permettra la synthèse de différents complexes et conjugués. Au regard du travail de synthèse, de l'**AR** et des analogues, ce manuscrit est surtout consacré à la synthèse de molécules chélatrice du fer. Par la suite, deux types d'antibactériens seront synthétisés : i) des complexes **AR**-Ga(III) ou **aAR**-Ga(III), ii) des conjugués **AR**-antibiotique ou **aAR**-antibiotique obtenus à l'aide d'un espaceur. Les antibiotiques choisis seront dépendants de la cible souhaitée, l'ampicilline pour une action périplasmique, la ciprofloxacine pour une action cytoplasmique.

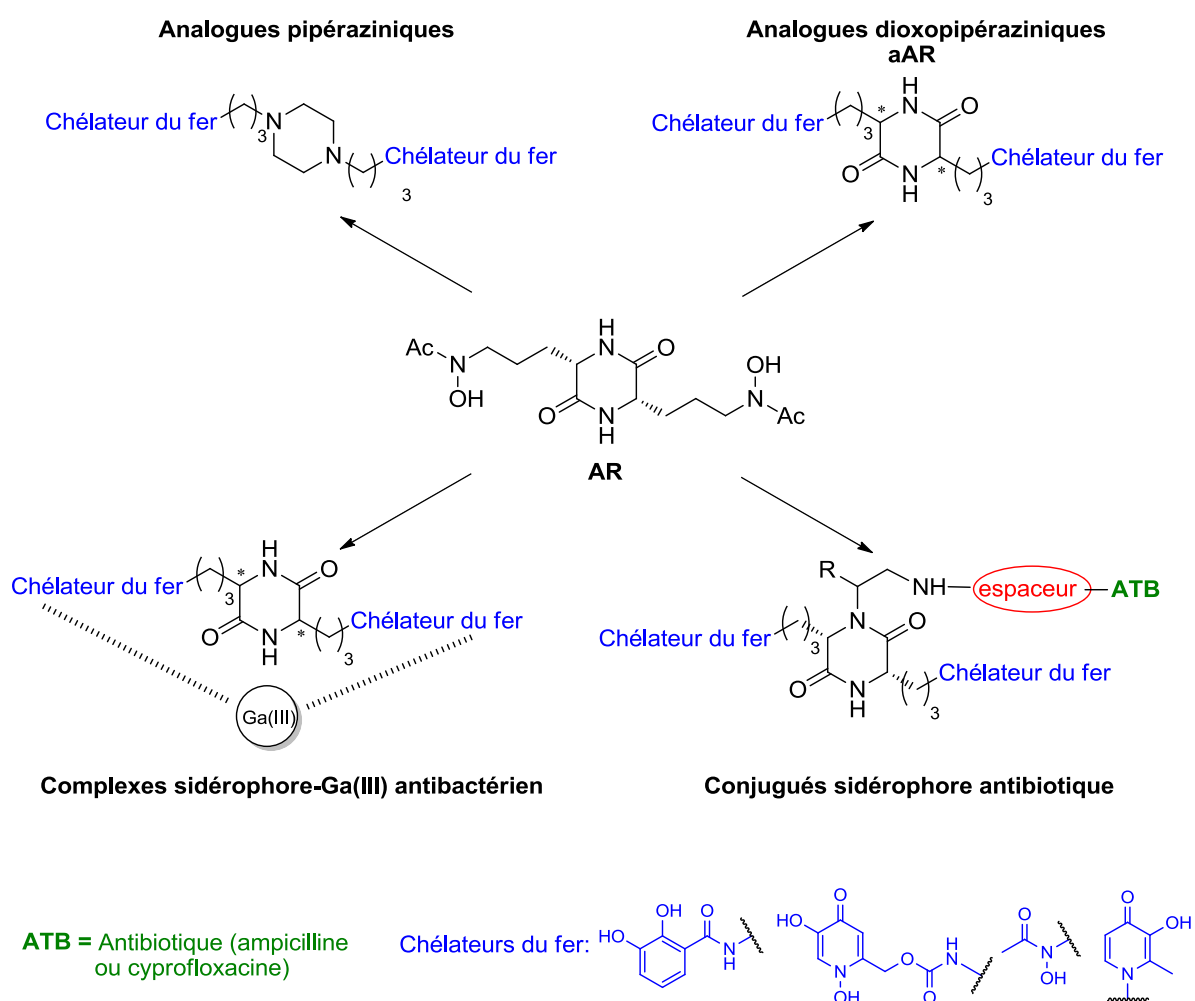


Schéma 1. Structures envisagées comme analogues de l'**AR** et antibactériens

Au vu des objectifs que nous nous sommes fixés, nous nous intéresserons plus particulièrement, dans le chapitre suivant, à la biosynthèse de l'**AR** et aux différentes synthèses totales de ce composé qui ont été proposées depuis 1972. L'**AR** pouvant être obtenu par des alkylations asymétriques, nous étudierons également les méthodes décrites dans la littérature et effectuées sur des oxo- ainsi que des dioxopipérazines afin d'obtenir des composés 3-substitués et 3,6-disubstitués.

III. Synthèse stéréosélective d'oxopipérazines plurisubstituées.

A. Synthèse asymétrique de 2,5-dioxopipérazines 3,6-disubstituées

1. Biosynthèse de l'acide rhodotorulique

La N^δ -hydroxyornithine est le principal motif retrouvé chez les sidérophores hydroxamates fongiques les plus communs tels que les fusarinines B et C, les coprogènes, les ferrichromes A et C ou encore l'AR (Figure 32). Nous avons récemment publié un chapitre d'ouvrage concernant les (bio)synthèses et les applications potentielles de ces sidérophores [69].

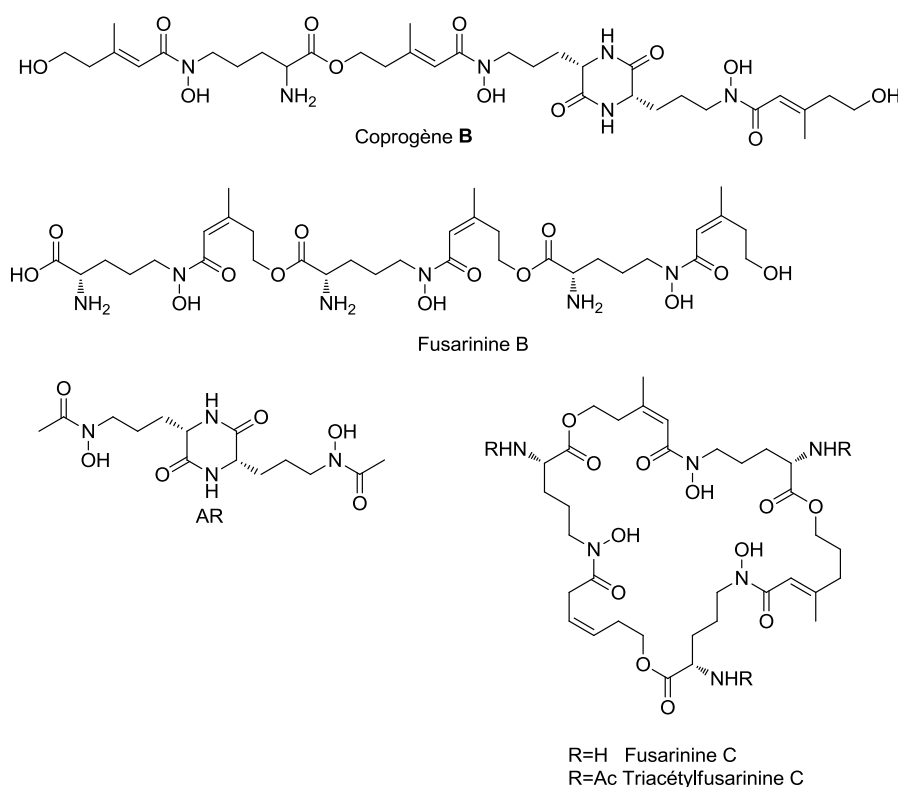


Figure 32. Exemples de sidérophores hydroxamates fongiques.

La L- N^δ -hydroxyornithine est biosynthétisée par l'hydroxylation de la L-ornithine en présence de la L- N^δ -ornithine-oxygénase. Cette enzyme a été identifiée chez de nombreuses espèces fongiques connues pour produire des sidérophores hydroxamates. Une perte de ce gène empêche la biosynthèse de tous les sidérophores chez les espèces *Ustilago*, *Aspergillus*

et *Fusarium* étudiées à ce jour. La seconde étape dans la biosynthèse des sidérophores hydroxamates est caractérisée par le transfert d'un groupe acyle de l'AcylCoA sur la L- N^{δ} -hydroxyornithine. Cette réaction est catalysée par une transacétylase, le groupement acyle dépendant du sidérophore synthétisé et variant d'un simple acétyle (**AR**, ferrichrome) à des structures plus complexes telles que le méthylglutaconyle (ferrichrome A) ou l'anhydromévalonyle (fusarinine C, coprogène B). La N^{δ} -hydroxyornithine-acétylCoA- N^{δ} -transacétylase a été identifiée chez de nombreuses espèces telles que *Rhodotorula pilimanae* et *Ustilago sphaerogena*.

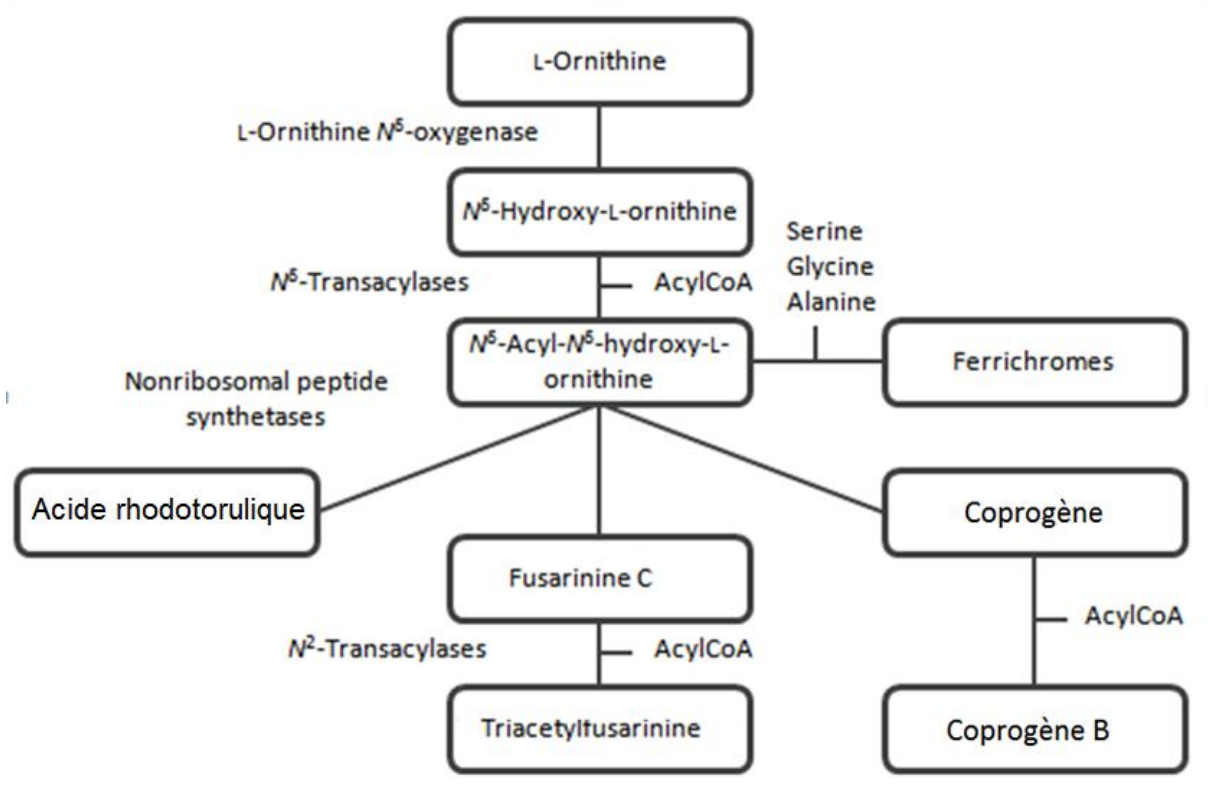


Figure 33. Biosynthèse des sidérophores hydroxamates fongiques.

La troisième étape inclut la formation de liaison amides (**AR**, ferrichrome) ou esters (fusarinine C, coprogène B) entre les unités L- N^{δ} -acyl- N^{δ} -hydroxyornithines. Un large complexe multienzyme, formé d'enzymes de synthèse de peptides non ribosomiques, catalyse les réactions correspondantes en activant les précurseurs, en les connectant et en ajoutant des acides aminés si nécessaire.

L'extraction de l'**AR**, ne permettant pas d'obtenir ce composé dans des quantités suffisantes pour des analyses physico-chimiques poussées, plusieurs équipes se sont intéressées à la synthèse totale de cette molécule

2. Synthèses totales de l'acide rhodotorulique et de ses analogues

À notre connaissance, cinq synthèses de l'**AR** ont été décrites mais ces dernières ne sont pas optimisées pour la synthèse d'analogues.

La première synthèse de l'**AR** a été décrite par Isowa *et al* en 1972 [70] (Schéma 2). Deux fragments *N*^δ-tosyl-*N*^δ-L-hydroxyornithine **7a** et **7b** sont synthétisés. Le premier acide aminé possède une fonction amine protégée par un groupement *t*-butyloxycarbonyle (Boc) alors que la fonction acide du composé **7b** est estérifiée. Puis ces deux acides aminés sont couplés pour former le cycle dioxopipérazinique. La synthèse débute par la protection de l'amine de la *O*-benzylhydroxylamine **1** par un groupement tosyle. Puis, l'hydroxylamine formée **2** substitue le 1,3-dibromopropane en présence d'éthanolate de sodium généré *in situ* pour conduire au dérivé halogéné **3**. Ce dernier est ensuite couplé au malonate de diéthyle **12** en présence de la d'éthanolate de sodium base pour donner l'acétamidomalonate **4**. Ce dernier subit une étape de décarboxylation et de déprotection permettant l'obtention du fragment *N*^δ-tosyl-*N*^δ-ornithine **5**. Enfin, une résolution enzymatique permet de séparer les deux énantiomères et de fournir la *N*^δ-tosyl-*N*^δ-L-ornithine **6** avec un rendement global de 12%. Les acides aminés **7b** et **7a** sont obtenus respectivement par estérification et protection sous forme de carbamate de l'amine **6**. Ces deux acides aminés sont ensuite couplés ensemble en présence d'acide bromhydrique et d'acide acétique pour donner le dipeptide **8**. L'amine du dipeptide **8** est ensuite déprotégée par de l'acide chlorhydrique concentré puis l'aminoester **9** ainsi obtenu est cyclisé en utilisant de l'ammoniac dans du méthanol. Les groupements tosyles de la dioxopipérazine **10** sont clivés en présence d'acide bromhydrique, d'acide acétique et de phénol puis les hydroxylamines **11** sont acétylées pour former les fonctions hydroxamate. Enfin une étape de débenzylation catalysée au palladium permet d'obtenir l'**AR**. Ce composé est ainsi synthétisé en quatorze étapes avec un rendement global de 0,89%.

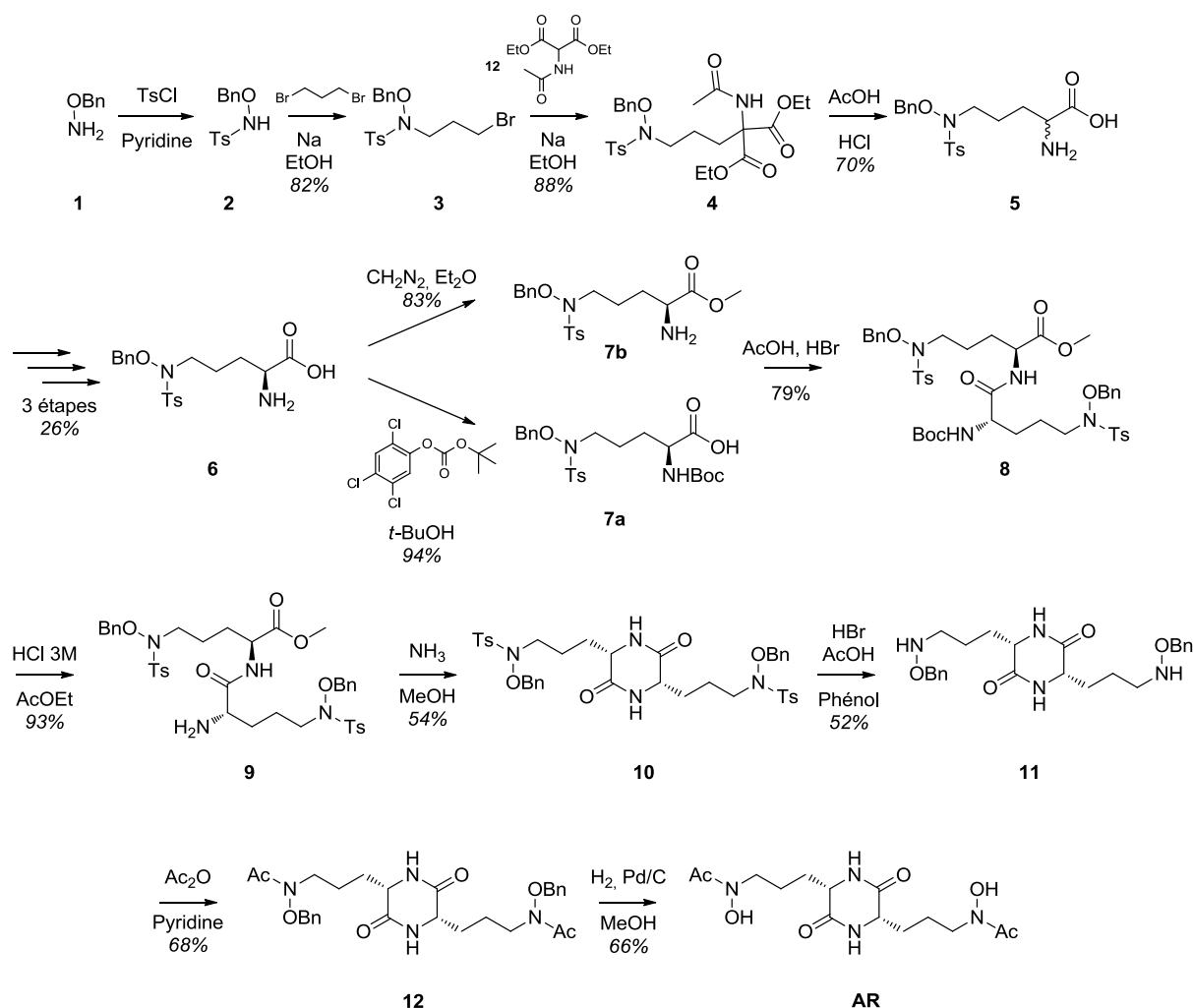


Schéma 2. Synthèse de l'AR par Isowa *et al* [70].

La deuxième synthèse de l'AR, décrite par Fujii *et al.* [71] en 1973, s'inspire des travaux de M. Rothstein et D C. J. Claus [72] (Schéma 3). La synthèse débute avec la substitution du bromovalérate **13** par la *O*-benzylhydroxylamine **1** en présence de triéthylamine puis une décarboxylation ainsi qu'une saponification suivie d'une acétylation permettent d'obtenir la *N*^δ-acétyl-*N*^δ-ornithine **14**. Une résolution chirale est ensuite effectuée grâce à la Taka-diastrase, isolant la *N*^δ-acétyl-*N*^δ-L-ornithine **15-(S)**. La *N*^δ-acétyl-*N*^δ-D-ornithine **15-(R)** est racémisée en présence d'anhydride acétique à chaud puis une nouvelle résolution chirale est effectuée et ainsi de suite jusqu'à parvenir à un rendement de 62%. L'acide aminé **16** est obtenu par protection de l'amine sous forme de carbamate. Une étape d'estérification en présence de diazométhane suivie du clivage du groupement Boc permet de fournir l'acide aminé **18**. Celui-ci, couplé avec l'acide aminé **16** à l'aide de dicyclohexylcarbodiimide (DCC), fournit le dipeptide **19**. Ce dernier est ensuite cyclisé à

l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1M. Enfin une hydrogénéolyse permet de former l'**AR**. Ce composé est ainsi obtenu en huit étapes à partir du bromovalérate avec un rendement global de 5,5%.

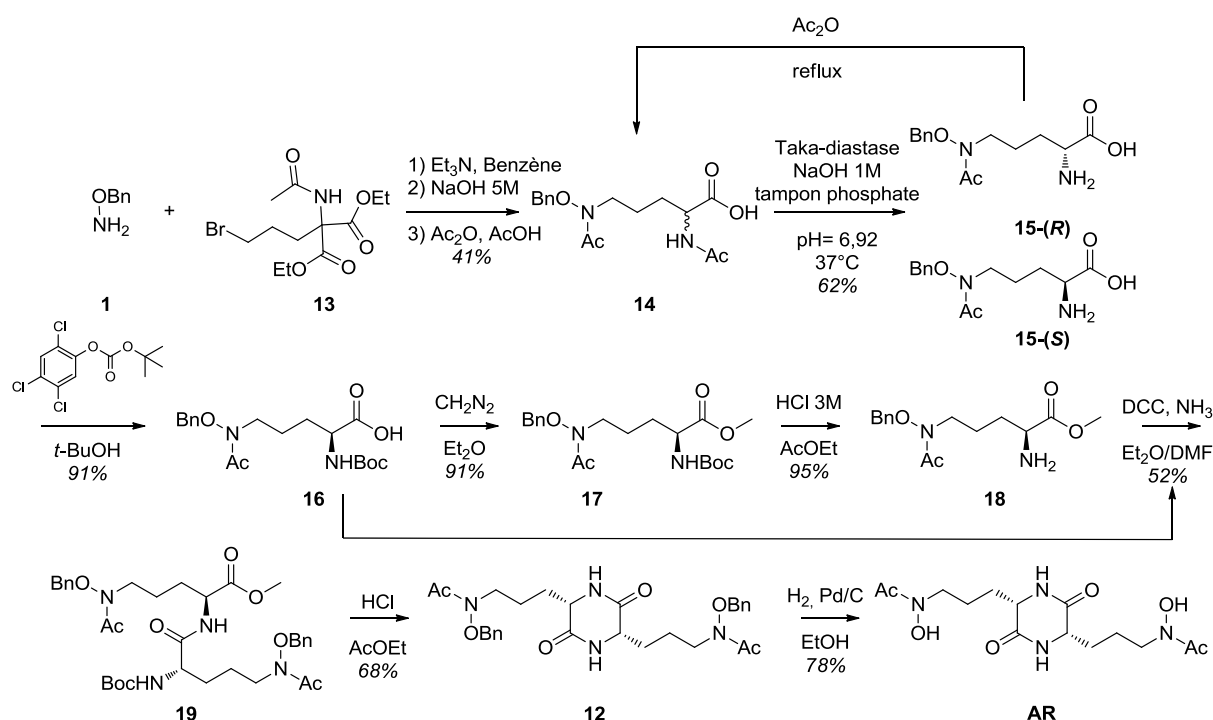


Schéma 3. Synthèse de l'**AR** par Fujii *et al* [71].

La troisième synthèse de l'**AR** a été publiée en 1974 par Widmer *et al.* [73] (Schéma 4). Elle permet également d'obtenir l'acide dimérumique **27**, un composé analogue de l'**AR**. La synthèse de ces deux composés débute à partir de la 5-nitro-L-norvaline **20**. Les deux acides aminés **21** et **23** sont obtenus facilement par estérification et protection de l'amine sous forme de carbamate. Ces deux molécules sont ensuite couplées en présence de chloroformiate d'isobutyle et de *N*-méthylmorpholine-*N*-oxyde (NMO) pour former le dipeptide **24**. Enfin la cyclisation de ce dipeptide, utilisant de l'acide chlorhydrique et du diméthoxyéthane (DME), conduit à la dioxopipérazine **25** avec un rendement global de 69% en cinq étapes. Afin d'obtenir l'**AR**, deux étapes sont encore nécessaires : i) réduction des groupements nitro en hydroxylamine catalysée par du palladium sur charbon sous atmosphère de dihydrogène, ii) *N*-acétylation des hydroxylamines formées en présence d'anhydride acétique et de pyridine. L'**AR** est ainsi synthétisé en sept étapes à partir de la 5-nitro-L-norvaline avec un rendement global de 13%. Concernant l'acide dimérumique **27**, trois étapes supplémentaires doivent encore être réalisées à partir de la dioxopipérazine **25** : i) réduction du groupement nitro en hydroxylamine par hydrogénéolyse catalysée par du palladium, ii) couplage entre la

dioxopipérazine formée et le méthylpenténoate **32**, iii) déprotection des groupements alcools *O*-acétylés en présence d'ammoniac dans du méthanol. L'acide dimérumique **27** est ainsi obtenu en sept étapes avec un rendement global de 15%. La synthèse du méthylpenténoate **32** s'effectue en cinq étapes à partir du 3-oxobutyl acétate **29**. La première étape consiste en un couplage entre le bromoacétate **28** et le 3-oxobutyl acétate **29** en présence de zinc. L'hydroxyméthylpentanoate **30** formé subit une réaction de déshydratation dans la pyridine à l'aide d'oxychlorure de phosphore (POCl_3) pour donner l'alcène **31** avec un rendement extrêmement faible de 1%. Trois étapes supplémentaires sont nécessaires pour obtenir le méthylpenténoate **32** : i) hydrolyse de l'ester *ter*butylique en présence d'ammoniac, ii) formation d'un chlorure d'acide en utilisant du chlorure d'oxalyle, iii) couplage entre le chlorure d'acide formé et la *N*-hydroxysuccinimide. Le méthylpenténoate **32** est ainsi obtenu en cinq étapes avec un rendement global de 0,3%.

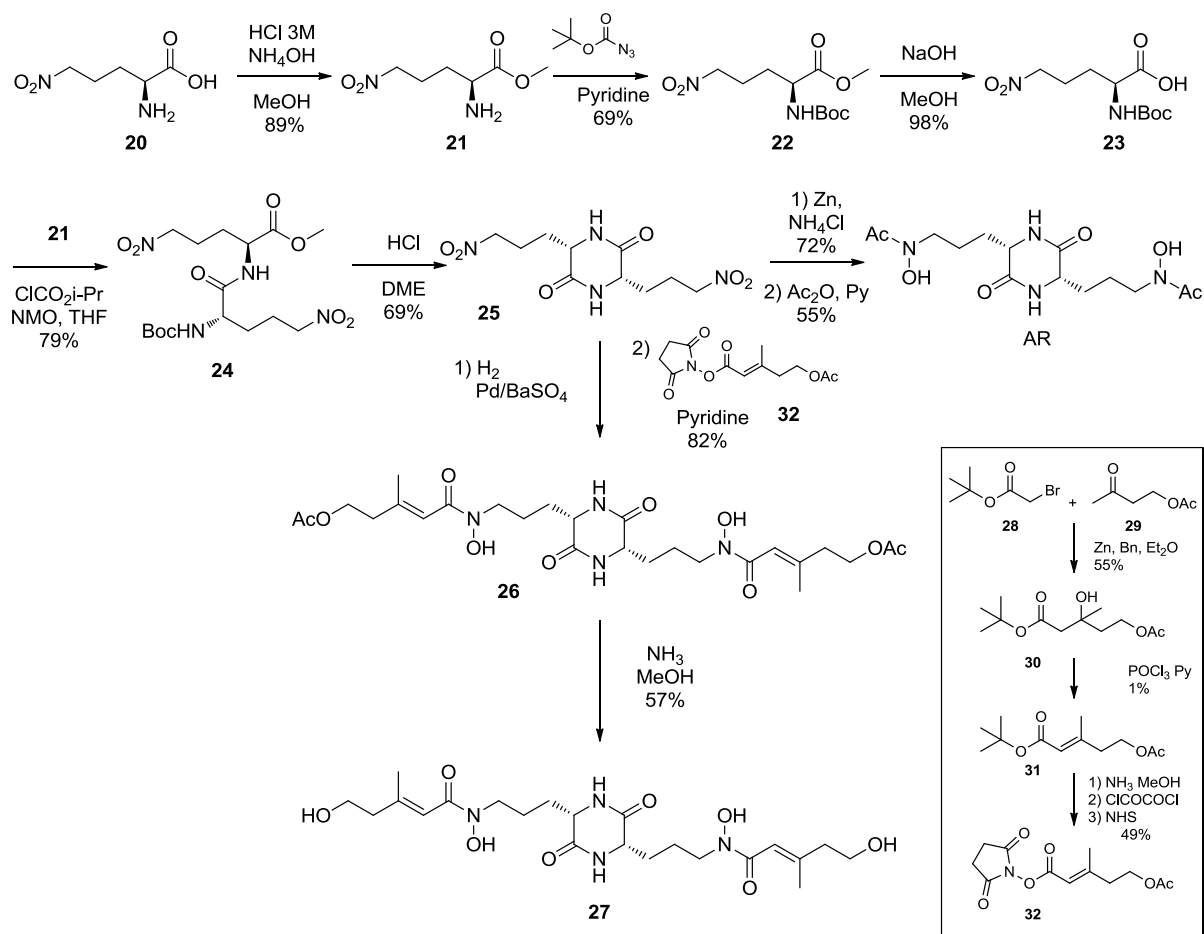


Schéma 4. Synthèse de l'AR et de l'acide dimérumique **27** par Widmer *et al* [73].

En 1983, Miller *et al.* [74] proposent une nouvelle synthèse de l'**AR** qui permet d'obtenir plus facilement la fonction hydroxamate (Schéma 5). Celle-ci débute par la réduction en alcool de l'acide présent sur la chaîne latérale du glutamate protégé **33**. Puis une réaction de Mitsunobu permet de substituer l'alcool formé par la *O*-benzylhydroxylamine **35**. Le clivage du groupement Troc en présence de zinc et d'anhydride acétique conduit à la formation de l'hydroxamate protégé **37**. Par un jeu de protection/déprotection les deux acides aminés **38** et **40** sont obtenus puis couplés en présence de la *N*-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline **41** pour donner le dipeptide **42**. Une étape de cyclisation dans le TFA puis une hydrogénéolyse permettent d'obtenir l'**AR**. Ce composé est ainsi synthétisé à partir de l'acide glutamique **33** en neuf étapes avec un rendement global de 6,7%. L'intérêt de cette synthèse réside dans la facilité d'obtention du synthon *N*^δ-acétyl-*N*^δ-L-hydroxyornithine **37**.

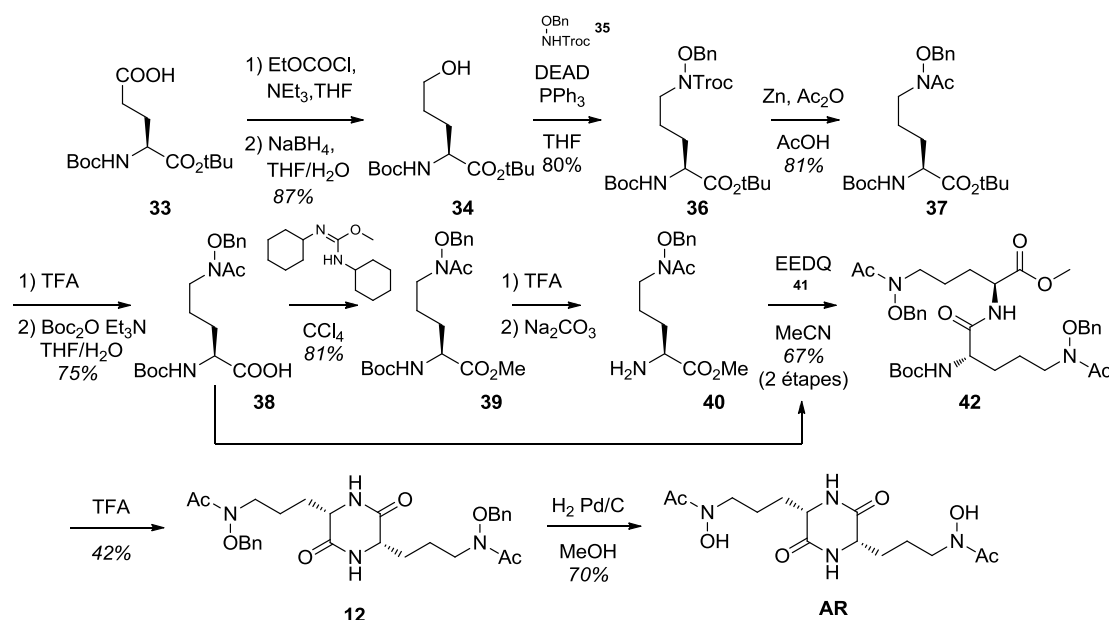


Schéma 5. Synthèse de l'**AR** par Miller *et al* [74].

Cette synthèse a été reprise en 2015 par Sano *et al.* [75]. L'étape de cyclisation du précurseur **42** a été effectuée aux micro-ondes et a permis d'accroître le rendement de cette réaction et d'obtenir l'**AR** avec un rendement global de 32% (Schéma 6). Ils ont également synthétisé l'analogue 1,4-diméthylé **44**.

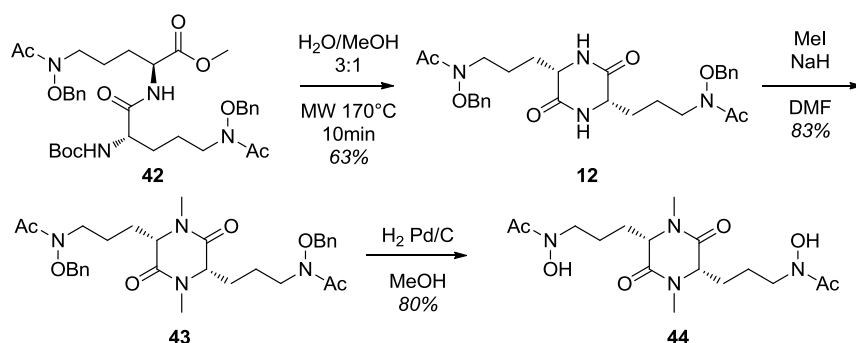


Schéma 6. Synthèse de l'analogue 1,4-diméthylé **44** par Sano *et al* [75].

Les synthèses de l'**AR** décrites dans la littérature sont, pour la plupart, anciennes avec de faibles rendements et non convergentes. Par ailleurs, la stéréochimie des chaînes portant les groupements chélateurs du fer est dépendante des produits de départ. Par conséquent, nous proposons une nouvelle stratégie de synthèse de l'**AR** et d'analogues à partir d'une 2,5-dioxopipérazine clé portant deux copules chirales (Schéma 7). Ces copules chirales seront activées successivement pour induire la stéréosélectivité des deux étapes d'alkylation qui nous permettront de greffer les chaînes propyles portant les groupements chélateurs du fer. Nous développerons plus en détail cette stratégie au prochain chapitre. Cette synthèse convergente conduira non seulement à l'**AR** mais également à des analogues variant dans la stéréochimie ou dans la nature des groupements chélateurs à partir d'un intermédiaire clé **E**. Nous allons maintenant nous intéresser aux différentes stratégies décrites dans la littérature pour accéder stéréosélectivement à des 2,5-dioxopipérazines 3,6-disubstituées à partir de 2,5-dioxopipérazines.

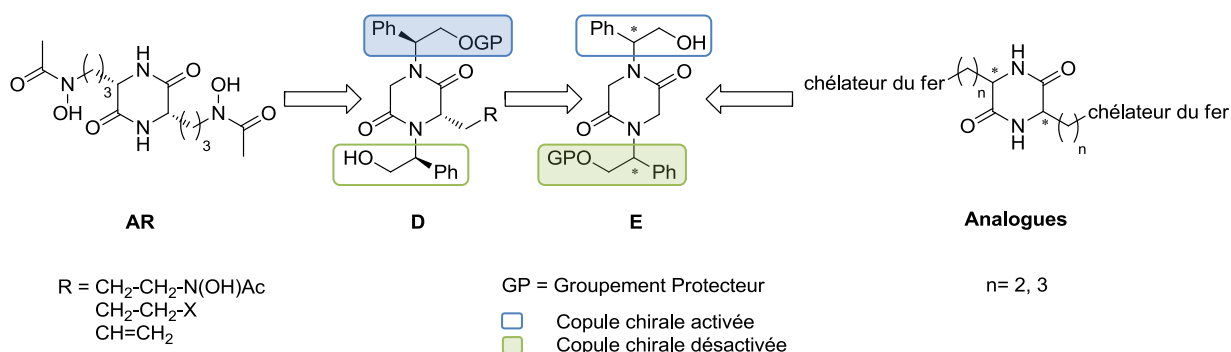


Schéma 7. Exemple de rétrosynthèse proposée pour l'obtention de l'**AR** et de ses analogues.

3. Réactivité des carbones C₃ et C₆

a. Halogénéation radicalaire

Badran *et al.* [76] ont étudié l'influence des substituants en position 1 et 4 sur la régiosélectivité de l'halogénéation radicalaire de 2,5-dioxopipérazines. Les composés obtenus étant très instables, ils ont été convertis en thioéthers, en présence de 4-chlorothiophénol, afin d'être caractérisés.

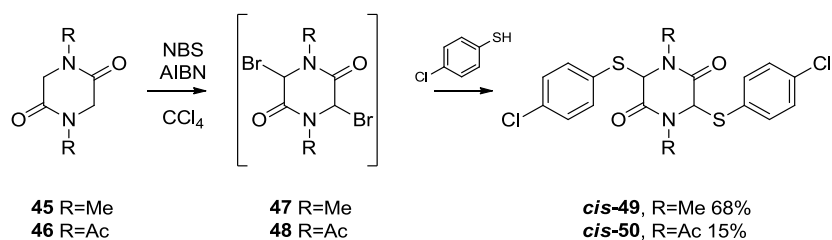


Schéma 8. Bromation radicalaire de 2,5-dioxopipérazines selon Bradan *et al* [76].

La 3-bromo-2,5-dioxopipérazine 6-substituée **52** peut être obtenue en faisant réagir la 2,5-dioxopipérazine 3-substituée par un groupement *i*-propyle **51** avec du *N*-bromosuccinimide (NBS) et du azo-*bis*-isobutyronitrile (AIBN) dans du tétrachlorure de carbone. Badran *et al.* ont démontré qu'une bromation radicalaire de 2,5-dioxopipérazines asymétriques conduit à la formation du composé *trans*-disubstitué. Lors de cette réaction, ils n'ont observé qu'un seul diastéréoisomère, la stéréosélectivité de la réaction étant conditionnée par le groupement présent en position 3. Selon cette équipe, la substitution de ce brome par un groupement allyle conduit également au composé *trans*-disubstitué **53**, un seul diastéréoisomère ayant été observé.

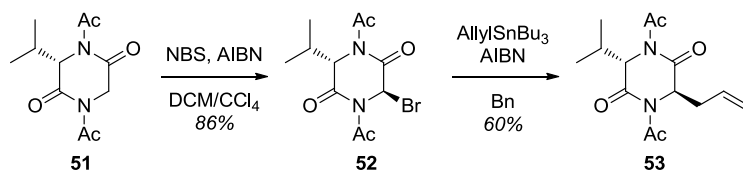


Schéma 9. Bromation stéréosélective de la 2,5-dioxopipérazine asymétrique **51** [77].

b. Alkylation d'ions *N*-acyliminiums

En 1998, Kardassis *et al.* [78] ont décrit une synthèse diastéréosélective de 2,5-dioxopipérazines 3,6-disubstituées en réalisant l'alkylation d'un intermédiaire *N*-acyliminium 3-substitué (Schéma 10). En présence de diphényléthylène et à l'aide d'une catalyse acide, ils ont ainsi obtenu l'alcène **55a** par alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine **54** avec un excellent excès diastéréoisomérique de 97%. Ils ont également isolé l'alcène **55b** qui possède un groupement allyle moins volumineux, avec une forte diastéréosélectivité (ed : 99%).

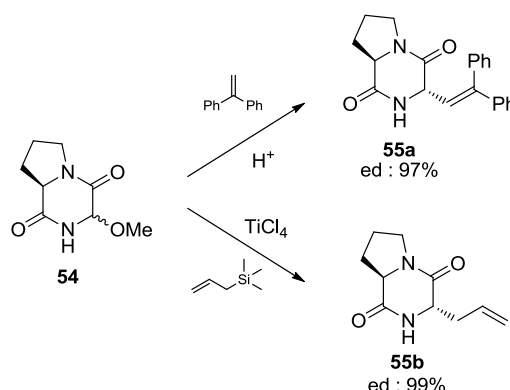


Schéma 10. Substitution diastéréosélective de la 2,5 dioxopipérazine **53** par Kardassis *et al* [78].

En 2002, Bull *et al.* [79] ont aussi utilisé cette stratégie de substitution *via* la formation d'un ion *N*-acyliminium. En présence d'allyltriméthylsilane et d'éthérate de trifluorure de bore, l'alcool acétylé **56** est éliminé puis l'ion *N*-acyliminium est allylé avec un excès diastéréoisomérique de 60% (Schéma 11). Comme nous le verrons pour ce type de dioxopipérazines, l'alkylation se fait préférentiellement sur la face Ré conduisant majoritairement au composé *trans*-disubstitué. Le faible excès diastéréoisomérique peut s'expliquer par la plus grande flexibilité de la dioxopipérazine utilisée.

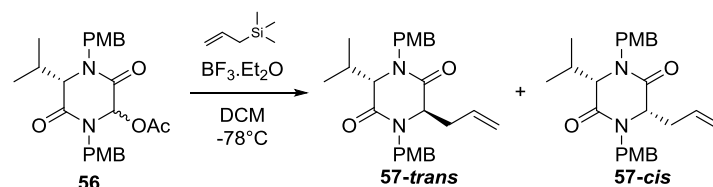


Schéma 11. Substitution diastéréosélective de la 2,5 dioxopipérazine **56** par Bull *et al* [79].

c. Alkylation d'énolates

i. Avec la copule *para*-méthoxybenzyle

L'équipe de Bull *et al.* a également publié de nombreux travaux sur l'halogénéation et l'alkylation, en présence d'une base forte, de la dioxopipérazine **58** possédant deux groupements PMB en position 1 et 4. En présence d'une base forte telle que le LiHMDS, la 2,5-dioxopipérazine **58** est convertie en l'énolate de lithium **59** correspondant (Schéma 12) [79–81]. Lorsque ce dernier est mis en présence de bromure de benzyle ou de bromure de méthyle, les 2,5-dioxopipérazines *trans*-disubstituées correspondantes **60** sont obtenues avec des rendements respectifs de 56% et 62% et de bons excès diastéréoisomérique supérieurs à 85%. Cette stéréosélectivité peut s'expliquer par le fait que l'énolate de lithium tend vers une conformation limitant les interactions stériques entre le groupement isopropyle et le groupement PMB en N⁴. Ce groupement PMB est ainsi projeté sur la face Ré, induisant le positionnement du second PMB préférentiellement sur face Si. La face Ré étant plus accessible, l'alkylation s'effectuera majoritairement sur celle-ci, conduisant à la formation du composé *trans*.

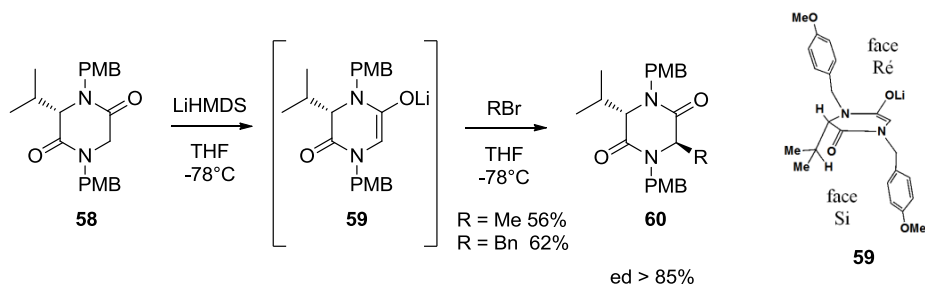


Schéma 12. Formation et conformation préférentielle de l'énolate **59**.

L'halogénéation électrophile *via* la formation d'un énolate de lithium de la (3*S*)-isopropyl-2,5-dioxopipérazine **58** en présence d'hexachlorométhane conduit à l'obtention majoritaire du dérivé *cis*-6-chloré **61-cis** (Schéma 13). Toutefois, la grande instabilité des composés halogénés, hydrolysable à l'air ambiant, représente une difficulté pour mener à bien ces synthèses. En revanche l'halogénéation électrophile effectuée avec du *N*-fluorobenzenesulfonimide (NFSI) induit la formation majoritaire du composé *trans*-fluoré **62-trans** (2:1) et conduit à la formation. La transhalogénéation des dérivés fluorés **62-trans** et **62-**

cis en présence de TMSCl permet d'obtenir la dioxopipérazine chlorée **61-cis** avec un excellent rendement de 95% et une diastéréosélectivité supérieure à 95%. Toutefois la haute instabilité des composés chlorés peut représenter une limite lors ces synthèses. Ces dérivés doivent être conservés à -20°C pour pouvoir réaliser les analyses physico-chimiques.

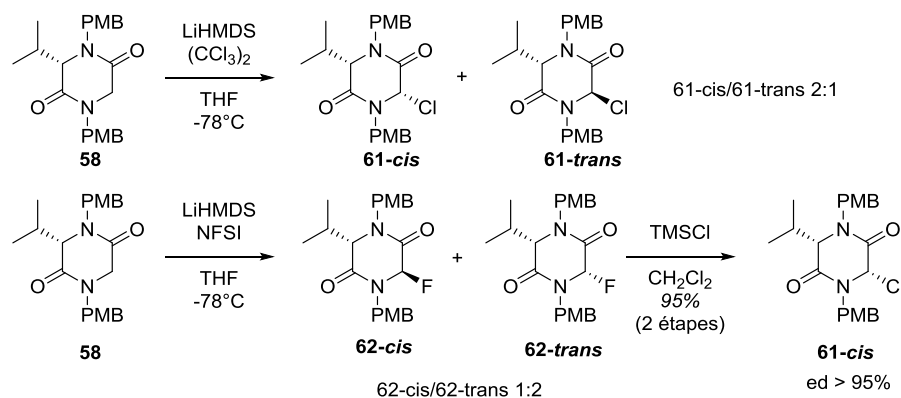


Schéma 13. Halogénéation électrophile asymétrique [81].

Cette haute diastéréosélectivité pourrait s'expliquer par la formation de l'intermédiaire *N*-acyliminium **63** après élimination de l'halogène par le chlorure de triméthylsilyle ou le bromure de triméthylsilyle (Schéma 14). Le composé *cis* étant favorisé thermodynamiquement, le produit cinétique serait peu à peu converti aboutissant à une excellente stéréosélectivité.

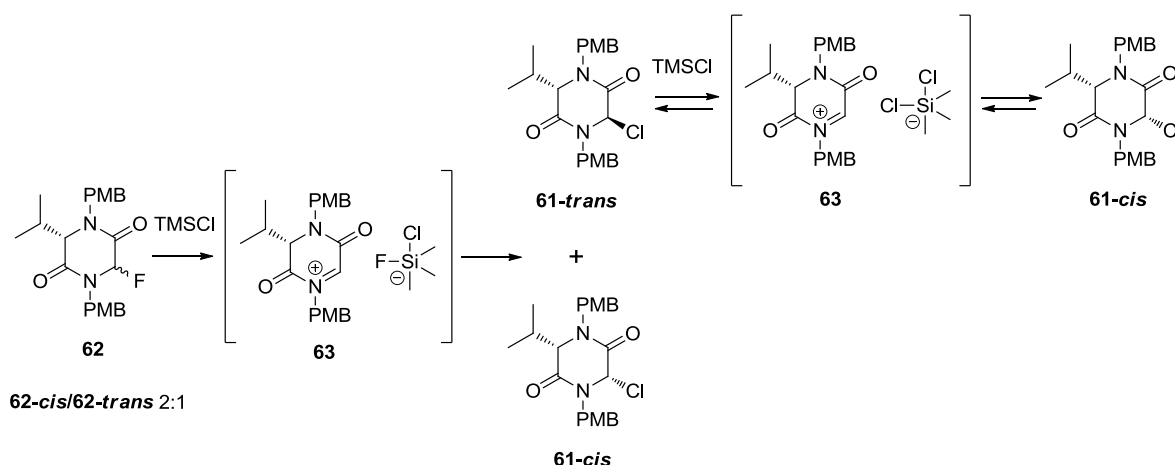


Schéma 14. Mécanisme probable conduisant à la diastéréosélectivité [81].

Des substitutions sur la *cis*-2,5-dioxopipérazine chlorée ont été effectuées conduisant majoritairement à la formation de dioxopipérazines *trans*-disubstituées (Schéma 15). Une

exception a été observée : avec un excès de thiophénolate de sodium, le composé *cis* a été majoritairement obtenu, alors qu'avec 0.9 équivalent, la configuration obtenue est bien majoritairement *trans*. Les auteurs suggèrent que l'excès de thiophénolate pourrait catalyser la formation du produit thermodynamique *via* la formation d'un intermédiaire énolate. En présence de dérivés magnésiens, la configuration *trans* est majoritairement obtenue.

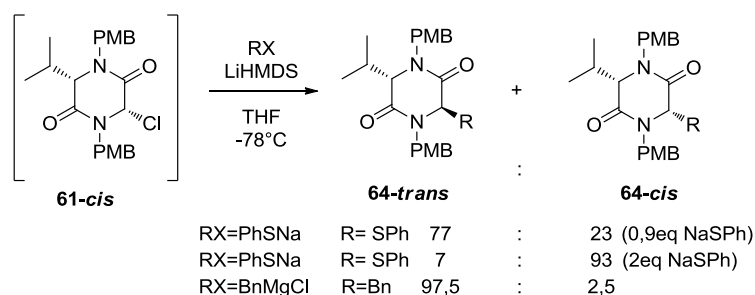


Schéma 15. Différents essais de substitution par Bull *et al* [81].

ii. Avec la copule phényléthyle

D'autres travaux sur l'alkylation diastéréosélective de 2,5-dioxopipérazines ont été effectués par Sandri *et al.* [82,83]. Cette équipe a synthétisé les dioxopipérazines 3-substituées **65** comportant deux copules chirales (*S*)-phényléthyles (Schéma 16). Dans un premier temps, ils se sont intéressés à l'alkylation d'énolates monosubstitués en présence d'iodure de méthyle à 0°C. Dans les deux cas, composé (*S*)-méthylé **65b** ou (*R*)-méthylé **65a**, les dioxopipérazines *cis*-disubstituées **66b** et **66a** ont été obtenues majoritairement avec des rendements respectifs de 92% et 90% et des excès diastéréoisomériques de 98% et 86%.

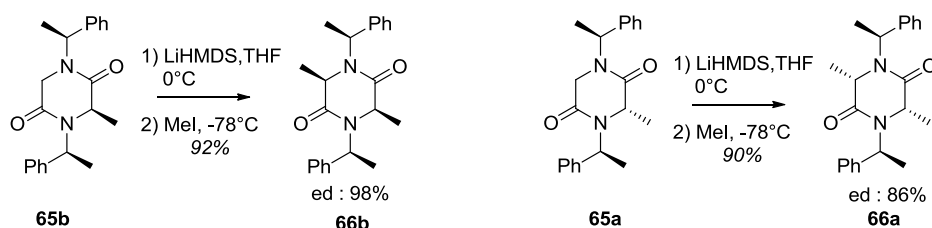


Schéma 16. Alkylation des *N,N'*-(*S*)-phényléthyl-2,5-dioxopipérazines.

La stéréosélectivité de cette réaction est expliquée par les auteurs à l'aide du modèle *N,N'*-diméthyl-3-méthyl-2,5-dioxopipérazine. La conformation préférentielle adoptée par cette molécule est la forme bateau avec le méthyle en position axiale. Dans le cas d'une

dioxopipérazine 3,6-disubstituée, les auteurs ont démontré que le composé *cis*-diaxial est le plus stable thermodynamiquement. Ainsi, la configuration des copules chirales n'intervient pas dans la stéréosélectivité de la réaction.

En revanche cette équipe a également réalisé l'alkylation de la dioxopipérazine non substituée **67** (Tableau 2) [84]. Ils ont ainsi démontré le concept d'inducteur chiral pour la synthèse des dioxopipérazines 3-substituées **68** avec toutefois des excès diastéréoisomériques assez faible (10-50%). Le diastéréoisomère **68-(S)** a été majoritairement obtenu en réalisant des alkylations avec différents électrophiles. Après purification, ces composés ont été engagés dans une deuxième étape d'alkylation. Lors de cette étape, le phénomène d'induction *cis*-1,4 conduisant à l'obtention majoritaire de dioxopipérazines *cis*-disubstituées est de nouveau observé. Cette induction est particulièrement efficace concernant les dioxopipérazines (3*S*)-substituées car la chaîne alkyle est en position axiale. En revanche, pour les dioxopipérazines (3*R*)-substituées (position équatoriale), cette induction est limitée par la préférence pour l'alkylation en position axiale plutôt qu'équatoriale. Ainsi, suivant la nature de la chaîne alkyle, le *ratio* composé *cis*/composé *trans* est extrêmement variable.

Tableau 2. Influence des différentes chaînes alkyles sur l'excès diastéréoisomérique.

Chaîne alkyle	Rendement	Excès diastéréoisomérique (68-(S))
	92%	20%
	95%	10%
	92%	30%
	96%	50%

Les 2,5-di-oxopipérazines **68-(S)** et **68-(R)** ont ensuite été purifiées sur une colonne chromatographique à base de gel de silice. Les dioxopipérazines **68-(S)** et **68-(R)** ainsi séparées ont ensuite été engagées dans une seconde réaction d'alkylation en présence de LiHMDS et d'un agent électrophile (Tableau 3). L'alkylation de **68-(S)** conduit à la dioxopipérazine **69a-cis** de configuration majoritairement *cis* selon une induction 1,4-*cis*. La pipérazine **68-(R)** est engagée dans une seconde réaction d'alkylation suivant les mêmes conditions que **68-(S)** et donne un mélange de deux dioxopipérazines **69b-cis** et **69b-trans** avec des ratios fortement dépendants de la structure de l'agent alkylant (Tableau 3).

Tableau 3. Influence des chaînes alkyles sur la seconde alkylation des dioxopipérazines **68-(S)** et **68-(R)**.

Chaîne alkyle	Rendement 69a-cis	Rendement 69b-cis + 69b-trans	Excès diastéréoisomérique (69b)
	90%	90%	10% (<i>cis</i>)
	96%	95%	50% (<i>cis</i>)
	94%	90%	0% (<i>cis</i>)
	95%	96%	80% (<i>trans</i>)

Nous avons pu voir qu'il était possible, en utilisant des conformations préférentielles et en jouant sur l'encombrement stérique, d'effectuer des alkylations diastéréosélectives de 2,5-dioxopipérazines. Nous allons maintenant nous intéresser à la synthèse stéréosélective de 2-oxopipérazines mono et disubstituées.

B. Synthèse stéréosélective de 2-oxopipérazines 3,6-disubstituées

Plusieurs équipes se sont intéressées à la 3-alkylation diastéréosélective de 2-oxopipérazines portant en N^1 une copule chirale issue du leucinol ou du phénylglycinol. Cette stratégie de synthèse permet d'effectuer des alkylations hautement stéréosélectives avec une large gamme de substituants. Husson *et al.* [85,86] ont largement contribué à la mise en place de cette voie de synthèse. La 2-oxopipérazine clé **74** est synthétisée en cinq étapes à partir du *R*-phénylglycinol commercial (Schéma 17). La première étape consiste en un couplage peptidique entre la *N*-Boc-glycine et le *R*-phénylglycinol. L'amide **70** obtenu est alors réduit en l'amine puis la fonction alcool de cette molécule est ensuite protégée sous forme d'éther silylé. Le composé aminé **71** obtenu réagit ensuite en présence d'acide bromoacétique et de DCC pour donner l'amide **72**. La substitution intramoléculaire du brome par la fonction amine permet la cyclisation puis la déprotection de l'alcool fournit la dioxopipérazine clé **74** avec un rendement global de 34%.

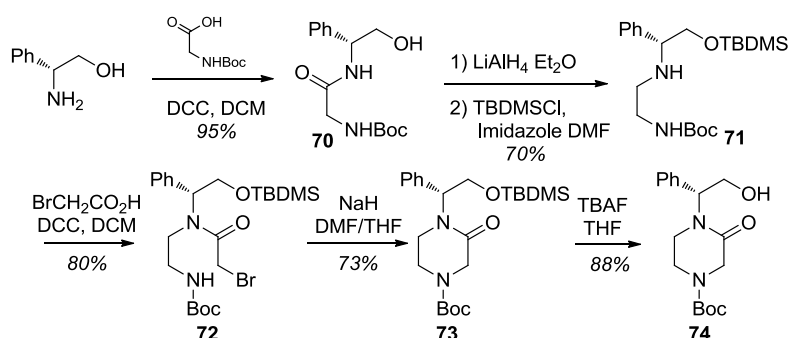


Schéma 17. Synthèse de la 2-oxopipérazine clé **74**.

Cette équipe a démontré que l'alkylation de ces molécules pouvait être hautement diastéréosélective. En présence de *t*-BuLi et d'hexaméthylphosphoramide (HMPA), les énolates correspondants sont obtenus. L'ajout d'électrophiles halogénés conduit à la formation de 2-oxopipérazines 3-substituées avec des excès diastéréoisomériques supérieurs à 95%. La diastéréosélectivité de ces réactions est expliquée par les auteurs à l'aide de l'intermédiaire **75** rigide à -78°C. Le lithium présent sur l'alcoolate est chélaté par l'azote, encombrant cette face. L'attaque se fait donc majoritairement en *anti* de la liaison N^1 -Lithium. La stéréochimie de l'alkylation est ainsi gouvernée par la copule chirale.

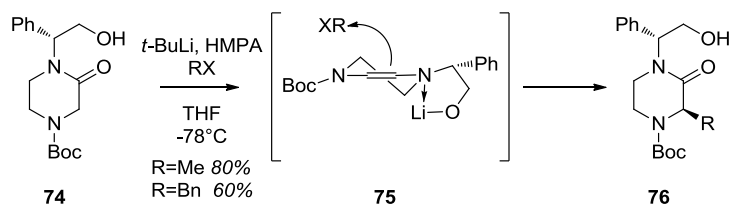


Schéma 18. Mécanisme proposé pour l'étape d'alkylation de la 2-oxopipérazine **74**.

Après réduction de l'amide **76** en amine et protection de l'alcool sous forme d'éther, la pipérazine **77** est engagée dans une seconde alkylation en présence de *s*-BuLi, de tétraméthyléthylènediamine (TMEDA) et d'un électrophile. Seuls les composés **78** *trans*-2,6-disubstitués ont été observés ce qui est concordant avec la littérature et notamment les travaux de Beak *et al.* portant sur la *trans*-alkylation de pipéridines 3-substituées.

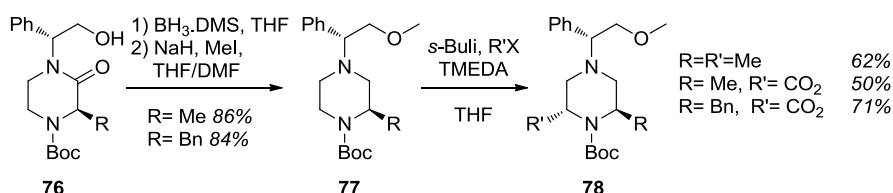


Schéma 19. Synthèse de pipérazine *trans*-disubstituées **78**.

En 2005, notre équipe, a développé une méthode d'alkylation stéréosélective de 2-oxopipérazines possédant une copule chirale « diéthanol ». Cette méthode, permet d'obtenir les diastéréoisomères 3(*S*) et 3(*R*) à partir d'une seule 2-oxopipérazine clé (Schéma 20). Une première voie de synthèse comprenant six étapes a été publiée [87]. La *O*-benzyl-L-sérine commerciale est estérifiée dans le méthanol en présence de chlorure de thionyle (SOCl₂) puis un couplage peptidique avec la Boc-glycine permet d'obtenir le dipeptide **80**. En présence de LiAlH₄, la fonction ester du dipeptide **80** est réduite en alcool, et la fonction amide est réduite en amine pour donner le diaminol **82**. Après une protection de l'alcool sous forme d'éther silylé, la diamine **83** subit une réaction d'amidification avec l'acide bromoacétique. Enfin la substitution intramoléculaire du brome permet d'obtenir la 2-oxopipérazine **85** avec un rendement global de 26%. Afin de contourner l'étape peu reproductible de réduction au LiAlH₄, une alternative de synthèse passant par l'intermédiaire thioamide **81** a été proposée, augmentant le rendement global à 47%.

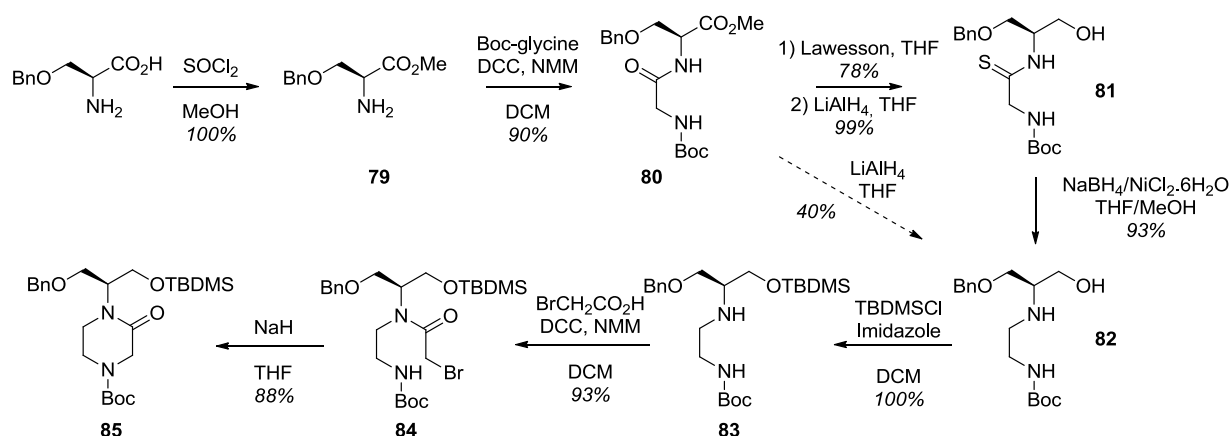
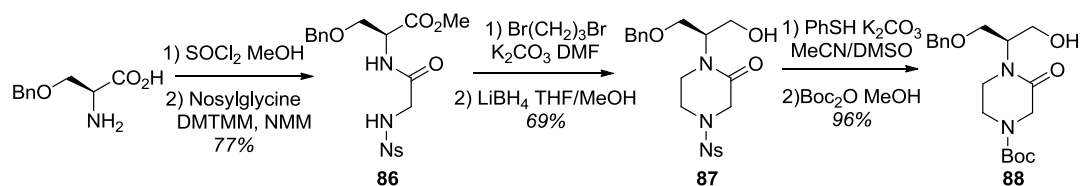


Schéma 20. Synthèse de l'oxopipérazine clé **85**.

Par la suite deux autres voies de synthèse ont été proposées (voies A et B) afin de réduire le nombre d'étapes et d'augmenter le rendement global (Schéma 21). La voie A évite le couplage avec l'acide bromoacétique et la réduction de la fonction amide. L'amine de la glycine n'est plus protégée sous forme de carbamate mais sous forme de sulfonamide, moins désactivant. Après estérification de la *O*-benzyl-L-sérine et couplage avec la nosylglycine, le dipeptide obtenu **86** est mis en présence de dibromopropane afin de former la 2-oxopipérazine **87**. La réduction spécifique de l'ester en alcool, puis le changement de groupement protecteur sur l'amine permettent de fournir la dioxopipérazine **88** désirée en six étapes avec un rendement global de 53%.

La voie B est la plus courte à ce jour, et permet d'obtenir la 2-oxopipérazine **88** en 5 étapes. La fonction amine de la sérine est, dans un premier temps, convertie en alcool **89**. Puis cet alcool **89** est converti en triflate avant d'être substitué par l'amine de la *N*-Boc-pipérazine pour conduire à l'amine **90**. Enfin une étape d'oxydation régiosélective en présence de dioxyde de rhuténium suivie d'une réduction de l'ester en alcool permettent d'obtenir la 2-oxopipérazine **88** avec un rendement global de 44%.

Voie A



Voie B

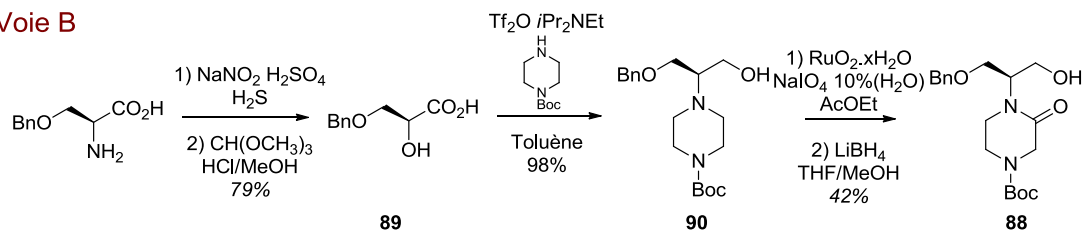


Schéma 21. Nouvelles voies d'accès pour la 2-oxopipérazine **88**.

Nous avons précédemment vu le mécanisme supposé de l'alkylation de 2-oxopipérazines portant une copule chirale. Pour former les différents stéréoisomères, il faut qu'une des deux fonctions alcools soit libre pour induire la stéréosélectivité de la réaction. Ici, les alcools de la copule chirale peuvent être déprotégés sélectivement selon la diastéréosélectivité souhaitée lors de l'étape d'alkylation. Le clivage du groupement benzyle peut être effectué par hydrogénolyse et l'éther silylé peut être clivé grâce au fluorure de tétrabutylammonium (TBAF). L'alkylation de ces molécules avec différents électrophiles est réalisée en présence de diisopropylamidure de lithium (LDA) et d'HMPA dans le THF. D'excellents excès diastéréoisomériques (>95%) ont été observés avec des rendements compris entre 77% et 89% [88].

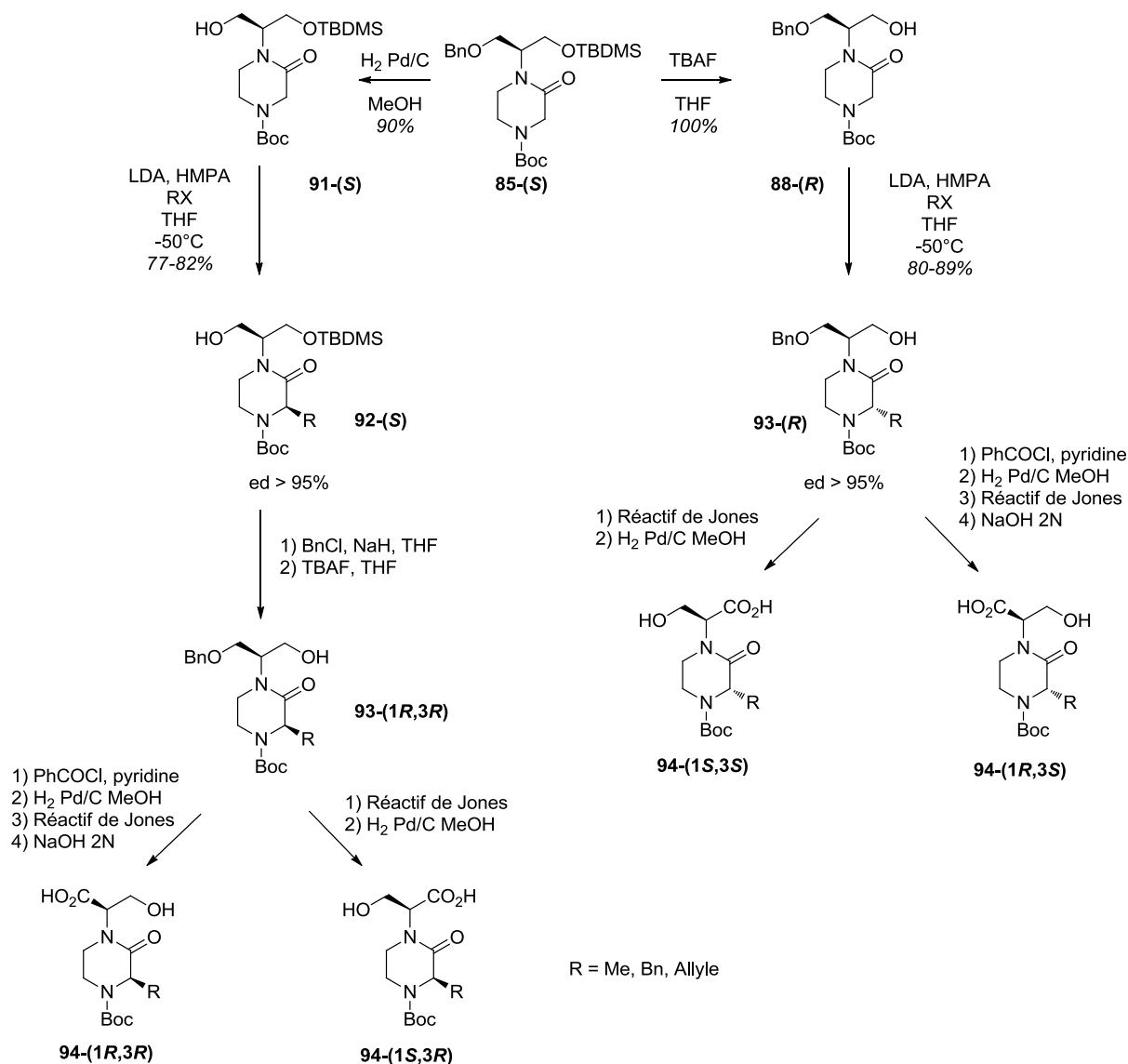


Schéma 22. Formation des quatre diastéréoisomères à partir de la 2-oxopipérazine **85-(S)**.

Plus récemment, Marine Pillon a développé, au sein du laboratoire, une synthèse permettant d'obtenir la dioxopipérazine clé **104** à partir du S-phénylglycinol, en 5 étapes avec un rendement global de 15% (Schéma 22). Une première étape de protection permet de protéger l'alcool du S-phénylglycinol puis une substitution nucléophile en présence du bromoacétate de méthyle **96** conduit à la formation de l'amine secondaire **97**. Cette amine réagit avec le chlorure de chloracétyle pour donner l'amide **99**. La substitution du chlore par l'amine de l'ester méthylique de S-phénylglycine suivie d'une cyclisation intramoléculaire permet d'obtenir la dioxopipérazine **102**. Enfin une étape de déprotection permet d'activer la première copule chirale.

Toutefois, lors de l'étape de cyclisation, une racémisation de la copule chirale portant la fonction ester a été observée. La perte de la configuration S peut certainement être

expliquée *via* la formation de l'énolate correspondant en présence de triéthylamine, le groupement phényle situé en α augmentant l'acidité du proton. Même si la séparation des diastéréoisomères formés peut être accomplie, lors des étapes d'alkylations la stéréochimie de cette copule chirale risque fortement d'être perturbée en présence de bases lithiées. Les premiers essais d'alkylations ont été interprétés comme ayant conduit à la formation du composé **104** avec un rendement de 35%.

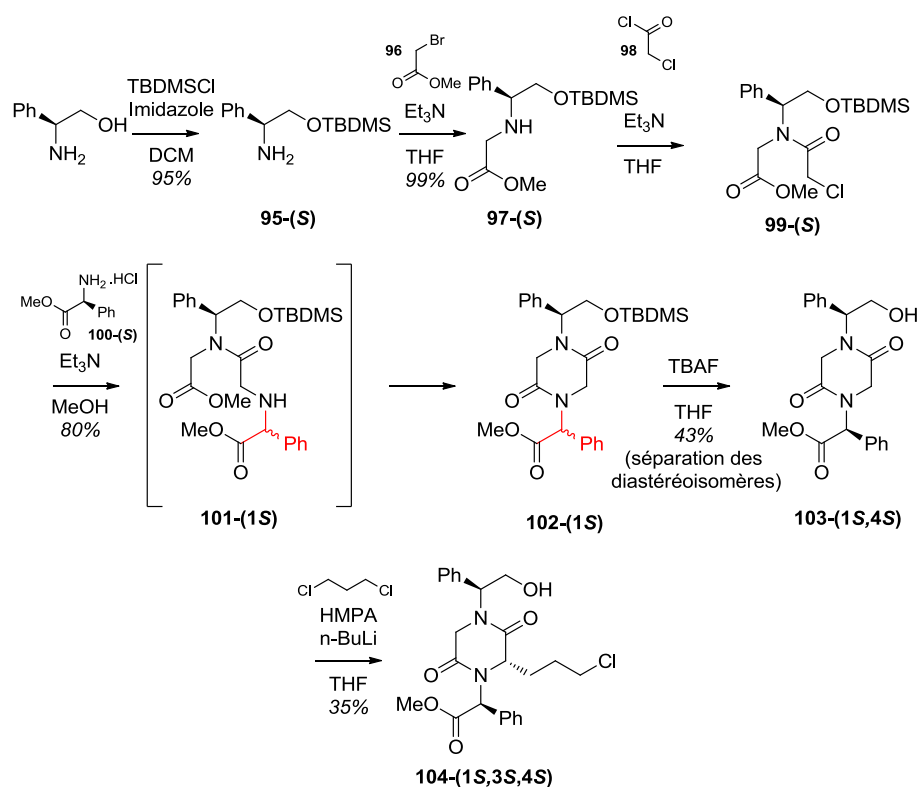


Schéma 23. Synthèse de la dioxopipérazine **104** 3-substituée par Marine Pillon.

L'objectif de cette thèse est de développer une méthode permettant l'alkylation stéréosélective de 2,5-dioxopipérazines afin de synthétiser l'**AR** et des analogues se différenciant par la nature de leurs fonctions chélatrices du fer ou par la configuration des centres stéréogènes portant ces ligands. Des études physico-chimiques des composés obtenus permettront de définir les sidérophores possédant la plus haute affinité pour le Fe(III) ainsi que la stœchiométrie des complexes formés. Enfin, un couplage avec un antibiotique (β -lactame ou fluoroquinolone) ou la complexation du Ga(III) par les sidérophores synthétisés permettront de créer des antibactériens dont les propriétés seront étudiées sur des souches tels qu'*E. coli* ou *P. aeruginosa*.

Dans un premier temps, les propriétés physico-chimiques de pipérazines 1,4-disubstituées, par des chaînes propyles portant des fonctions chélatrices du fer ferrique, seront également évaluées. Ces composés plus simples à synthétiser nous permettront de tester différentes fonctions chélatrices du fer afin d'orienter nos synthèses d'**aAR** vers certains groupements mieux reconnus ou ayant une plus grande affinité pour le fer ferrique. Trois principaux ligands seront testés : i) les catéchols, largement représentés chez les sidérophores bactériens mais dont l'affinité pour le Fe(III) est parfois faible en milieu acide, ii) les hydroxamates, particulièrement présents chez les sidérophores fongiques comme l'**AR** (Figure 34), iii) et les dérivés synthétiques hydroxypyridinone que l'on retrouve notamment dans le conjugué BAL30072, actuellement en essais cliniques.

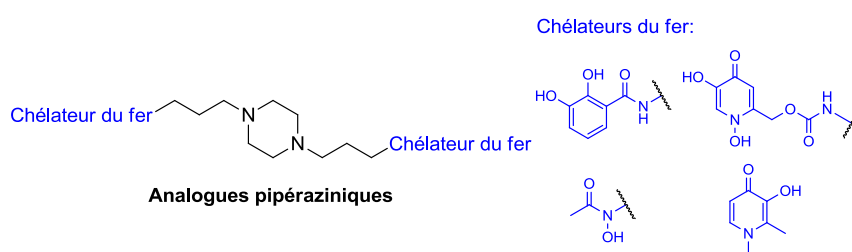


Figure 34. Pipérazines 1,4-disubstituées envisagées.

L'objectif principal de ce travail est de développer une synthèse de l'**AR** et des analogues 3,6-disubstitués. En reprenant les travaux précédemment effectués au laboratoire, nous obtiendrons une dioxopipérazine possédant deux copules chirales greffées sur les positions 1 et 4 à partir du (*S*) ou du (*R*)-phénylglycinol.

Ces inducteurs chiraux permettront de contrôler la stéréosélectivité des étapes d'alkylations en position 3 et 6. Nous avons choisi le (*S*) et le (*R*)-phénylglycinol comme copule chirale puisque l'hydrogénolyse de ces fragments sur des pipérazines avait déjà été décrite. En faisant varier la configuration de ces copules (*S,S*), (*R,R*), (*S,R*), (*R,S*), nous pourrions obtenir une bibliothèque de chélateurs du fer dont la stéréochimie varierait. Lorsque la configuration des deux inducteurs chiraux sera identique, nous devrions obtenir des dioxopipérazines *cis*-disubstituées, et lorsque cette configuration sera différente nous devrions synthétiser des composés *trans*-disubstitués (Schéma 24).

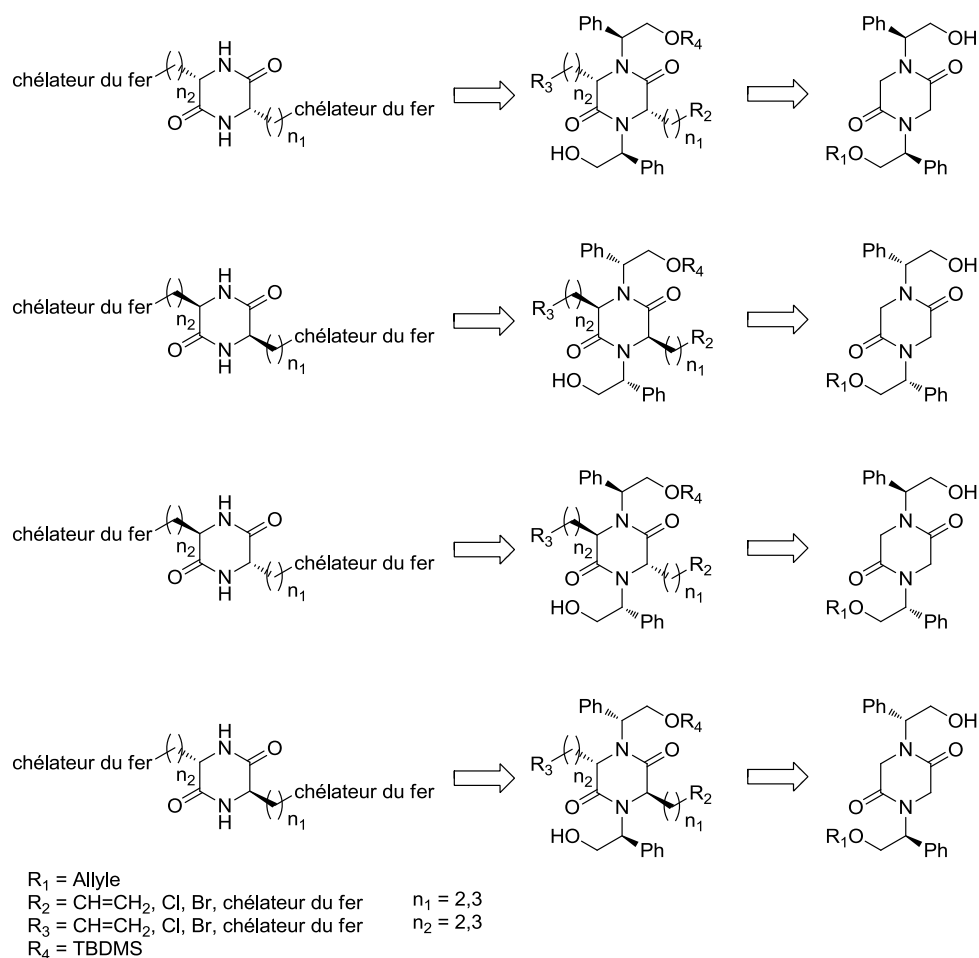


Schéma 24. Stratégie de synthèse pour obtenir les différents analogues dioxopipéraziniques.

Les dioxopipérazines clés nécessaires aux étapes d'alkylation pourront être synthétisées à partir du (*S*)- ou du (*R*)-phénylglycinol commercial. Puis, une ou deux étapes d'alkylation permettront de greffer les chaînes portant les groupements chélateurs du fer. Nous avons choisi comme ligands du fer quatre motifs : un catéchol, deux hydroxypyridinones et un hydroxamate.

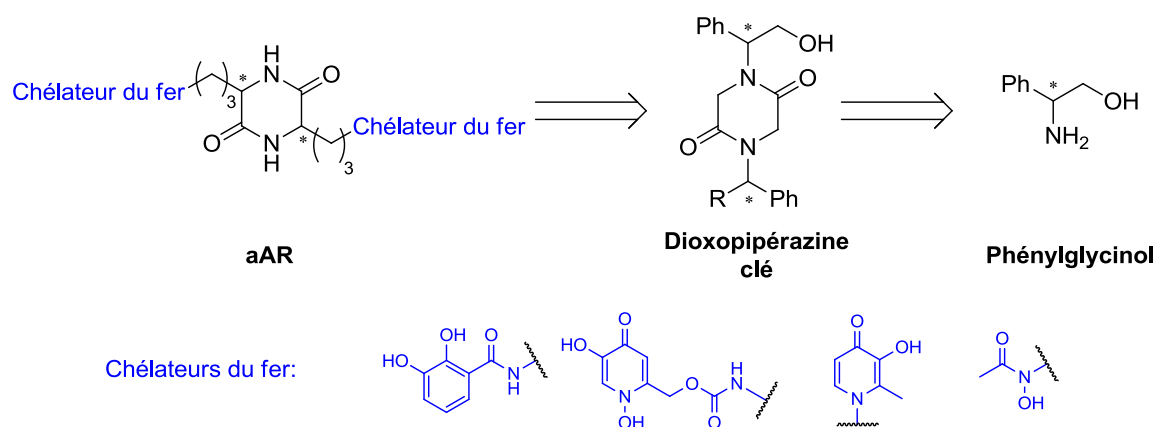


Schéma 25. Rétrosynthèse proposée pour l'obtention de l'AR et de ses analogues.

Nous développerons les synthèses des pipérazines 1,4-disubstituées et des dioxopipérazines 3,6-disubstituées avant de nous intéresser aux premiers résultats biologiques, réalisés au sein de l'équipe.

Résultats et Discussion

I. Synthèse de pipérazines 1,4-disubstituées portant des fonctions chélatrices du fer

L'objectif de cette thèse est de synthétiser l'**AR** et des analogues dioxopipéraziniques 3,6-disubstitués portant des fonctions chélatrices du fer. Pour orienter notre choix, quant à la nature de ces groupements chélateurs, nous avons décidé de poursuivre les travaux de thèse effectués, au sein de notre laboratoire, par Marine Pillon sur la synthèse de pipérazines 1,4-disubstituées par des chélateurs du fer. Comme nous l'avons vu précédemment (partie bibliographique, p 53-54), Marine Pillon, lors de ses travaux de thèse, a synthétisé des pipérazines portant des groupements chélateurs du fer de type catéchol **MPPS0225** et 2-méthyl-3-hydroxypyridinone **105a**. En s'inscrivant dans la continuité de ces travaux, nous avons souhaité synthétiser de nouveaux composés **105b-c** afin de tester leur capacité à chélater le fer et à être reconnu par les bactéries comme des analogues sidérophores. La synthèse de ces composés est plus simple et doit donc permettre de disposer d'une quantité plus importante de produits nécessaires à la réalisation des essais physico-chimiques qui nous aideront à déterminer les meilleurs ligands du Fe(III). Des essais de reconnaissance de ces ligands du fer par des bactéries à Gram négatif seront également réalisés au sein de l'équipe.

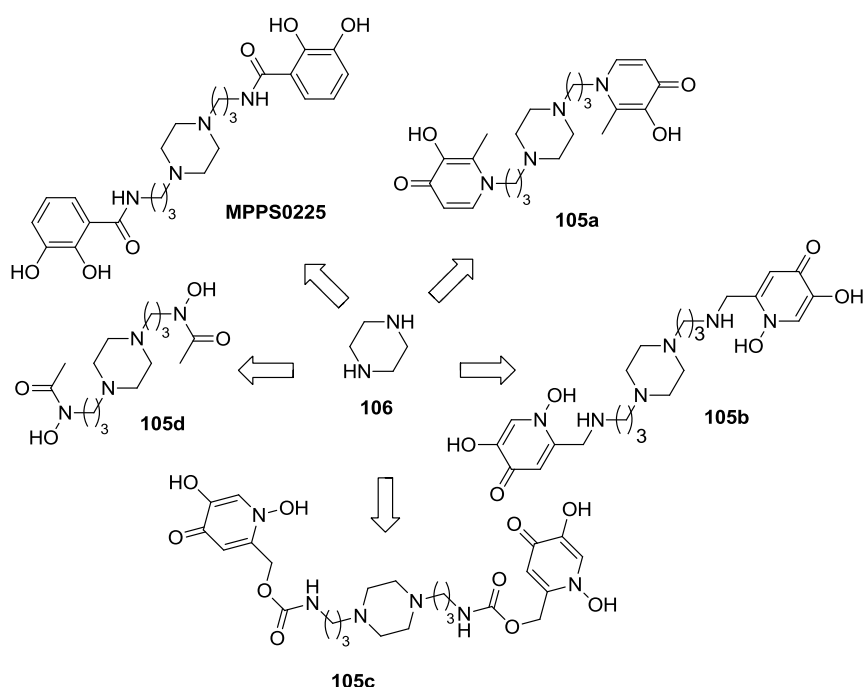


Schéma 26. Rétrosynthèse proposée pour l'obtention des analogues pipéraziniques **MPPS0225** et **105**.

A. Formation de pipérazines **105b** et **105c** 1,4-disubstituées par des chélateurs du fer de type 1,5-dihydroxy-2-(hydroxyméthyl)pyridinone

Nous avons, dans un premier temps, souhaité synthétiser un dérivé pipérazinique portant deux groupements chélateurs de type 1,5-dihydroxy-2-(hydroxyméthyl)pyridinone, motif que l'on retrouve notamment dans le conjugué BAL 30072 (Figure 21, p 48).

Les pipérazines 1,4-disubstituées **105b** et **105c** peuvent être obtenues à partir de la bis(aminopropyl)-pipérazine **107** et de la pyridinone **108** qui est accessible en trois étapes, à partir de l'acide kojique **109** (Schéma 27).

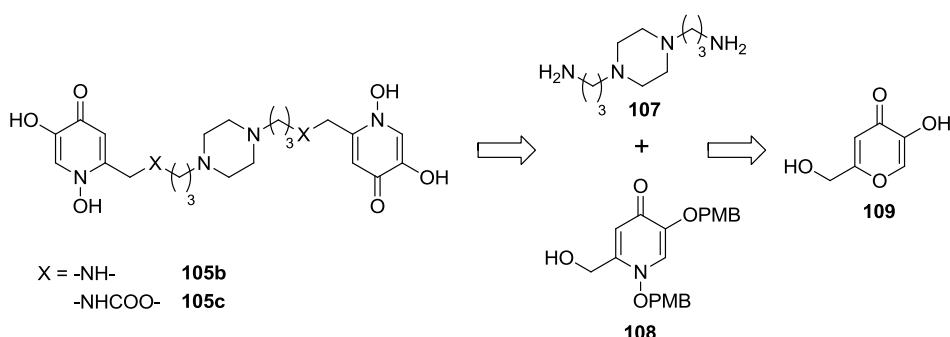


Schéma 27. Rétrosynthèse des pipérazines 1,4-disubstituées **105b** et **105c**.

Dans un premier temps nous avons synthétisé la pyridinone **108** à partir de l'acide kojique **109** (Schéma 28). La fonction éol de ce dernier est protégée en présence de bromure de benzyle dans la NMP. Une réaction de Michael est ensuite réalisée par l'hydroxylamine et le produit formé est directement mis en présence du chlorure de *p*-méthoxybenzyle et de carbonate de potassium. La pyridinone **108** désirée est ainsi obtenue avec un rendement global de 9%. Une hydrogénolyse pallado-catalysée de la pyridinone **108** a permis de fournir le chélateur bidenté **111** avec un rendement de 49%. Ce dernier a été synthétisé dans le but de comparer ses propriétés chélatrices du Fe(III) à celles d'autres motifs hydroxypyridinones.

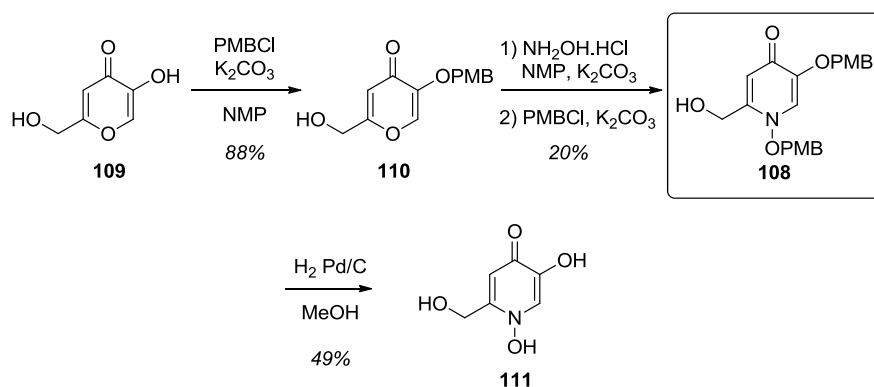


Schéma 28. Synthèse des pyridinones **108** et **111**.

Une fois la pyridinone **108** obtenue, nous nous sommes intéressés à la synthèse de la pipérazine 1,4-disubstituée **113**, précurseur du chélateur **105b** (Schéma 29). La première stratégie envisagée repose sur une réaction de double substitution nucléophile entre la pipérazine commerciale **107** et deux molécules de pyridinone **108**. Pour cela, l'alcool primaire de la pyridinone **108** est activé sous forme de mésylate à l'aide de chlorure de mésyle, en présence de triéthylamine. Cependant, bien que nous ayons observé la formation du mésylate **112** en spectrométrie de masse, nous n'avons pas observé la formation de la pipérazine 1,4-disubstituée **113** attendue.

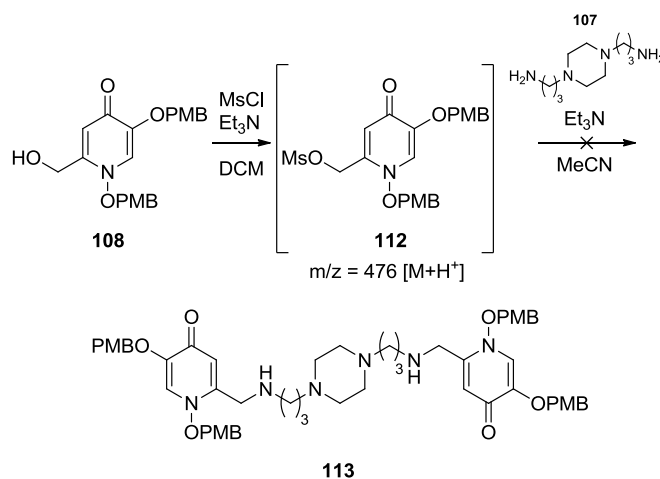


Schéma 29. Tentative de substitution du mésylate **112** pour accéder à la pipérazine **113**.

Nous avons alors procédé à l'activation de l'alcool primaire de la pyridinone **108** par une réaction de Mitsunobu. Malheureusement, ce nouvel essai ne nous a pas permis d'obtenir le produit **113** souhaité. En effet, seules les molécules initiales **107** et **108** ont été retrouvées en fin de réaction (Schéma 30).

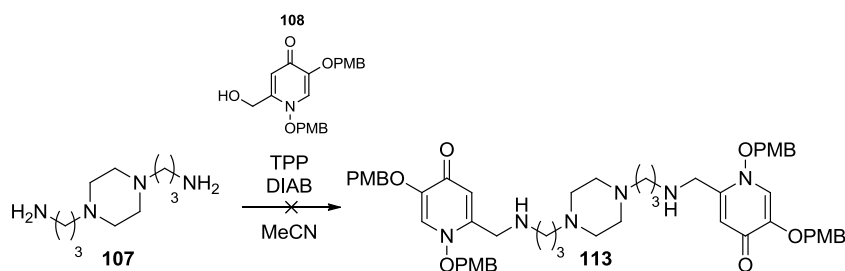


Schéma 30. Essai de substitution de **108** via une réaction de Mitsunobu pour accéder la pipérazine à **113**.

Face à ces difficultés, nous avons préféré relier la pyridinone **108** à la pipérazine **107** via une fonction carbamate et former la pipérazine **114**, précurseur de **105c** (Schéma 31). Pour ce faire, les deux entités ont été mises en présence de CDI dans le THF et le composé **114** a été obtenu avec un rendement de 38%.

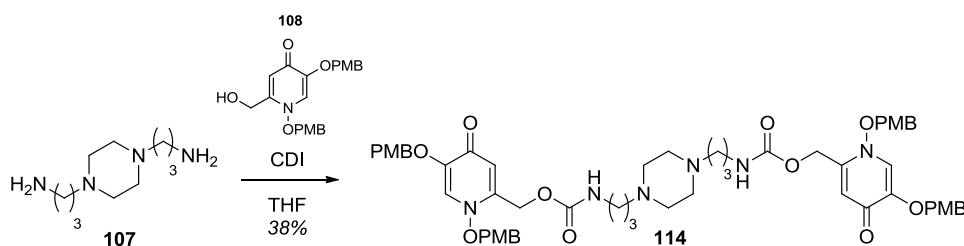


Schéma 31. Synthèse de la pipérazine 1,4-disubstituée **114**.

Une seule étape de clivage des groupements devait alors nous permettre d'accéder au produit désiré **105c** (Tableau 4). Dans un premier temps, des tests d'hydrogénolyse catalysés par du palladium sur charbon ont été réalisés avec 0,5 eq de catalyseur (Tableau 4, entrée 1). L'augmentation du nombre d'équivalents et de la durée de la réaction n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré (Tableau 4, entrées 2, 3 et 4). D'autres essais en présence d'un ou deux équivalents de BCl_3 ont également été réalisés sans succès (Tableau 4, entrées 5 et 6). Dans tous les cas, seule la matière première **114** a été isolée et aucune présence du produit **105c** n'a été détectée.

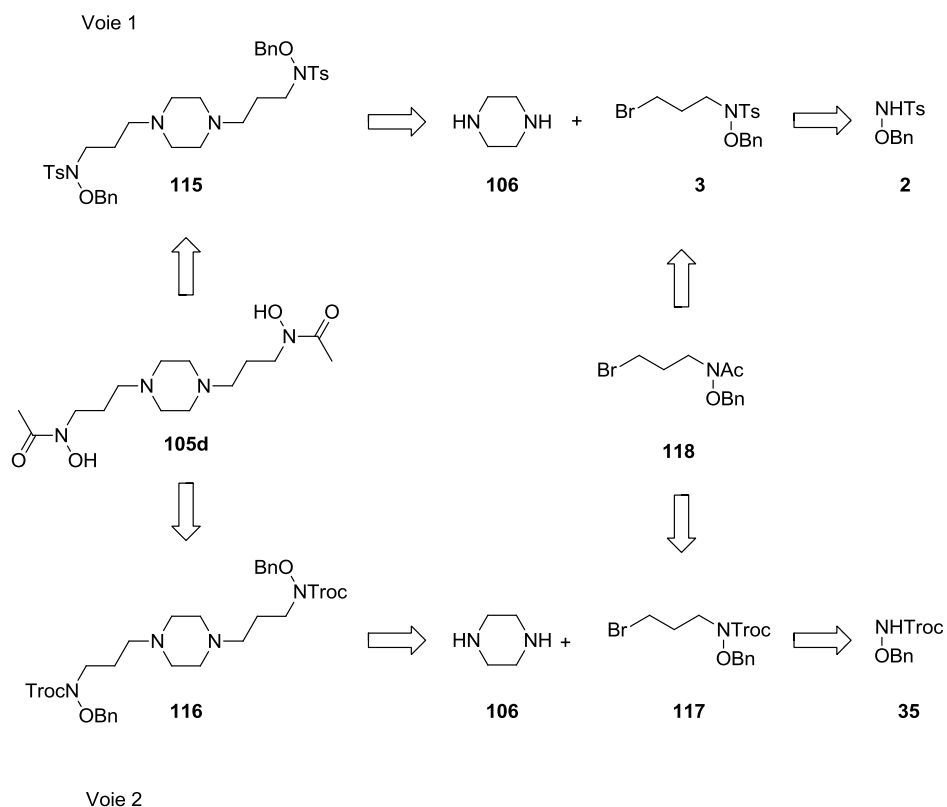


Schéma 32. Rétrosynthèse proposée pour l'obtention de la pipérazine **105d** et du dérivé halogéné **118**.

Après avoir présenté la synthèse des composés **3**, **117** et **118**, nous développerons la voie d'accès à **105d**.

1. Synthèse des dérivés halogénés **3** et **117** et **118**

Nous avons, en parallèle, développé deux voies de synthèse permettant d'obtenir les dérivés halogénés **3** et **117** dont l'amine est protégée respectivement sous forme de sulfonamide et de carbamate (Schéma 33). Prenant en compte les travaux d'Isowa *et al.* [70] (Schéma 2) et de Marine Pillon [89], nous avons dans un premier temps activée l'hydroxylamine **1** sous forme de sulfonamide, en présence de chlorure de tosyloxy et de pyridine, avec un rendement de 91%. Lors de ses travaux de thèse, Marine Pillon avait tenté de substituer le 1,3-dibromopropane par le sulfonamide **2** en reprenant les conditions développées par Isowa *et al.* Cependant, en présence d'éthanolate de sodium, le produit n'avait été isolé qu'avec un faible rendement et une pureté insuffisante. Nous avons alors choisi d'utiliser une autre base, le carbonate de césium. Dans ces conditions, le sulfonamide **2**

obtenu substitue le 1,3-dibromopropane pour conduire au bromopropylsulfonamide **3** avec un rendement de 63%.

En parallèle, nous avons effectué la même synthèse, avec l'hydroxylamine activée sous forme de carbamate **35**. Ce dernier est obtenu avec un rendement de 95%, en présence de bicarbonate de sodium et de chlorure de 2,2,2-trichloroéthoxycarbonyle. Puis en reprenant les conditions développées pour la formation du bromopropylsulfonamide **3** à partir de **2**, le bromopropylcarbamate **117** a été synthétisé avec un rendement de 79%.

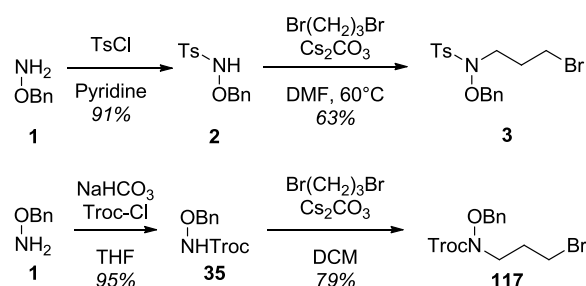


Schéma 33. Synthèses des dérivés halogénés **3** et **117**.

Pour valider les voies de synthèse proposées, un premier test de clivage du groupement tosylo ou Troc a été réalisé. En présence d'acide bromhydrique et de phénol, à 60°C, le bromosulfonamide **3** n'a pas pu être déprotégé. En revanche, le groupement Troc a pu facilement être clivé avec des conditions plus douces, et la *N*-acétylation a pu être réalisée au cours de cette même étape, permettant d'obtenir l'hydroxamate protégé **118** avec un rendement de 67%. Suite à ces résultats, nous avons décidé de poursuivre la synthèse uniquement avec le groupement Troc. Par ailleurs, le dérivé halogéné **118** pourra être utilisé dans d'autres synthèses afin de greffer facilement une fonction hydroxamate.

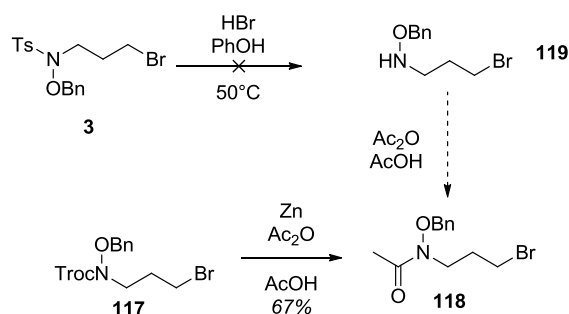


Schéma 34. Synthèse du dérivé hydroxamate **118** à partir de **3** et **117**.

Le spectre RMN du composé **118** ci-dessous, indique bien un singulet à 4,84 ppm correspondant au groupement CH₂ du benzyle, deux triplets à 3,79 ppm et 3,43 ppm correspondant aux groupements CH₂ situés aux extrémités de la chaîne propyle, un quintuplet à 2,19 ppm correspondant au groupement CH₂ restant de la chaîne propyle et un singulet à 2,11 ppm correspondant aux hydrogènes présents sur l'acétyle.

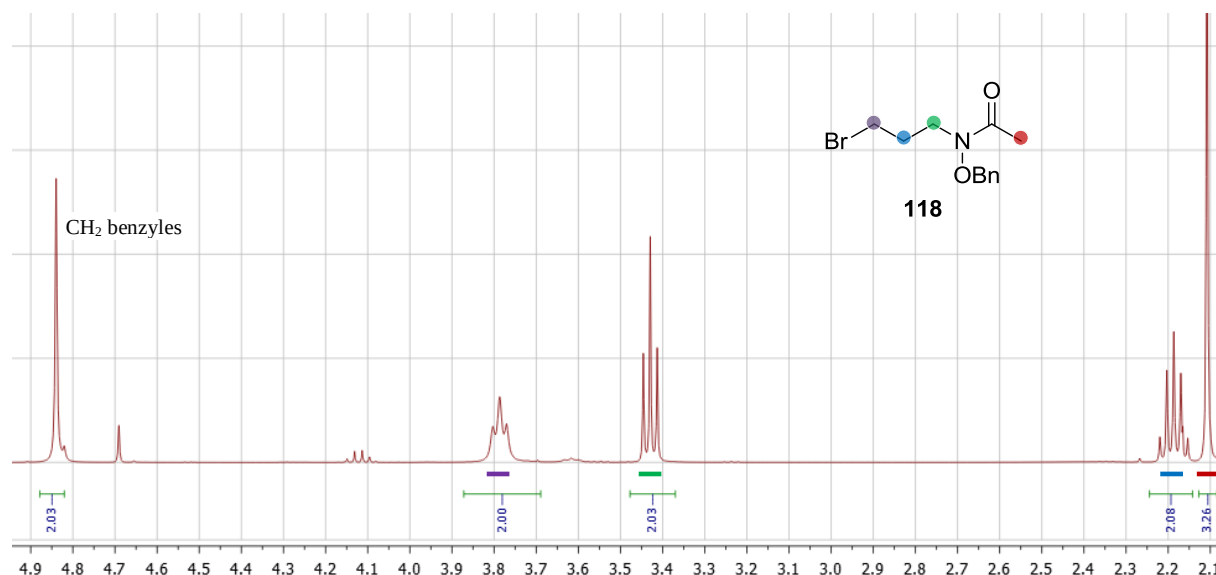


Figure 35. Analyse du spectre RMN ¹H du dérivé hydroxamate **118**.

Nous sommes ainsi parvenus à obtenir le dérivé halogéné **118** avec un rendement global de 50%. Ce dernier pourra être utilisé, par la suite, pour la synthèse de dioxopipérazines 3,6-disubstituées. Le groupement protecteur Troc nous a permis de réduire le nombre d'étapes par comparaison au groupement tosyle. Par ailleurs, le clivage de ce groupement est plus aisé à réaliser que celui du groupement tosyle. Le dérivé halogéné **117** obtenu, nous avons donc poursuivi la synthèse de **105d** selon la voie 2.

2. Synthèse de la pipérazine 1,4-disubstituée **105d** par la voie 2

Ayant obtenu le dérivé hydroxamate **118**, nous aurions pu réaliser la substitution de ce dernier par la pipérazine **106**. Cependant, le groupement acétyle présent dans **118** étant plus fragile que le groupement Troc présent dans **117**, nous avons préféré utiliser ce dernier pour réaliser la di-alkylation de la pipérazine **106**. En présence de triéthylamine, dans le DCM, la

pipérazine 1,4-disubstituée **116** est obtenue avec un rendement de 38%. Puis, le clivage des groupements Troc suivi d'une acétylation permet d'obtenir la pipérazine **120** possédant deux fonctions hydroxamates benzylées avec un rendement de 87% (Schéma 35).

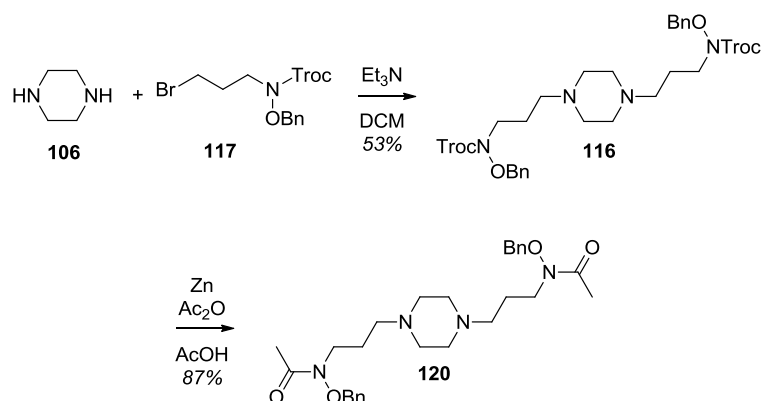


Schéma 35. Synthèse de la dioxopipérazine 1,4 disubstituée **120**.

L'étape de clivage des fonctions benzyles s'est révélée problématique et malgré les différents tests effectués, nous ne sommes pas parvenus à déprotéger les fonctions hydroxamates correspondantes (Tableau 5). Dans un premier temps, des essais d'hydrogénolyse ont été réalisés en présence de palladium sur charbon (Tableau 5, entrée 1). N'obtenant pas le produit désiré, le nombre d'équivalents de catalyseur et la durée de la réaction ont été augmentés (Tableau 5, entrées 2, 3, 4 vs entrée 1) en vain. Enfin, deux essais ont été effectués en présence d'un ou de deux équivalents de BCl₃ mais, là encore, nous ne sommes pas parvenus à déprotéger les fonctions hydroxamates. Lors de tous ces essais, seule la matière première a pu être retrouvée.

Tableau 5. Essais de clivage des groupements benzyles pour obtenir **105d**.

Essais	Réactif/Catalyseur	Nombre d'équivalents	Durée	Observations
1	Pd/C	0,5	2h	Matière première 120
2	Pd/C	1	12h	Matière première 120
3	Pd/C	2	24h	Matière première 120
4	Pd/C	4	24h	Matière première 120
5	BCl ₃	1	4h	Matière première 120
6	BCl ₃	2	4h	Matière première 120

L'étude des voies de synthèse des pipérazines **105b**, **105c**, et **105d** nous a permis d'obtenir les intermédiaires protégés **114** et **120** avec des rendements globaux respectifs de 7% et 33% (Schémas 31 et 35). Des problèmes de clivage des groupements benzyles et PMB ne nous ont pas permis d'obtenir les composés finaux désirés **105b**, **105c**, ou **105d**. Des essais à l'aide d'un réacteur à hydrogène permettant le contrôle des températures et de pression seront effectués et pourraient permettre de déprotéger nos produits. Cependant, nous avons réussi à obtenir l'hydroxypyridinone **111** en quantité suffisante pour réaliser des tests physico-chimiques. Ces études devraient permettre d'établir les pKa et pFe de **111** puis de les comparer à ceux d'autres groupements chélateurs du fer de type hydroxypyridinone.

Nous allons maintenant présenter les travaux effectués sur la synthèse de dioxopipérazines 3,6-disubstituées par des fonctions chélatrices du Fe(III).

II. Synthèse de dioxopipérazines 3,6-disubstituées : acide rhodotorulique et analogues

Parallèlement à la préparation des pipérazines 1,4-disubstituées par différents groupements chélateurs du fer, nous nous sommes intéressés à notre objectif principal : la synthèse de l'**AR** et de ses analogues **121** se différenciant selon la nature des fonctions chélatrices du fer (catéchol, hydroxypyridinone) et selon la stéréochimie. Plusieurs voies de synthèse ont été mises en place : i) *via* l'alkylation stéréosélective de dioxopipérazines (voies A_1 et A_2 , schéma 36) et ii) à partir de l'ornithine ou l'acide glutamique (voies B_1 et B_2 , schéma 36).

Les voies A_1 et A_2 reposent sur l'alkylation stéréosélective de dioxopipérazines comportant des inducteurs chiraux en position 1 et 4 de la dioxopipérazine. Selon la configuration absolue des centres stéréogènes des copules chirales, il est possible d'obtenir des dioxopipérazines *cis* et *trans*-disubstituées **121** de manière rapide et convergente. La voie A_1 comporte deux étapes d'alkylations qui permettent de greffer deux chaînes l'une après l'autre par un jeu d'activation et de désactivation des copules chirales. Les chaînes greffées possèdent déjà des fonctions chélatrices du fer (R_3 = hydroxamate, catéchol, hydroxypyridinone) ou sont facilement fonctionnalisables ($-\text{CH}_2\text{R}_2$ = halogénopropyle, allyle). Dans ce dernier cas, les fonctions chélatrices sensibles peuvent être introduites en fin de synthèse. La dioxopipérazine monosubstituée **123** peut être accessible *via* les dioxopipérazines **103** et **124** dont l'une des copules chirales est activée et l'autre protégée sous forme d'ester méthylique **103** ou d'éther allylique **124**. Celle-ci est obtenue à partir d'un intermédiaire chloracétamide **99** nécessaire également à la synthèse des dioxopipérazines par la voie A_2 . Cet intermédiaire est disponible en 3 étapes à partir du (*R*) ou (*S*)-phénylglycinol. Cette voie possède l'avantage, par rapport à la voie A_2 , de pouvoir greffer deux chaînes différentes sur la dioxopipérazine et d'obtenir éventuellement des analogues dont la nature des deux groupements chélateurs diffère. La voie A_2 est, quant à elle, plus rapide car les deux alkylations sont effectuées en une seule étape au cours de laquelle les deux copules chirales de la dioxopipérazine **127** sont activées. Comme pour la voie A_1 , les chaînes greffées possèdent déjà des fonctions chélatrices du fer (R_3 = hydroxamate, catéchol, hydroxypyridinone) ou sont facilement fonctionnalisables ($-\text{CH}_2\text{R}_2$ = halogénopropyle, allyle) afin de pouvoir placer les groupements chélateurs du fer en fin de synthèse.

Les voies B₁ et B₂ consistent en la synthèse de dioxopipérazines 3,6-disubstituées dont la stéréochimie est dépendante de la configuration absolue des centres stéréogènes des acides aminés choisis comme matières premières. La première voie (B₁), qui s'inspire de la voie de biosynthèse de l'**AR**, nécessite deux couplages successifs entre deux *N*^δ-hydroxyornithines **128** et **129**. Ces composés résultent de la *N*^δ-hydroxylation de l'ornithine **130**, une étape souvent délicate et limitante. L'ornithine **130** nécessaire à la réalisation de cette réaction est obtenue à partir de la glutamine **131**. La seconde voie (B₂) permet d'obtenir des dioxopipérazines *cis*-disubstituées symétriques à partir d'un intermédiaire original de type dioxopipérazine pyroglutamique **132**, accessible rapidement à partir de l'acide glutamique **133**. L'ouverture des cycles pyrrolidines et la greffe de groupements chélateurs du fer conduisent à l'obtention de dioxopipérazines 3,6-disubstituées par des fonctions chélatrices du fer. Cependant, la très haute polarité des intermédiaires de cette synthèse peut entraîner des problèmes de solubilité dans les solvants classiques.

Voies A : Alkylations stéréosélectives

Voies B : *via* l'ornithine ou le glutamate

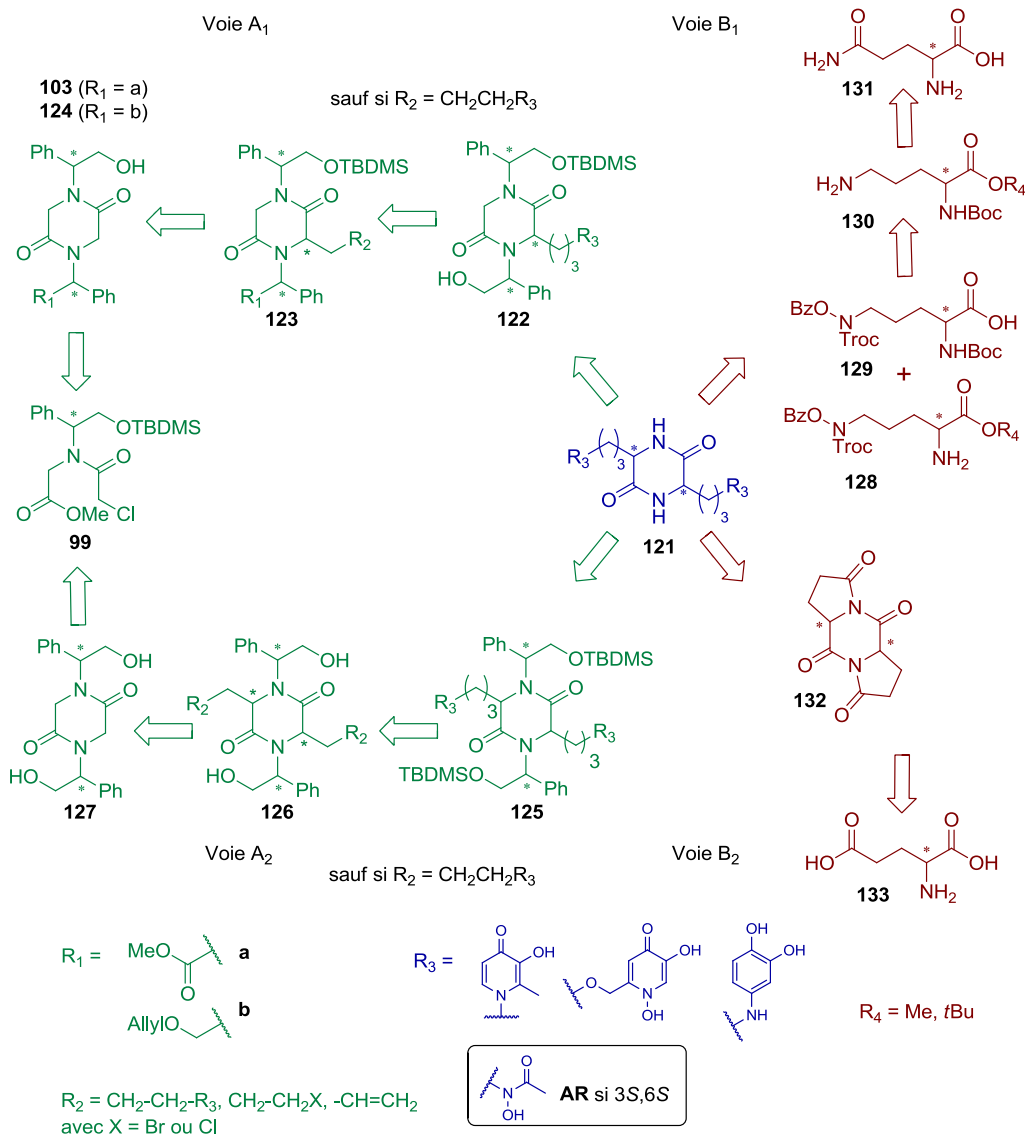


Schéma 36. Rétrosynthèse pour l'obtention de dioxopipérazines **121** 3,6-disubstituées par des groupements chélateurs du fer.

A. Synthèse des dioxopipérazines 3,6-disubstituées : voies A₁ et A₂

Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés, à la synthèse des dioxopipérazines **121** *cis*-disubstituées (3*S*,6*S* et 3*R*,6*R*) afin d'obtenir l'**AR** possédant une configuration absolue 3*S*,6*S*. Comme indiqué précédemment, les voies A₁ et A₂ reposent sur l'alkylation stéréosélective de dioxopipérazines comportant des inducteurs chiraux. Selon la

configuration absolue des centres stéréogènes des copules chirales, nous pouvons obtenir la dioxopipérazine **121** de la configuration absolue de notre choix. Ainsi, les dioxopipérazines **121** de configuration absolue 3*S*,6*S* sont obtenues lorsque les copules chirales sont de configurations absolues *S* et les dioxopipérazines **121** de configuration absolue 3*R*,6*R* sont obtenues lorsqu'elles sont de configurations *R*. La première voie (A₁) réside dans la synthèse des dioxopipérazines **103** et **124** dont une seule copule chirale est activée. Deux étapes d'alkylation sont nécessaires afin de greffer des chaînes facilement fonctionnalisables (halogénopropyle, allyle) ou portant des fonctions chélatrices du fer telles que les groupements hydroxamates, catéchols ou hydroxypyridinones. Un jeu de protection/déprotection des copules permet d'activer alternativement ces dernières. Cette voie, plus longue que la voie A₂, possède l'avantage de pouvoir synthétiser des composés possédant deux groupements chélateurs du fer différents (Schéma 37). Elle permet également d'obtenir des dioxopipérazines finales *trans*-disubstituées si les copules chirales utilisées sont de configurations absolues opposées puisqu'elles peuvent être déprotégées alternativement.

La seconde voie (A₂) consiste en la synthèse des dioxopipérazines clés **127** dont les deux copules chirales sont activées. Une seule étape d'alkylation permet alors de greffer en position 3 et 6 de la dioxopipérazine les chaînes souhaitées. Les dioxopipérazines **103**, **124** et **127** nécessaires à la réalisation de ces deux voies sont issues des chloracétamides **99** qui sont cyclisés en présence des différentes copules chirales (ester **134a**, éther allylique **134b**, éther silylé **95**). Selon la configuration absolue souhaitée, cet intermédiaire clé est obtenu à partir du (*R*)- ou (*S*)-phénylglycinol.

Dans un premier temps, nous développerons la synthèse des intermédiaires chloracétamides **99-(S)** et **-(R)** puis nous nous intéresserons à l'obtention des dioxopipérazines clés **103**, **124** et **127** avant d'aborder les différents essais d'alkylation effectués sur ces composés.

1. Synthèse des intermédiaires chloracétamides **99-(S)** et **-(R)**

Les intermédiaires chloracétamides clés **99-(S)** et **(R)** peuvent être synthétisés en trois étapes respectivement à partir du selon la stratégie mise au point précédemment au laboratoire (Schéma 38)[89]. Dans un premier temps, l'alcool du (S)- ou (R)-phénylglycinol est protégé sous forme d'éther silylé en présence de TBDMSCl et d'imidazole, avec des rendements respectifs de 98% et 97%. Puis les amines **95-(S)** et **95-(R)** obtenues réagissent avec le bromoacétate de méthyle pour donner les amines secondaires **97-(S)** et **97-(R)** avec des rendements respectifs de 69% et 73%. Enfin, celles-ci réagissent avec le chlorure de chloracétyle **98** et de la triéthylamine dans du dichlorométhane pour former les amides **99-(S)** et **99-(R)** avec des rendements respectifs de 82% et 78%. Les intermédiaires clés **99-(S)** et **99-(R)** sont ainsi obtenus avec un rendement global de 55% pour les deux énantiomères et avec un pouvoir rotatoire de + 26 (c 0,23; AcOEt) et – 28 (c 0,25; AcOEt) respectivement.

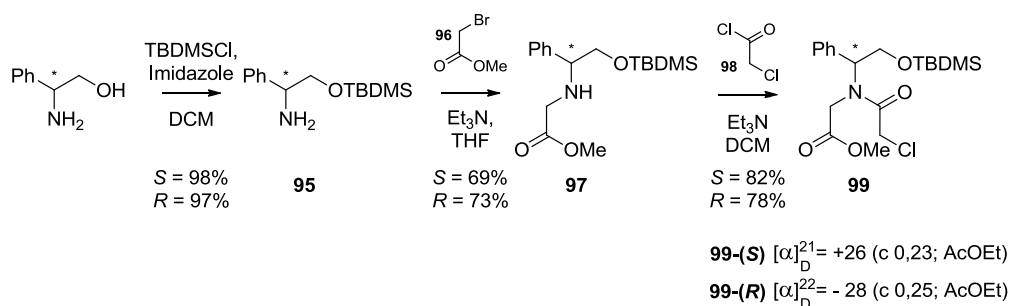


Schéma 38. Synthèse des intermédiaires chloracétamide **99-(S)** et **-(R)**.

2. Synthèse des copules chirales 2-(allyloxy)-1-phényléthanamine **134-b**

Pour obtenir les copules **134b-(S)** et **134b-(R)** dont l'alcool est protégé sous forme d'éther allylique (Schéma 36, 37 et 39), nous avons proposé une synthèse en trois étapes à partir du (S)- et du (R)-phénylglycinol (Schéma 39). L'amine de ces composés est d'abord protégée sous forme de carbamate en présence de dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc_2O) puis les alcools obtenus **135-(S)** et **135-(R)** substituent l'halogène du bromure d'allyle pour donner l'éther allylique **136-(S)** et **-(R)**. Enfin les amines sont déprotégées à l'aide d'un traitement acide. Les copules chirales protégées **134b-(S)** et **134b-(R)** sont ainsi obtenues avec des rendements globaux respectifs de 48% et 49%, des pouvoirs rotatoires respectifs de +11 (c 0,18; AcOEt) et -10 (c 0,13; AcOEt).

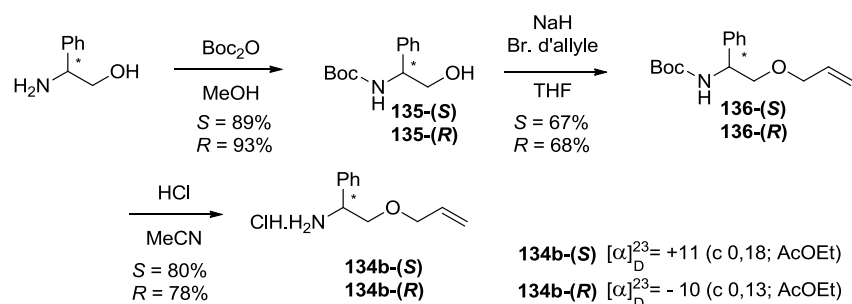


Schéma 39. Synthèse des copules 2-(allyloxy)-1-phényléthanamine **134b-(S)** et **-(R)**.

Une fois ces copules chirales obtenues, nous nous sommes intéressés à la formation du cycle dioxopipérazinique.

3. Formation des dioxopipérazines **103**, **124** et **127**

a. Synthèse de la dioxopipérazine **103-(1S,4S)**

La synthèse de la dioxopipérazine **103-(1S,4S)** a déjà été décrite au laboratoire lors de la thèse de Marine Pillon. Cependant, un problème de racémisation de la seconde copule chirale au cours de l'étape de cyclisation l'avait empêchée d'obtenir la dioxopipérazine **103-(1S,4S)** souhaitée (Schéma 40). Cette racémisation s'explique par la déprotonation en α de l'ester par la triéthylamine, la présence du groupement phényle en position α favorisant l'acidité du proton méthylénique.

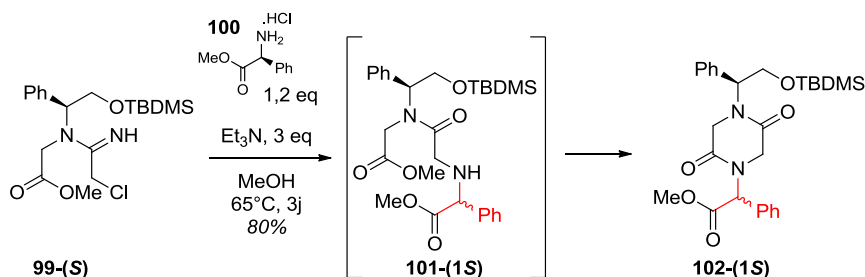


Schéma 40. Synthèse de la dioxopipérazine **102** et racémisation de la seconde copule chirale.

Pour tenter de limiter ce phénomène de racémisation, nous avons repris les mêmes conditions que précédemment utilisées mais en modifiant certains paramètres tels que : i) le temps de réaction qui a été abaissé de deux jours (Tableau 6, entrée 1), ii) la quantité de base qui a été diminuée de 0,5 équivalents (Tableau 6, entrée 2) et iii) la température qui a été abaissée de 25°C (Tableau 6, entrée 3). Malheureusement, la modification de ces paramètres a entraîné une chute du rendement sans pour autant améliorer le rapport diastéréoisomérique.

Tableau 6. Optimisations effectuées pour tenter de limiter le phénomène de racémisation de la dioxopipérazine **102a**.

Entrée	Température	Durée	Et ₃ N	Isomérisation ¹ 102-(1S,4S)/ 102-(1S,4R)	Rendement
1	65	1j	3 eq	1 : 1	46%
2	65	3j	2,5 eq	1 : 1	42%
3	40	3j	2,5 eq	1 : 1	35%

1. déterminé par RMN ¹H

Bien que la séparation des deux diastéréoisomères puisse être aisément réalisée par chromatographie sur gel de silice, le faible rendement (< 50%) nous a contraints à changer de système de protection pour cette copule. De plus, lors de l'étape d'alkylation, des bases extrêmement fortes telles que les bases lithiées risqueraient d'entraîner de nouveau une racémisation de cette copule. La protection de la copule chirale sous forme d'éther allylique nous a semblé être une bonne alternative car ce groupement résiste à ce type de bases. Par ailleurs, son clivage ne compromet pas la stabilité des éthers silylés (système de protection de la première copule chirale) et réciproquement, les éthers allyliques résistent aux méthodes de déprotection des éthers silylés.

b. Synthèse des dioxopipérazines 124 et 127

Les dioxopipérazines **124** et **127** peuvent être obtenues en deux étapes à partir des chloracétamides **99** précédemment synthétisés (Schéma 41). Ceux-ci sont cyclisés en présence des amines **134b** ou **95** et de triéthylamine dans du méthanol au reflux. Enfin le clivage de l'éther silylé à l'aide de TBAF fournit les dioxopipérazines clés **124** et **127** avec des rendements globaux respectifs de 26% (*S,S*), 28% (*R,R*) et 29% (*S,S*), 26% (*R,R*), des pouvoirs rotatoires respectifs de -63 (c 0,38; AcOEt) +68 (c 0,34; AcOEt) -57 (c 0,44; AcOEt) +59 (c 0,47 ; AcOEt) et des excès diastéréoisomériques supérieurs à 95% (déterminés par RMN ^1H).

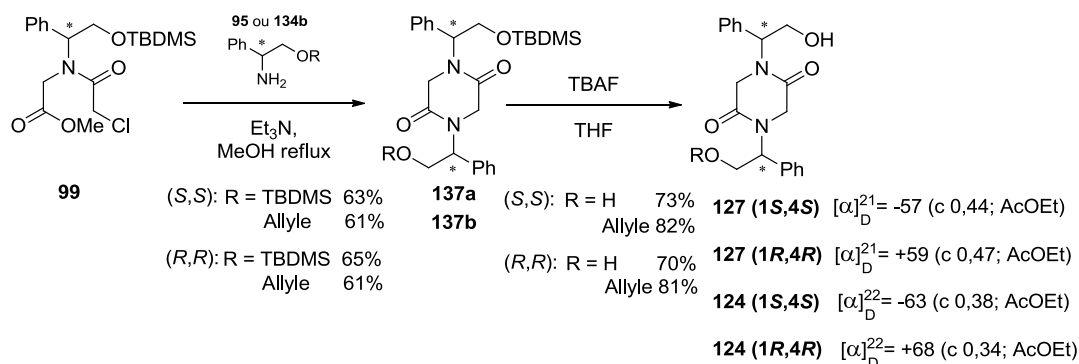


Schéma 41. Synthèse des dioxopipérazines clés **124** et **127**.

Ces quatre dioxopipérazines clés obtenues, nous nous sommes intéressés à l'étape d'alkylation avec pour ambition de greffer des chaînes portant déjà les groupements chélateurs du Fe(III). L'objectif principal étant d'obtenir l'**AR**, nous avons d'abord travaillé sur des chélateurs du fer de type hydroxamate.

4. Synthèse de l'acide rhodotorulique : voie A₁

Trois premières voies synthétiques (A_{1a}, A_{1b} et A_{1c}) ont été testées pour obtenir l'**AR** (Schéma 42). Ces trois voies ont comme intermédiaire commun la dioxopipérazine **124-(1S,4S)**. Celle-ci subit une première alkylation stéréosélective avec assistance de la copule chirale phénylglycinol de configuration *S* déprotégée pour obtenir les dioxopipérazines 3-

substituées **138-(1S,3S,4S)**, **140-(1S,3S,4S)** ou **143-(1S,3S,4S)** selon la voie choisie (A_{1a} , A_{1b} ou A_{1c}). Puis un jeu de protection/déprotection permet d'activer la seconde copule chirale, qui assistera la seconde alkylation, tout en inactivant la première. L'utilisation de la première voie (A_{1a}) permet d'introduire, dès le départ, le ligand du fer protégé tandis que les voies A_{1b} et A_{1c} passent par des intermédiaires halogénés **141-(1S,3S,4S,6S)** (voie A_{1b}) ou allylique **144-(1S,3S,4S,6S)** (voie A_{1c}). Ces deux dernières voies permettent ainsi d'introduire le groupement hydroxamate sensible lors de la dernière étape. Après introduction de la chaîne halogénée (voie A_{1b}), une substitution nucléophile est réalisée en présence de la *O*-benzyl-*N*-Troc-hydroxylamine puis une étape d'acétylation conduit au précurseur **142-(1S,3S,4S,6S)** de l'AR. Lorsque la chaîne carbonée allylique est introduite, une hydroboration suivie d'une hydrolyse conduit au diol **145-(1S,3S,4S,6S)** qui subit une réaction de Mitsunobu en présence de la *O*-benzyl-*N*-Troc-hydroxylamine. Une étape supplémentaire d'acétylation fournit le précurseur de l'AR **142-(1S,3S,4S,6S)**. La dernière étape de ces trois voies consiste en une hydrogénéolyse afin de cliver les copules chirales et ainsi obtenir l'AR.

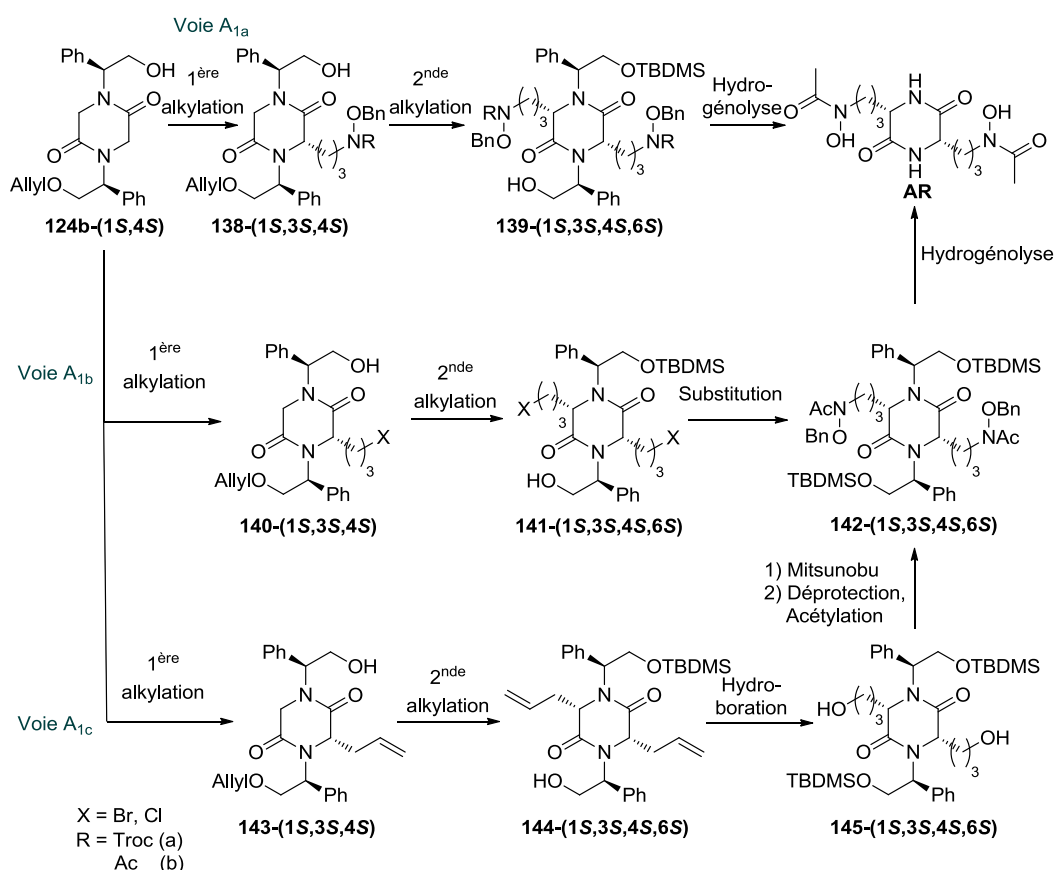


Schéma 42. Synthèses proposées pour obtenir l'AR selon la voie A_1 .

Les alkylations stéréosélectives étant des étapes délicates et limitantes, nous avons souhaité optimiser cette réaction sur la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** avec un halogénure simple, le bromure de benzyle.

a. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine 124-(1S,4S) avec le bromure de benzyle

Suite aux précédents travaux réalisés au laboratoire sur les 2-oxopipérazines et les premiers essais effectués durant la thèse de Marine Pillon sur l'alkylation de dioxopipérazine, nous avons utilisé comme premières conditions réactionnelles le *tert*-butyllithium (*t*-BuLi) comme base en présence d'hexaméthylphosphoramide (HMPA) à -78°C dans du THF (Tableau 7, entrée 1). Plus précisément, la dioxopipérazine **124** (1 éq) et l'HMPA (3 éq) ont d'abord été mis en solution dans du THF refroidi à -78°C, puis la base lithiée a été ajoutée. Au bout d'une heure, 3 équivalent de bromure de benzyle dilué dans du THF ont été additionnés. Le milieu a été agité à -78°C pendant 4h avant d'être neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium.

Malheureusement, ce premier essai s'est révélé infructueux. Aucun produit d'alkylation n'a été observé, la matière première **124** ayant été récupérée dans sa totalité. Nous avons alors supposé que l'énolate de lithium ne parvenait pas à se former à -78°C. La température a donc été modifiée et nous avons, cette fois, mis en solution la dioxopipérazine **124** dans le THF à -10°C avant que la base lithiée ne soit ajoutée (Tableau 7, entrée 2). Cette température a été maintenue pendant 1 heure puis elle a été abaissée à -78°C avant l'ajout du bromure de benzyle. Le même protocole que précédemment a ensuite été appliqué.

Ce deuxième essai a été efficace puisque la dioxopipérazine monosubstituée **146-(1S,3S,4S)** a été obtenue avec 47% de rendement. Afin d'améliorer ce dernier, une autre base lithiée, l'hexaméthylidisilazane de lithium (LiHMDS) a été utilisée sans changer les autres paramètres. Ce changement de base nous a permis d'augmenter le rendement de la réaction à 65% (entrée 3 vs 2). Enfin, nous avons voulu savoir si la présence d'HMPA et les trois équivalents de bases étaient essentiels. Les tests réalisés ont montré que l'absence d'HMPA ne diminuait pas significativement le rendement (entrées 4 vs 3). En revanche, les trois équivalents de base sont indispensables pour garantir un meilleur rendement (entrée 5 vs entrée 4).

Tableau 7. Essais d'alkylation avec le bromure de benzyle.

124-(1S,4S) $\xrightarrow[\text{THF, -78}^\circ\text{C}]{\text{BnBr, Base}}$ 146-(1S,3S,4S)						
Entrée	Base	Quantité de base	HMPA	Rendement	Température	ed
1	<i>t</i> -BuLi	3	3eq	0%	-78°C	ND
2	<i>t</i> -BuLi	3	3eq	47%	-10°C puis -78°C	ND
3	LiHMDS	3	3eq	65%	-10°C puis -78°C	ND
4	LiHMDS	3	-	64%	-10°C puis -78°C	63% ¹
5	LiHMDS	2	-	58%	-10°C puis -78°C	ND

¹ déterminé par RMN ¹H

Au cours de ces réactions, la formation de deux diastéréoisomères a été observée. Un excès diastéréoisomérique de 63% a été déterminé par LCMS pour l'essai 4 (Figure 36), confirmant bien la stéréosélectivité de la réaction.

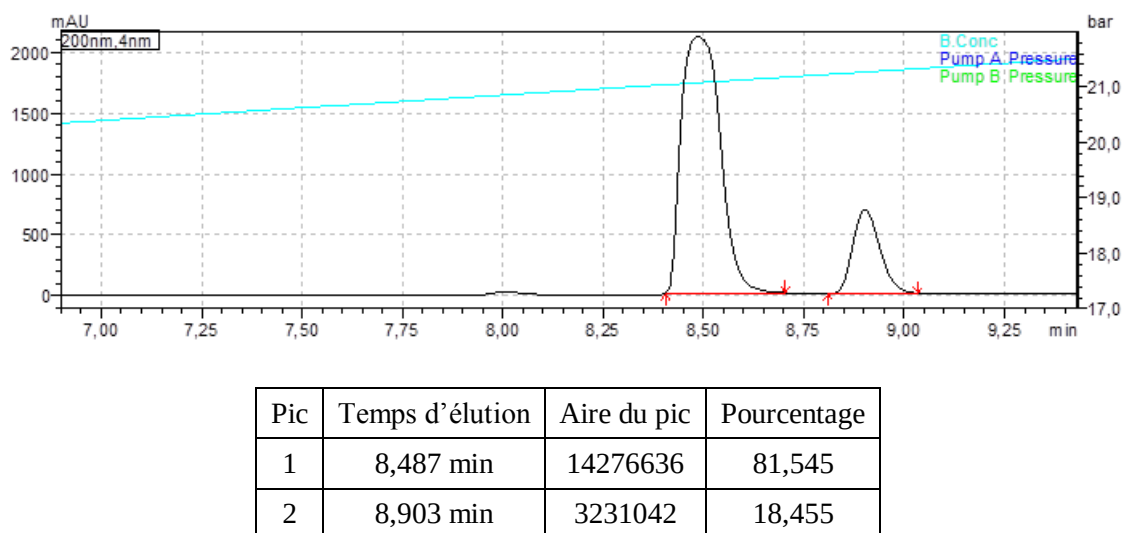


Figure 36. Spectre LCMS représentant la séparation des deux diastéréoisomères **146-(1S,3S,4S)** et **146-(1S,3R,4S)** obtenues.

D'après les études menées au laboratoire sur l'alkylation de 2-oxopipérazines portant une copule chirale phénylglycinol, le diastéréoisomère majoritaire doit être celui de configuration absolue (3S).

Forts de ces résultats, nous nous sommes intéressés à l'alkylation de la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** en présence du dérivé halogéné **117** obtenu précédemment.

b. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** avec le dérivé bromé **117** : voie A_{1a}

La dioxopipérazine **124-(1S,4S)** a ainsi été mise en réaction avec le dérivé bromé **117** dans les meilleures conditions précédemment développées pour l'accès à la dioxopipérazine **138a-(1S,3S,4S)** (Tableau 7, entrée 4). Ces conditions réactionnelles ne nous ont cependant pas permis d'obtenir le produit souhaité **138a-(1S,3S,4S)**. En effet, après étude des spectres de masse et de RMN, le produit a été identifié comme étant le dérivé bromé **147-(1S,4S)**. La chimiosélectivité préférentielle de la réaction a conduit non pas à la substitution du dérivé bromé comme pressenti, mais à la substitution de la fonction carbamate. Par ailleurs, aucun excès diastéréoisomérique n'a été observé, le proton situé entre les deux fonctions oxo étant trop acide pour permettre la rétention d'une configuration particulière.

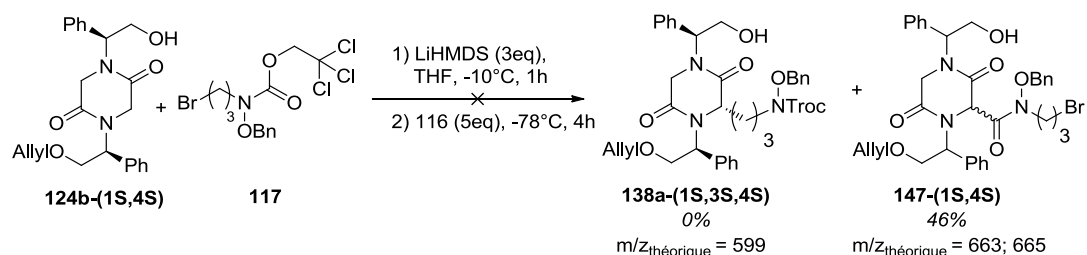


Schéma 43a. Alkylation de la dioxopipérazine **124b-(1S,4S)** en présence du précurseur hydroxamate **117**.

Le spectre RMN ¹H de la dioxopipérazine **147-(1S,4S)**, après interprétation du spectre COSY, (Figure 37) indique bien la présence d'une chaîne propyle (quintuplet 2, triplet 3, triplet 1), d'un groupement allyle (multiplets 9, 8 et 7) et des deux copules chirales (triplet 6, multiplet 5, multiplet 11 et multiplet 12). On remarque également que les hydrogènes 3 sortent sous la forme d'un triplet, confirmant le fait que la chaîne propyle n'est pas directement liée au cycle dioxopipérazinique puisqu'ils ne couplent pas avec l'hydrogène n°4.

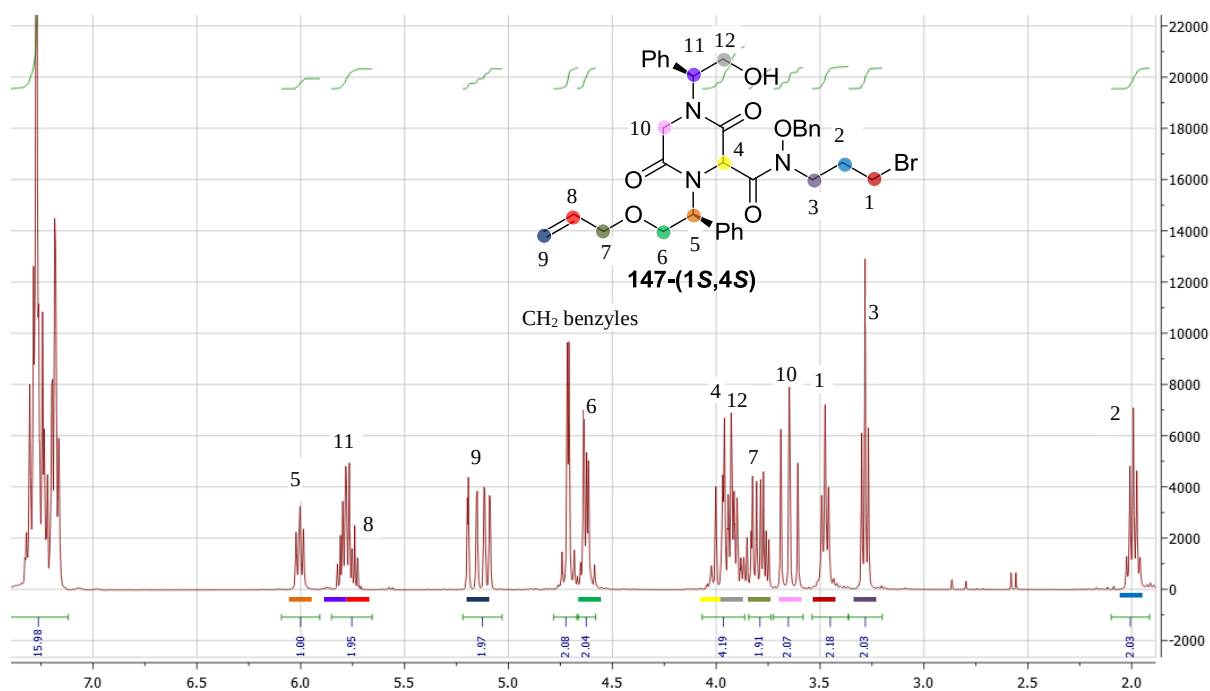


Figure 37. Spectre RMN de la dioxopipérazine **147-(1S,4S)**.

Le spectre de masse, quant à lui, confirme bien la présence d'un brome et indique une masse de 686-688 m/z correspondante à la masse du produit **147-(1S,4S)** (663 ; 665 m/z) plus celle d'un adduit sodium (23 m/z).

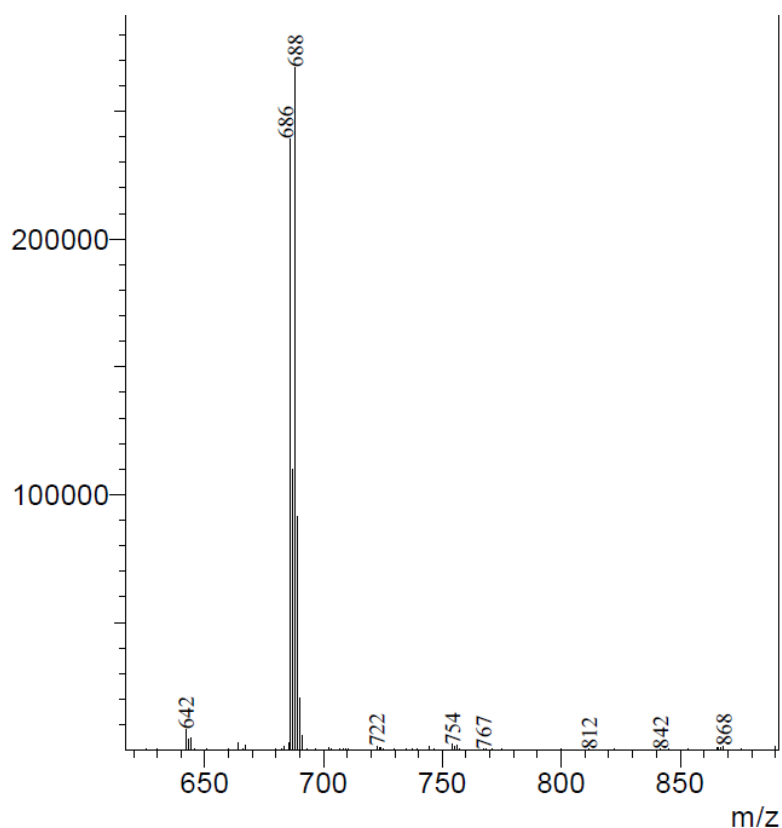


Figure 38. Spectre de masse de la dioxopipérazine **147-(1S,4S)**.

Après cet échec, nous avons décidé de réaliser un essai d'alkylation de la dioxopipérazine **124b-(1S,4S)** avec le dérivé halogéné **118**. Malheureusement nous n'avons pas obtenu le composé **138b-(1S,3S,4S)** désiré, seule la dégradation de l'hydroxamate **118** a été observée (Schéma 43b).

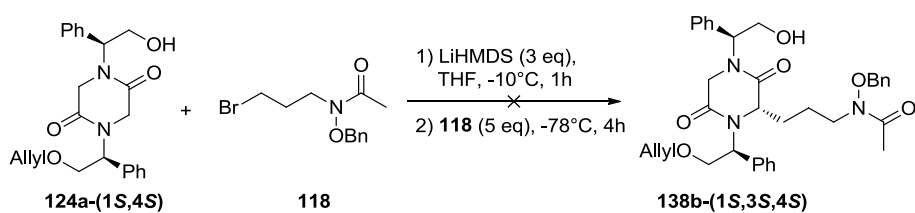


Schéma 43b. Essai d'alkylation de la dioxopipérazine **124b-(1S,4S)** avec le dérivé hydroxamate **118**.

Afin d'éviter la dégradation du dérivé hydroxamate et de contourner les problèmes de chimiosélectivité, deux autres voies (A_{1b} et A_{1c} , Schéma 42) permettant l'introduction du groupement hydroxamate en fin de synthèse ont été envisagées pour obtenir l'**AR**.

c. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine 124b-(1*S*,4*S*) avec des 1,3-dihalogénopropanes : voie A_{1b}

La stratégie de synthèse de la voie A_{1b} repose sur deux alkylations stéréosélectives successives en présence de dihalogénopropane comme électrophile. Après avoir obtenu la dioxopipérazine disubstituée **141-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*)**, trois étapes sont encore nécessaires pour introduire les fonctions hydroxamates et obtenir l'**AR** : i) substitution des halogènes avec la *O*-benzyl-*N*-Troc-hydroxylamine **2**, ii) clivage des groupements Troc et acétylation simultanée des groupements hydroxylamines, iii) clivage des copules chirales et débenzylations par hydrogénolyse (Schéma 44).

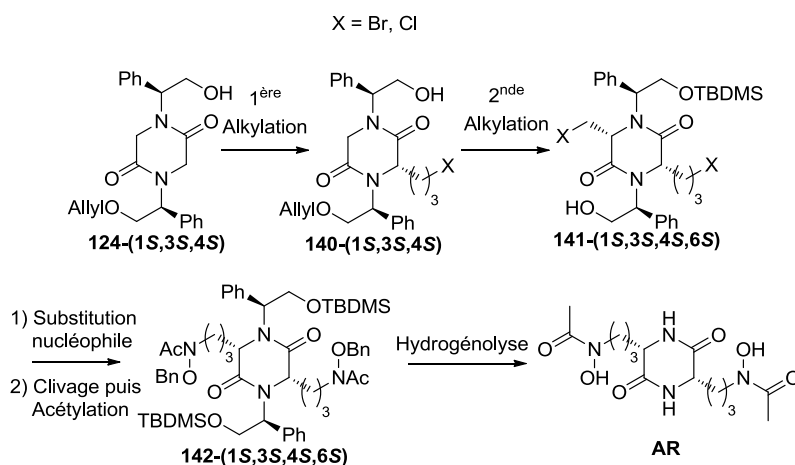


Schéma 44. Voie A_{1b} pour la synthèse de l'**AR**.

Afin d'obtenir l'**AR**, une première alkylation a été effectuée à l'aide de 1,3-dibromopropane dans les conditions précédemment optimisées (Tableau 7, entrée 4) avec le bromure de benzyle. Dans ces conditions d'alkylation, la formation de la dioxopipérazine souhaitée **140-(1*S*,3*S*,4*S*)** a bien été observée mais avec un faible rendement de 10% (Schéma 45). Le produit majoritaire **143-(1*S*,3*S*,4*S*)** (35%) porte une chaîne allyle au lieu de la chaîne bromopropyle (Schéma 44). Deux hypothèses sont alors possibles : i) l'acide bromhydrique est éliminé après formation du composé **140-(1*S*,3*S*,4*S*)** par l'excès de base, ii) l'acide bromhydrique est éliminé, entraînant la formation de bromure d'allyle qui réagit avec la dioxopipérazine **124-(1*S*,3*S*,4*S*)**.

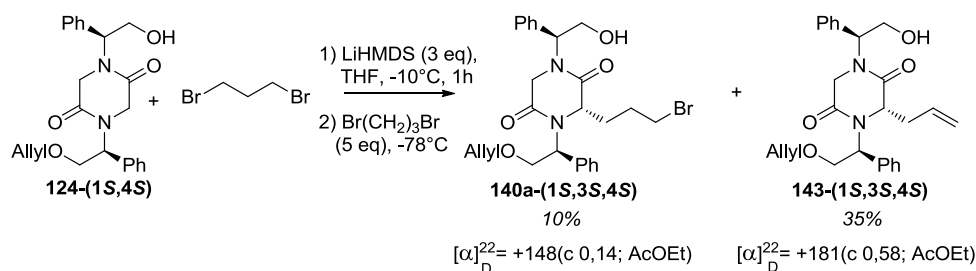


Schéma 45. Alkylation de la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** en présence de 1,3-dibromopropane.

Pour tenter de limiter ce phénomène, nous avons testé la réaction avec différents 1,3-dihalogénopropanes et analysé les bruts réactionnels en LCMS (Tableau 8a). L'utilisation du 1,3-bromochloropropane (Tableau 8a, entrée 2) a permis de diminuer la formation du composé allylé, le chlore étant moins nucléofuge que le brome. La réduction du nombre d'équivalents de base a également été un facteur significatif pour favoriser la synthèse de la dioxopipérazine **140-(1S,3S,4S)** (Tableau 8a, entrée 4 vs entrée 2) puisque nous sommes parvenus à synthétiser majoritairement le composé halogéné **140-(1S,3S,4S)**. Enfin, l'introduction du 1,3-chloroiodopropane s'est révélée être le meilleur compromis : l'iode permettant une réaction d'alkylation rapide et le chlore assurant une plus grande stabilité face à l'élimination (Tableau 8a, entrée 5 vs entrée 1, 2 et 3). Nous sommes même parvenus à inhiber totalement la formation du composé allylique **143-(1S,3S,4S)** en réduisant la quantité de base (Tableau 8a, entrée 6).

Tableau 8a. Optimisations pour limiter la formation du composé allylique **143-(1S,3S,4S)**.

Entrée	X	Y	Equivalents de base	Rapport 140/143	Rendement global
1	Br	Br	3	2 : 7 ¹	45%
2	Br	Cl	3	5 : 7 ¹	22%
3	Cl	Cl	3	7 : 10 ¹	17%
4	Br	Cl	1.5	13 : 4 ¹	17%
5	I	Cl	3	3 : 1 ¹	25%
6	I	Cl	1.5	1 : 0 ¹	9%

¹ Rapports déterminés par LCMS

Malgré l'amélioration de la chimiosélectivité de la réaction, nous ne sommes pas parvenus à obtenir des rendements satisfaisants, nous avons décidé de ne pas poursuivre dans cette voie, et de tenter la réaction d'alkylation en présence de bromure d'allyle (voie A_{1c}).

d. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** avec le bromure d'allyle : voie A_{1c}

La stratégie de synthèse de la voie A_{1c} repose sur deux alkylations stéréosélectives successives en présence de bromure d'allyle comme électrophile (Schéma 46). Après avoir obtenu la dioxopipérazine disubstituée **144-(1S,3S,4S,6S)**, quatre étapes sont encore nécessaires pour introduire les fonctions hydroxamates et obtenir l'**AR** : i) formation des chaînes propanols par hydroboration suivie d'une hydrolyse, ii) substitution des alcools par la *O*-benzyl-*N*-Troc-hydroxylamine **35** grâce à une réaction de Mitsunobu, iii) clivage des groupements Troc et acétylation simultanée des fonctions hydroxylamines, iv) clivage des copules chirales et déprotection des groupements benzyles par hydrogénolyse.

.

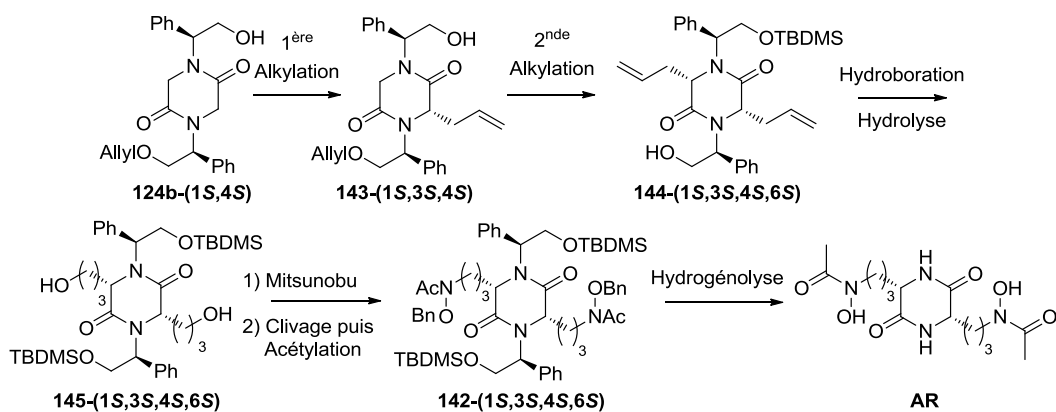


Schéma 46. Voie A_{1c} pour la synthèse de l'AR.

Afin d'obtenir **143-(1S,3S,4S)**, une première alkylation a été effectuée à l'aide du bromure d'allyle dans les conditions précédemment optimisées (Tableau 7, entrée 4) avec le bromure de benzyle. Ces conditions d'alkylation nous ont permis d'obtenir la dioxopipérazine souhaitée **143-(1S,3S,4S)** avec un rendement de 53% (Schéma 47).

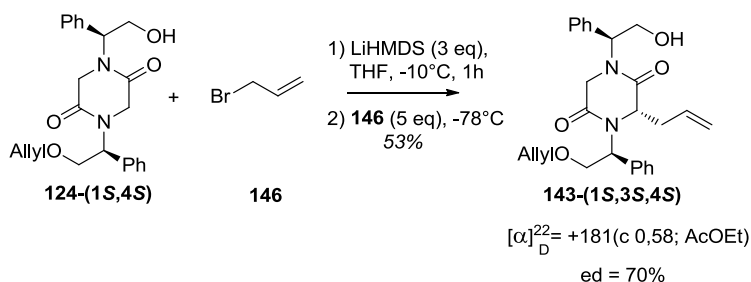


Schéma 47. Synthèse de la dioxopipérazine **143-(1S,3S,4S)**.

Le spectre RMN ¹H de la dioxopipérazine **143-(1S,3S,4S)**, après interprétation du spectre COSY, (Figure 39) indique bien la présence de deux doubles liaisons (multiplets 1, 2, 8 et 9), du cycle dioxopipérazinique (multiplets 4 et 10), des deux copules chirales (multiplets 5, 6, 11 et 12) ainsi que les deux groupements CH₂ des allyles (multiplets 7 et 3).

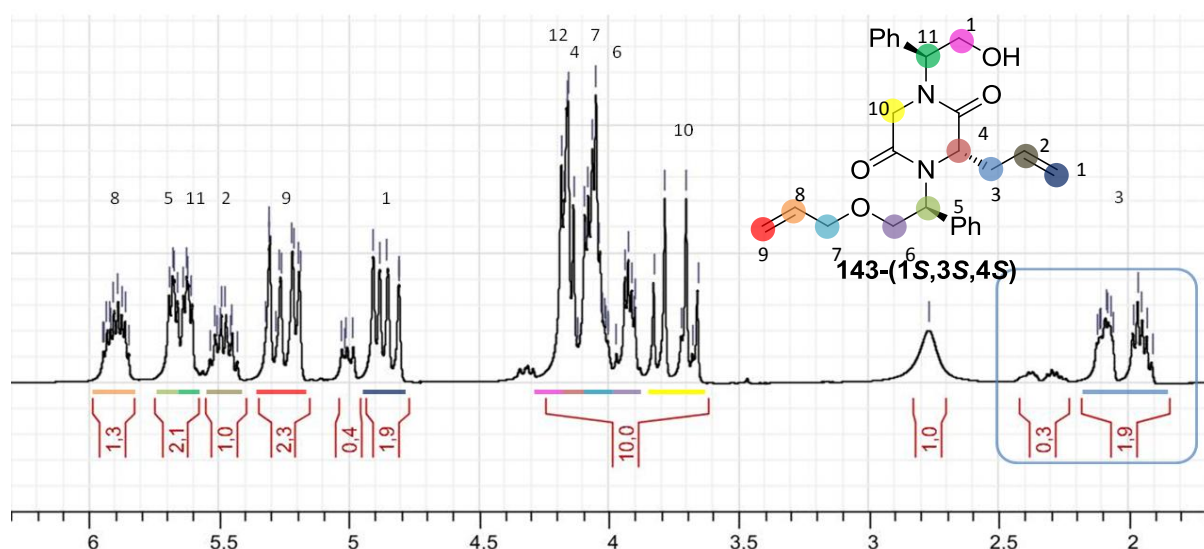


Figure 39. Analyse RMN ^1H de la dioxopipérazine **143-(1S,3S,4S)** : fenêtre de 2 à 6 ppm.

Par ailleurs, ce spectre RMN nous a également permis de déterminer l'excès diastéréoisomérique (Figure 40). Le rapport des aires des multiplets n°3 correspondants au CH_2 allylique greffé en position 6 de la pipérazine indique un excès diastéréoisomérique de 70%.



Figure 40. Agrandissement des multiplets correspondants aux hydrogènes n°3.

En parallèle de ces essais d'alkylation, des premiers tests de déprotection de la seconde copule chirale ont été effectués sur la dioxopipérazine **137b-(1S,4S)**. Il existe trois principales méthodes pour cliver les éthers allylique [90]: i) *via* l'isomérisation en éther vinylique suivi d'une étape de clivage plus simple (*t*-BuOK puis 0.1 N HCl), ii) oxydation de l'alcène puis clivage (SeO₂, AcOH), et iii) *via* la formation d'un complexe pi-allyle, en présence de Pd(0) ou de Ni(0), qui est ensuite attaqué par un nucléophile Pd(Ph₃P)₄. Nous devions bien sûr choisir des conditions nous permettant par la suite de discriminer les fonctions *O*-allylique et *C*-allylique de la pipérazine **143-(1S,3S,4S)**. Les méthodes 1 et 2 précédemment énoncées étaient alors proscrites. Ainsi, nous avons utilisé, dans un premier temps, des conditions douces telles que le tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0)/morpholine dans le méthanol à température ambiante (entrée 1, Tableau 8b). Le composé désiré a alors été obtenu mais avec un très faible rendement de 7%, la matière première étant largement récupérée.

Faute de temps, nous n'avons réalisé qu'un seul essai supplémentaire à l'aide de chlorure de cérium et d'iodure de sodium (entrée 2, Tableau 8b). Malheureusement, cette fois, l'éther silylé de la dioxopipérazine **147-(1S,4S)** a été déprotégé et non l'éther allylique comme nous le souhaitions.

Tableau 8b. Essais de clivage de l'éther allylique de la dioxopipérazine **137b-(1S,4S)**.

Entrées	Réactifs	Solvant	Température	Remarques
1	Pd(PPh ₃) ₄ , morpholine	MeOH	TA	147a-(1S,4S) rendement 7%
2	CeCl ₃ , NaI	MeCN	82°C	147b-(1S,4S)

En perspective de ces travaux (voie A_{1c}), deux voies pourront être étudiées, afin de préparer l'AR et ses analogues, à partir respectivement de **124** (voie 1, schéma 48) et de **137b** (voie 2, schéma 48). Pour réaliser la première voie, l'étape limitante consiste à cliver l'éther allylique sans modifier le groupement *C*-allyle de **123** greffé lors de l'étape d'alkylation et sans déprotéger l'éther silylé. Nous pourrions, par exemple, utiliser les mêmes conditions que précédemment (entrée 2, Tableau 8b) en chauffant à reflux au lieu de réaliser la réaction à

température ambiante. L'utilisation de quantité plus importante de catalyseur au palladium sera également envisagée. Dans une seconde approche, nous pourrions également utiliser le composé **137b** (voie 2, schéma 48) comme produit de départ. Ce composé ne comportant qu'un seul groupement allyle, nous pourrions forcer les conditions de déprotection sans se soucier du groupement C-allyle puisque l'étape d'alkylation aura lieu, cette fois, après la déprotection de l'éther. Il faudra toutefois faire attention à ne pas déprotéger l'éther silylé. Les méthodes i et ii de clivage des éthers allyliques précédemment évoquées pourront alors être utilisées.

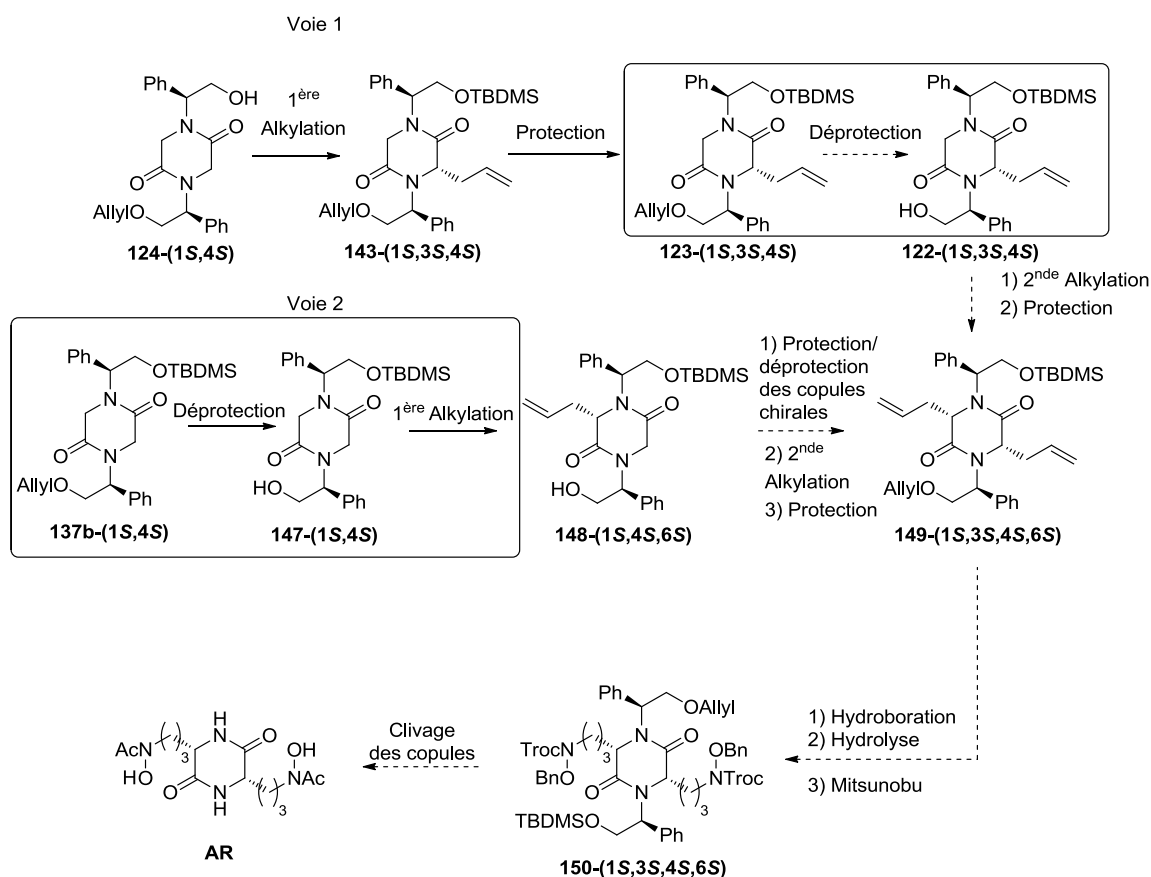


Schéma 48. Dernières étapes pour l'obtention de l'AR via la voie A_{1c}.

Trois voies A₁ ont été envisagées pour synthétiser l'AR (Schéma 42). Les voies A_{1a} et A_{1b} n'ont pas donné de résultats satisfaisants. La voie A_{1c} a été la plus intéressante, permettant de synthétiser la dioxopipérazine 3-substituée **143** avec un rendement de 53% et un excès diastéréoisomérique de 70% (Schéma 47). Cette voie A_{1c} doit encore être exploitée telle que nous l'avons envisagée au schéma 47 précédent et elle reste particulièrement intéressante pour obtenir des analogues *trans*-disubstitués et/ou possédant deux fonctions chélatrices du fer

différentes. L'optimisation du rendement et de l'excès diastéréoisomérique doit toutefois être réalisée. En effet, ce rendement modéré et l'excès diastéréoisomérique insuffisant de l'étape d'alkylation menant à **143** lié à des difficultés d'activation de la seconde copule chirale (déprotection de l'éther allylique), nous ont incités à tenter les deux alkylations en une seule étape avec les deux copules chirales déprotégées (voie A₂, Schéma 37). Cette voie A₂ ne permettra pas d'accéder à des analogues *trans*-disubstitués et/ou possédant deux fonctions chélatrices du fer différentes mais peut conduire rapidement à l'**AR** et à des analogues *cis*- et *trans*-disubstitués avec des fonctions chélatrices de même nature.

5. Alkylation stéréosélective de la dioxopipérazine 127-(1*S*,4*S*) avec le bromure d'allyle : voie A₂

La stratégie de synthèse de la voie A₂ repose sur une dialkylation stéréosélective réalisée en une seule étape. Suite aux précédents travaux d'alkylation, nous avons décidé d'utiliser le bromure d'allyle (Voie A_{1c}) pour cette double alkylation puisque nous avons obtenus les meilleurs résultats d'alkylation avec cet électrophile (Schéma 46, p 113). Comme pour la voie A_{1c}, après avoir obtenu la dioxopipérazine disubstituée **151**-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*), quatre étapes sont encore nécessaires pour introduire les fonctions hydroxamates et obtenir l'**AR** : i) formation des chaînes propanols par hydroboration suivie d'une hydrolyse, ii) substitution des alcools par la *O*-benzyl-*N*-Troc-hydroxylamine **35** grâce à une réaction de Mitsunobu, iii) clivage des groupements Troc et acétylation simultanée des fonctions hydroxylamines, iv) clivage des copules chirales et déprotection des éthers benzyliques par hydrogénolyse (Schéma 49).

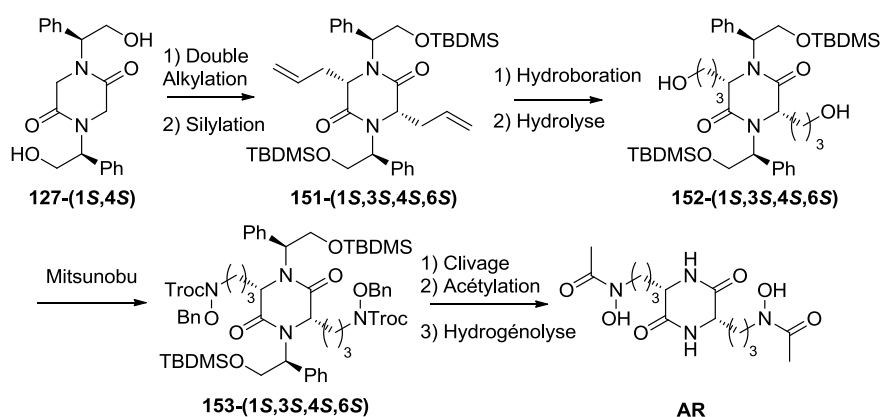


Schéma 49. Voie A₂ pour la synthèse de l'AR.

Pour cette double alkylation, les conditions optimisées avec le bromure de benzyle ont été reprises en doublant toutefois le nombre d'équivalents de base et de bromure d'allyle (Tableau 7, entrée 4). Cependant, un problème de solubilité a été observé lors de l'ajout de la base empêchant la réalisation de la réaction. Cela peut certainement s'expliquer par la plus forte concentration en sels de lithium augmentant la formation d'agglomérats. L'ajout d'HMPA nous a semblé judicieux pour endiguer ce phénomène. Six équivalents ont alors été ajoutés avant l'addition de LiHMDS ce qui nous a permis d'obtenir le produit désiré avec un rendement de 35%, un excès diastéréoisomérique supérieur à 95% et un pouvoir rotatoire de +104 (c 0,58 ; AcOEt (Schéma 50).

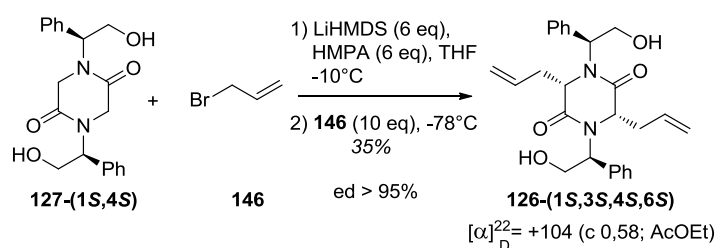


Schéma 50. Synthèse de la dioxopipérazine disubstituée **126-(1S,3S,4S,6S)** en présence d'HMPA.

L'étude du spectre RMN ¹H (Figure 41) et du spectre COSY révèle la présence d'une molécule possédant un centre de symétrie. On note la présence de deux groupements allyles (multiplets 1, 2 et 3), du noyau dioxopipérazinique (multiplet 4) et des deux copules chirales (multiplets 5 et 6). Le fait que la molécule possède un centre de symétrie nous permet

d'affirmer que la dioxopipérazine disubstituée **126-(1S,3S,4S,6S)** est bien de configuration *cis* comme nous l'espérons. Par ailleurs, nous n'avons pas observé la présence d'un autre diastéréoisomère en RMN.

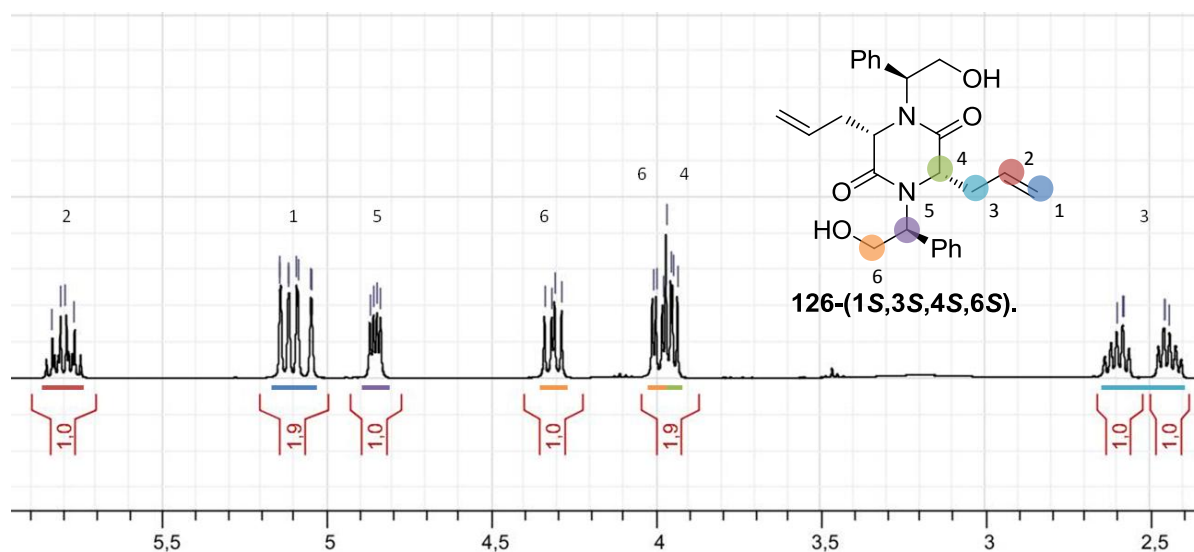
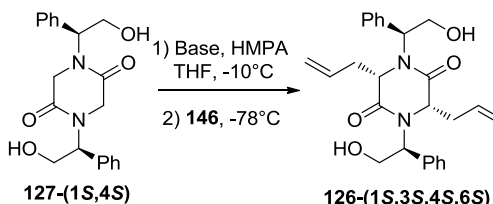


Figure 41. Analyse du spectre RMN ¹H de la dioxopipérazine 3,6-disubstituée **126-(1S,3S,4S,6S)** : fenêtre de 2 à 6 ppm.

Des études LCMS ont également révélé l'absence de diastéréoisomères, laissant supposer que l'excès diastéréoisomérique obtenu est supérieur à 95%. Cette nette augmentation de la stéréosélectivité peut certainement s'expliquer par un effet synergique, les deux copules chirales étant activées et encombrant la même face.

Différents essais ont été ensuite tentés afin d'augmenter le rendement : i) modifications du nombre d'équivalents de réactifs (Tableau 9, entrées 1 et 2), ii) changement du temps de réaction (Tableau 9 entrées 2 et 3), iii) modifications de la base (Tableau 9, entrées 4 et 5 vs entrée 1). Malheureusement, aucune de ces modifications n'a permis d'accroître le rendement. Nous avons également effectué un test avec de l'hexaméthylsilazane de potassium (KHMDs), les énoates de potassium étant plus réactifs que les énoates de lithium (Tableau 9, entrée 6 vs 1). Mais comme nous le craignons, la réaction a totalement perdu sa stéréosélectivité (4 diastéréoisomères observés), confirmant le rôle indispensable du lithium.

Tableau 9. Optimisation pour tenter d'augmenter le rendement de la double alkylation de la dioxopipérazine **127-(1S,4S)**.

 127-(1S,4S) 126-(1S,3S,4S,6S)						
Entrée	Base	Equivalents de base	Equivalents d'électrophile	Durée	Rendement	ed ¹
1	LiHMDS	8 eq	6 eq	3h	33%	> 95%
2	LiHMDS	6 eq	10 eq	3h	36%	> 95%
3	LiHMDS	6 eq	6 eq	10h	31%	> 95%
4	<i>t</i> -BuLi	6 eq	6 eq	3h	14%	ND
5	<i>n</i> -BuLi	6 eq	6 eq	3h	17%	ND
6	KHMDS	8 eq	6 eq	3h	49%	0%

¹ déterminés par RMN ¹H

Bien que le rendement n'ait pas pu être amélioré, l'excellente stéréosélectivité de la réaction (de > 95%) nous a incités à poursuivre dans cette voie.

Ainsi, pour permettre la réaction d'hydroboration, les copules chirales de la dioxopipérazine **127-(1S,3S,4S,6S)** ont été reprotégées sous forme d'éther silylés en présence de TBDMSCl et d'imidazole, avec un rendement quantitatif pour conduire au dérivé **151-(1S,3S,4S,6S)**. Une réaction d'hydroboration, en présence de 9-borabicyclo[3.3.1]nonane, suivie d'un hydrolyse a ensuite été effectuée pour obtenir les fonctions hydroxyles en position anti-Markovnikov. Le diol **152-(1S,3S,4S,6S)** a ainsi été obtenu avec un rendement de 54%. Les étapes suivantes s'inspirent des travaux de Miller [74], une réaction de Mitsunobu en présence de DIAD et de triphénylphosphine a été réalisée pour donner le dicarbamate **153-(1S,3S,4S,6S)**. Enfin, le clivage des groupements Troc et l'acétylation des hydroxylamines formées nous ont permis d'obtenir la dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** avec un rendement de 77%, les conditions acides de l'étape d'acétylation ayant également clivé les groupements TBDMS présents sur les copules chirales (Schéma 51). La dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** a ainsi été obtenue avec un rendement global de 2%, un excès diastéréoisomérique supérieur à 95% et un pouvoir rotatoire de +73 (c 0,16 ; AcOEt)

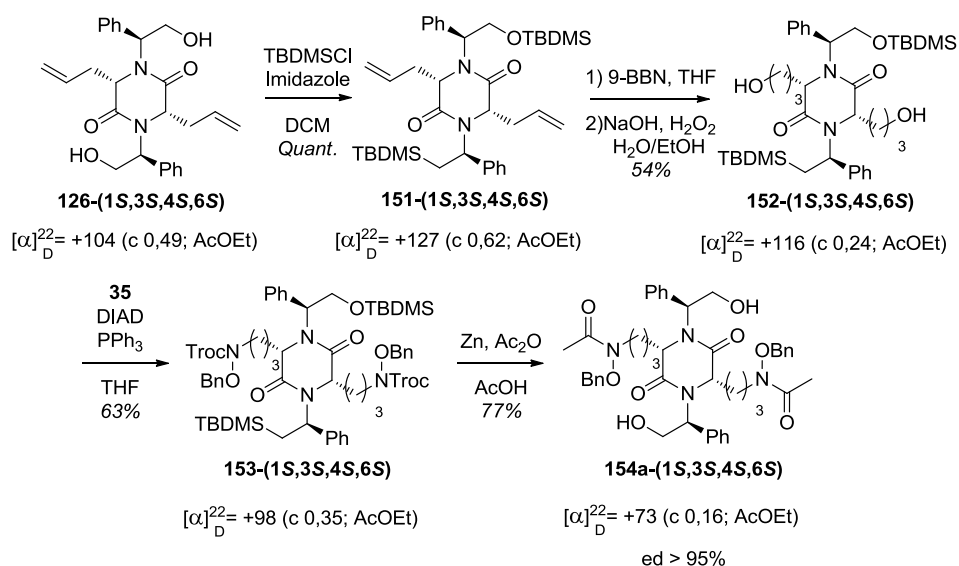


Schéma 51. Formation de la dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** à partir de la dioxopipérazine **126-(1S,3S,4S,6S)**.

Le spectre RMN ¹H de la dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** (Figure 42) révèle toujours la présence d'une molécule possédant un centre de symétrie, confirmant ainsi la rétention de la configuration *cis*. On peut noter la présence des fonctions hydroxamates (singulet 7), des chaînes propyles (multiplets 1, 2 et 3) du cycle dioxopipérazinique (multiplet 4) et des copules chirales (multiplets 5 et 6).

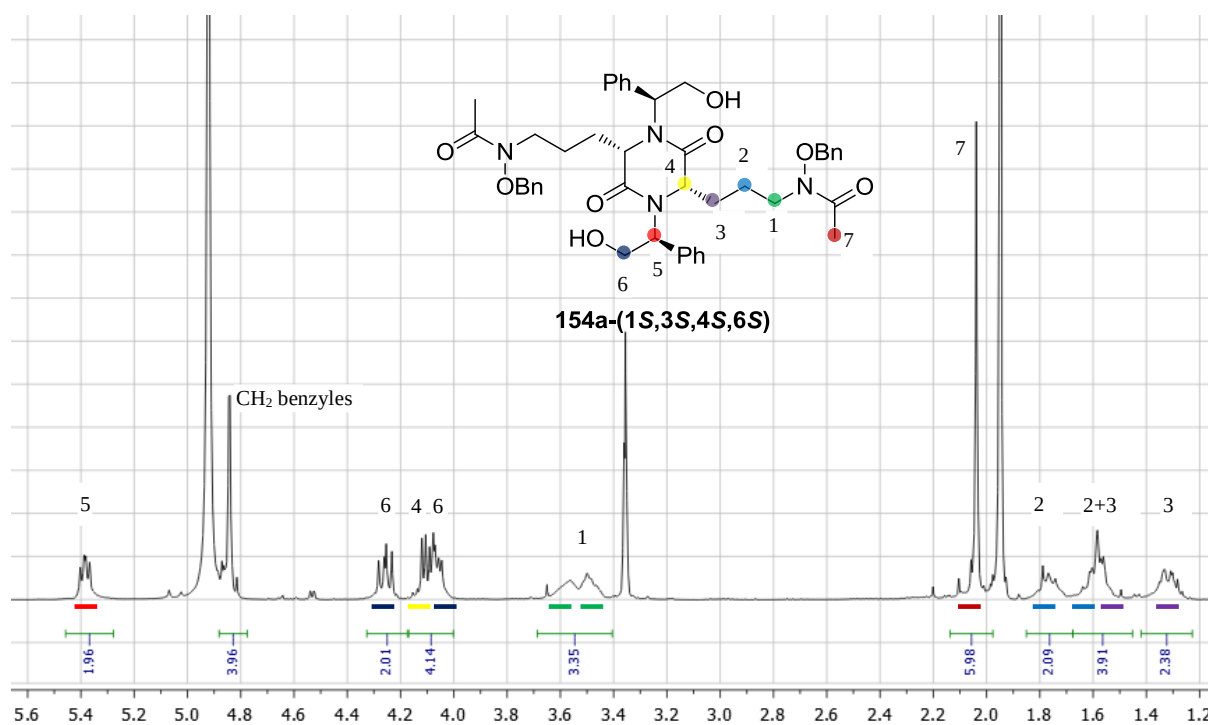


Figure 42. Analyse du spectre RMN ^1H de la dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** : fenêtre de 2 à 6 ppm.

La dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** portant deux fonctions hydroxamates a été obtenue avec un rendement global de 2% et une excellente stéréosélectivité (ed > 95%).

Pour obtenir l'AR à partir de la dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** synthétisée, une dernière étape de clivage des copules et de débenzylation est encore nécessaire. Pour ce faire, nous avons repris les conditions précédemment décrites par Husson *et al.* [86] pour déprotéger une copule phénylglycinol en position 3 d'une pipérazine 2-substituée.

La réaction d'hydrogénolyse a d'abord été réalisée à pression atmosphérique et à température ambiante avec 0.1 éq de Pd/C pendant 2h. Malheureusement, seul le produit de départ a été récupéré (Tableau 10, entrée 1). L'augmentation de la durée de la réaction (Tableau 10, entrées 2 et 3 vs 1 ; entrée 5 vs 4) et du nombre d'équivalents de catalyseur (Tableau 10, entrée 4 vs 2 ; entrées 5 et 6 vs 3) n'ont pas permis d'obtenir l'AR bien que nous soyons parvenus à déprotéger les fonctions hydroxamates (Tableau 10, entrées 5 et 6). Cette différence de réactivité par rapport aux précédents travaux de Husson provient certainement du fait que les copules chirales phénylglycinols sont greffées sur une fonction amide, et non une fonction amine.

Tableau 10. Essais effectués pour tenter de cliver les copules chirales de **154a-(1S,3S,4S,6S)**.

Essais	Temps de réaction	Equivalents de palladium	Observations
1	2h	0,1	154a-(1S,3S,4S,6S) récupéré
2	10h	0,1	154a-(1S,3S,4S,6S) récupéré
3	24h	0,1	154a-(1S,3S,4S,6S) récupéré
4	10h	0,5	154a-(1S,3S,4S,6S) + 154b-(1S,3S,4S,6S)
5	24h	0,5	154c-(1S,3S,4S,6S)
6	24h	1	154c-(1S,3S,4S,6S)

Au cours de cette thèse, notre laboratoire a fait l'acquisition d'un réacteur d'hydrogénation permettant de réaliser des hydrogénolyses en flux continu et en maîtrisant des paramètres tels que la pression, la température et le débit. Nous avons alors repris nos tests de clivage des copules phénylglycinol. L'augmentation de la température (Tableau 11, entrées 2 et 3 vs 1) n'a permis que d'initier la débenzylation des fonctions hydroxamates. De plus fortes pressions en dihydrogène ont augmenté la proportion de produit débenzylé (Tableau 11, entrées 4 et 5 vs 2) ou ont entraîné la dégradation du produit (Tableau 11, entrée 6). Tous les tests effectués se sont révélés négatifs et nous n'avons jamais pu réaliser le clivage des copules chirales (Tableau 11). De même, la diminution du débit a permis d'augmenter la proportion de produit débenzylé sans pour autant cliver les copules chirales (Tableau 11, entrées 9, 10 et 11 vs 1, 2 et 3). Enfin le catalyseur de Pearlman a également été testé mais aucun clivage n'a été observé (Tableau 11, entrées 14 à 18).

Tableau 11. Essais de clivage des copules chirales de **154a-(1S,3S,4S,6S)** à l'aide d'un réacteur à hydrogénolyse.

$\text{154a-(1S,3S,4S,6S)} \xrightarrow[\text{MeOH}]{\text{H}_2 \text{ catalyseur}} \text{AR} + \text{154b-(1S,3S,4S,6S)} + \text{154c-(1S,3S,4S,6S)}$					
Essais	Température	Pression	Flux	Catalyseur	Observations
1	20°C	1 bar	3 mL.min ⁻¹	Pd/C	154a-(1S,3S,4S,6S)
2	50°C	1 bar	3 mL.min ⁻¹	Pd/C	154a-(1S,3S,4S,6S) + 154b-(1S,3S,4S,6S)
3	60°C	1 bar	3 mL.min ⁻¹	Pd/C	154a-(1S,3S,4S,6S) + 154b-(1S,3S,4S,6S)
4	50°C	2 bars	3 mL.min ⁻¹	Pd/C	154c-(1S,3S,4S,6S)
5	50°C	5 bars	3 mL.min ⁻¹	Pd/C	154c-(1S,3S,4S,6S)
6	50°C	10 bars	3 mL.min ⁻¹	Pd/C	Dégradation du produit
9	20°C	1 bar	1 mL.min ⁻¹	Pd/C	154c-(1S,3S,4S,6S)
10	50°C	1 bar	1 mL.min ⁻¹	Pd/C	154c-(1S,3S,4S,6S)
11	60°C	1 bar	1 mL.min ⁻¹	Pd/C	154c-(1S,3S,4S,6S)
12	50°C	5 bars	1 mL.min ⁻¹	Pd/C	154c-(1S,3S,4S,6S)
13	70°C	5 bars	1 mL.min ⁻¹	Pd/C	154c-(1S,3S,4S,6S)
14	20°C	1bar	1 mL.min ⁻¹	Pd(OH) ₂	154a-(1S,3S,4S,6S)
15	50°C	1bar	1 mL.min ⁻¹	Pd(OH) ₂	154c-(1S,3S,4S,6S)
16	50°C	2 bars	1 mL.min ⁻¹	Pd(OH) ₂	154c-(1S,3S,4S,6S)
17	50°C	5 bars	1 mL.min ⁻¹	Pd(OH) ₂	154c-(1S,3S,4S,6S)
18	50°C	10 bars	1 mL.min ⁻¹	Pd(OH) ₂	Dégradation du produit

Dans notre laboratoire, Nicolas Franceschini a travaillé lors de ses travaux de thèse sur l'alkylation stéréosélective de thiomorpholin-3-ones possédant une copule chirale de type phénylglycinol [91]. L'étape de clivage de la copule par hydrogénolyse s'est également révélée problématique (Schéma 52). Pour contourner ce problème, la réduction de Birch, proposée par Hansen *et al.* [92], s'est révélée efficace pour cliver l'auxiliaire chirale des thiomorpholines **155**, à l'aide de lithium, à -78°C dans un mélange THF/ammoniac 1:2 (Schéma 52).

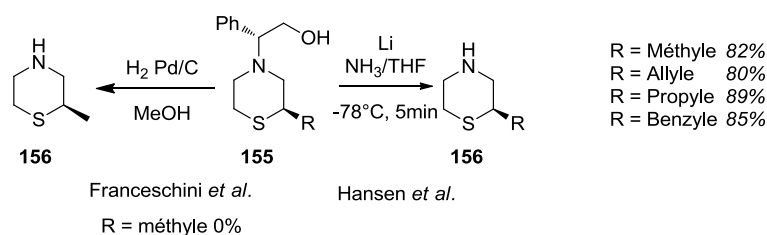


Schéma 52. Clivage de la copule phénylglycinol par N. Franceschini *et al* (R = Me) et Hansen *et al.*

Nous avons donc souhaité appliquer cette méthodologie pour cliver les copules chirales présentes sur nos composés. Etant en fin de thèse et n'ayant plus les pipérazines **153-(1S,3S,4S,6S)** et **154a-(1S,3S,4S,6S)** disponibles en quantité suffisante pour réaliser ce dernier essai, nous avons tenté de reproduire cette réaction sur la dioxopipérazine **126-(1S,3S,4S,6S)**. La dioxopipérazine **157-(3S,6S)** a ainsi été obtenue avec un rendement de 75% et un excès diastéréoisomérique supérieur à 95% (Schéma 53). Ce résultat nous incite à penser que la stratégie de synthèse est bonne et qu'il faudra appliquer cette méthode de clivage des copules chirales sur des composés tels que les dioxopipérazines **153-(1S,3S,4S,6S)** ou **154a-(1S,3S,4S,6S)** pour obtenir l'AR.

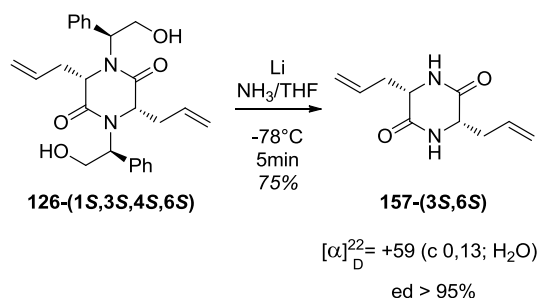


Schéma 53. Clivage des copules chirales de la dioxopipérazine **126-(1S,3S,4S,6S)** via la réduction de Birch.

Le spectre RMN ¹H de la dioxopipérazine **157-(3S,6S)** (Figure 43) révèle toujours la présence d'une molécule possédant un centre de symétrie, confirmant ainsi la rétention de la configuration *cis*. La présence de deux fonctions allyles (multiplets 1, 2 et 3) et la présence du cycle pipérazinique (multiplet 4 et singulet 5) corréleront bien avec la structure de la dioxopipérazine **157-(3S,6S)**.

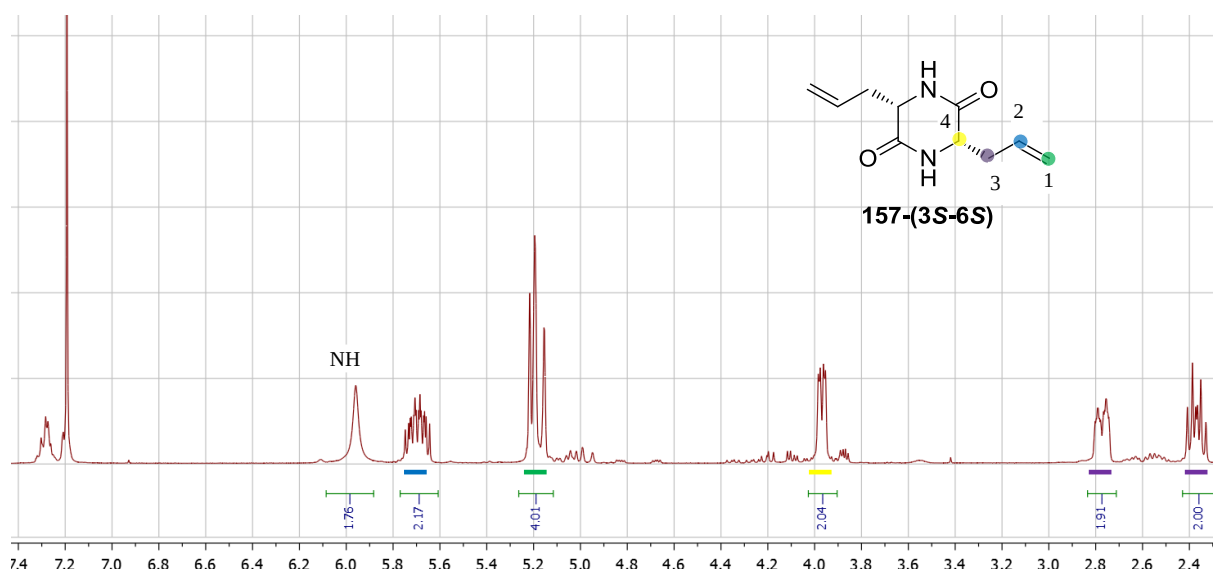


Figure 43. Spectre RMN ^1H de la dioxopipérazine **157-(3S,6S)**.

Les centres stéréogènes de la dioxopipérazine **157-(3S,6S)** étant conservés, il nous a semblé intéressant de poursuivre cette synthèse jusqu'à obtention de l'**AR** comme décrit au schéma 53. La réaction d'hydroboration suivie d'une hydrolyse suivant les conditions précédemment décrites a permis d'obtenir le diol **158-(3S,6S)** avec 57% de rendement (Schéma 54). Toutefois, la grande polarité du diol **158-(3S,6S)** obtenu, induisant une solubilité quasi exclusive dans l'eau, ne nous a pas permis de poursuivre la synthèse, la réaction de Mitsunobu ne pouvant être réalisée dans ce solvant. Une voie alternative doit donc être mise en place (Voie A_{2c}). Nous envisageons de greffer des groupements Boc sur les fonctions amides pour pouvoir réaliser la suite de la synthèse en reprenant le schéma établi préalablement : i) Hydroboration et hydrolyse, ii) Mitsunobu, iii) déprotection et acétylation, iv) hydrogénolyse (Schéma 54, voie A_{2c}).

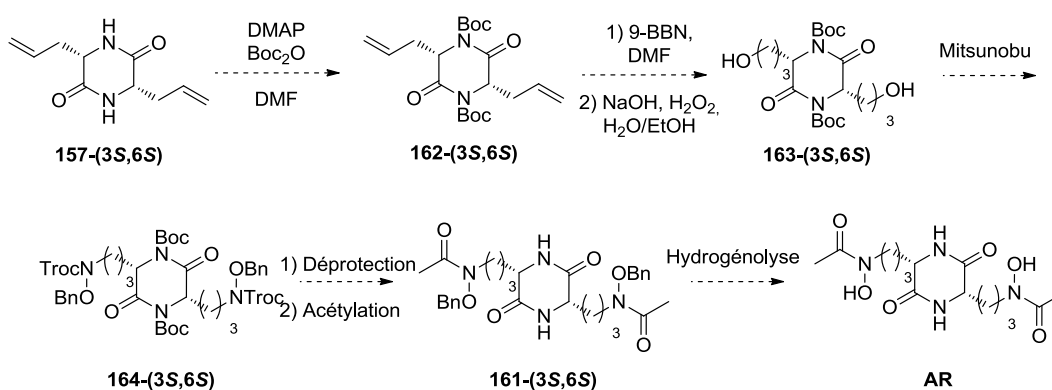
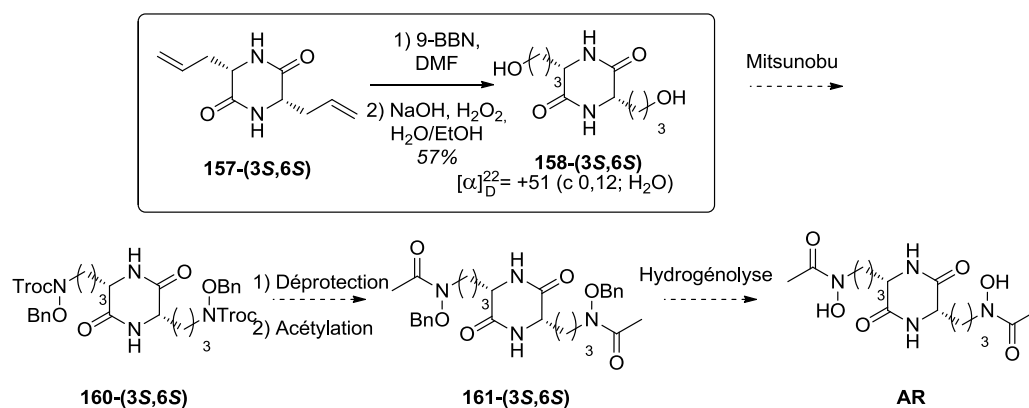


Schéma 54. Synthèse de l'AR.

En parallèle de la synthèse des dioxopipérazines *cis*-disubstituées **121-(3S,6S)** et **121-(3R,6R)**, nous souhaitons obtenir des dioxopipérazines *trans*-disubstituées **121-(3R,6S)** et **121-(3S,6R)**. Ainsi, comme décrit précédemment, il nous fallait une dioxopipérazine **137b-(3S,6R)** portant deux copules chirales de configurations opposées. Nous avons donc repris la voie de synthèse décrite au schéma 41 pour obtenir cette dioxopipérazine **137b-(3S,6R)** et avons utilisé le (*R*)-phénylglycinol protégé au lieu du (*S*)-phénylglycinol lors de l'étape de cyclisation (Schéma 55). La dioxopipérazine **137b-(3S,6R)** a ainsi été obtenu en 5 étapes à partir du (*S*)-phénylglycinol avec un rendement global de 24%. Par la suite, un premier essai de dialkylation a été effectué sur ce composé (schéma 55). Toutefois, le changement de configuration de l'une des copules chirales a modifié la solubilité du produit dans le THF, le composé **137b-(3S,6R)** n'étant plus soluble dans ce solvant. Pour tenter de remédier à ce problème, nous avons solubilisé la dioxopipérazine **137b-(3S,6R)** dans un mélange

THF/DMSO (3 :1). L'alkylation, dans ces conditions n'a pas permis d'isoler le produit attendu et nous n'avons observé que le composé *O*-alkylé **165-(1S,4R)**, favorisé par la présence de DMSO (Schéma 55). Faute de temps nous n'avons pas pu explorer plus en profondeur cette voie de synthèse.

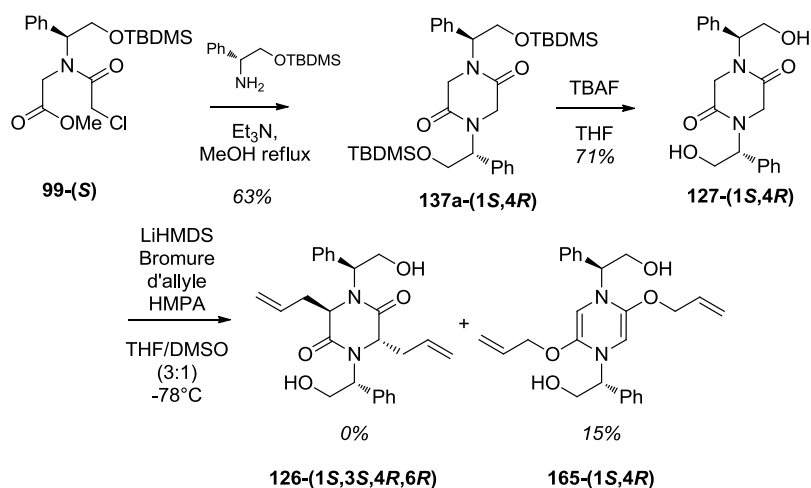


Schéma 55. Alkylation de la dioxopipérazine **127-(1S,4R)**.

L'étude de l'alkylation de dioxopipérazines portant des copules chirales dérivées du phénylglycinol nous a permis de mettre au point une méthodologie d'alkylation stéréosélective. L'alkylation de la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** en présence de bromure d'allyle a fourni la dioxopipérazine 3-alkylée **123-(1S,3S,4S)** avec un rendement correct de 53% et un excès diastéréoisomérique de 70% (voie A_{1c}). Grâce à la stratégie de dialkylation de la dioxopipérazine **127-(1S,4S)** (voie A₂), nous avons pu obtenir la dioxopipérazine **126-(1S,3S,4S,6S)** avec un excellent excès diastéréoisomérique supérieur à 95%. Malheureusement, les difficultés rencontrées, concernant le clivage des copules chirales, ont retardé notre progression et nous n'avons pas pu aboutir au produit final souhaité : l'**AR**.

Cependant la mise en œuvre des conditions de clivages des copules chirales à l'aide de lithium, réalisée sur la dioxopipérazine **126-(1S,3S,4S,6S)**, nous laisse espérer que cette voie de synthèse puisse conduire à l'**AR**. Au vu des difficultés rencontrées pour les voies A et ayant comme objectif principal l'accès à l'**AR**, nous avons dès la deuxième année de thèse envisagé la synthèse de l'**AR** selon la voie B à partir de la L-ornithine ou du L-glutamate.

B. Synthèse des dioxopipérazines 3,6-disubstituées : Voies B₁ et B₂

Deux autres voies de synthèses, moins convergentes (voies B₁ et B₂) ont été tentées afin d'aboutir à l'**AR**. Ces deux voies de synthèses utilisent l'ornithine ou l'acide glutamique de configuration absolue définie selon le produit de départ utilisé. La stéréochimie de la molécule finale attendue n'est donc pas induite comme pour les voies A mais dépendante de celle des produit de départ. La première voie (B₁) est inspirée de la biosynthèse de l'**AR** et des voies de synthèse (Figure 33 et Schéma 3, 5 et 6) décrites dans la partie bibliographique. L'**AR** peut être obtenu en réalisant deux couplages successifs entre les deux *N*^δ-hydroxyornithines **128** et **129** protégées différemment. Ces composés résultent tous deux de la *N*^δ-hydroxylation de l'ornithine **130**. Cet acide aminé étant onéreux, nous avons décidé de le synthétiser à partir de la glutamine **131**. La seconde voie (B₂) permet de fournir rapidement l'**AR** ou des analogues **121** par ouverture des cycles pyrrolidines de la dioxopipérazine pyroglutamique **132**. Celle-ci est accessible à partir de l'acide pyroglutamique **166** qui peut être synthétisé en réalisant une cyclisation intramoléculaire du glutamate **133** (Schéma 56).

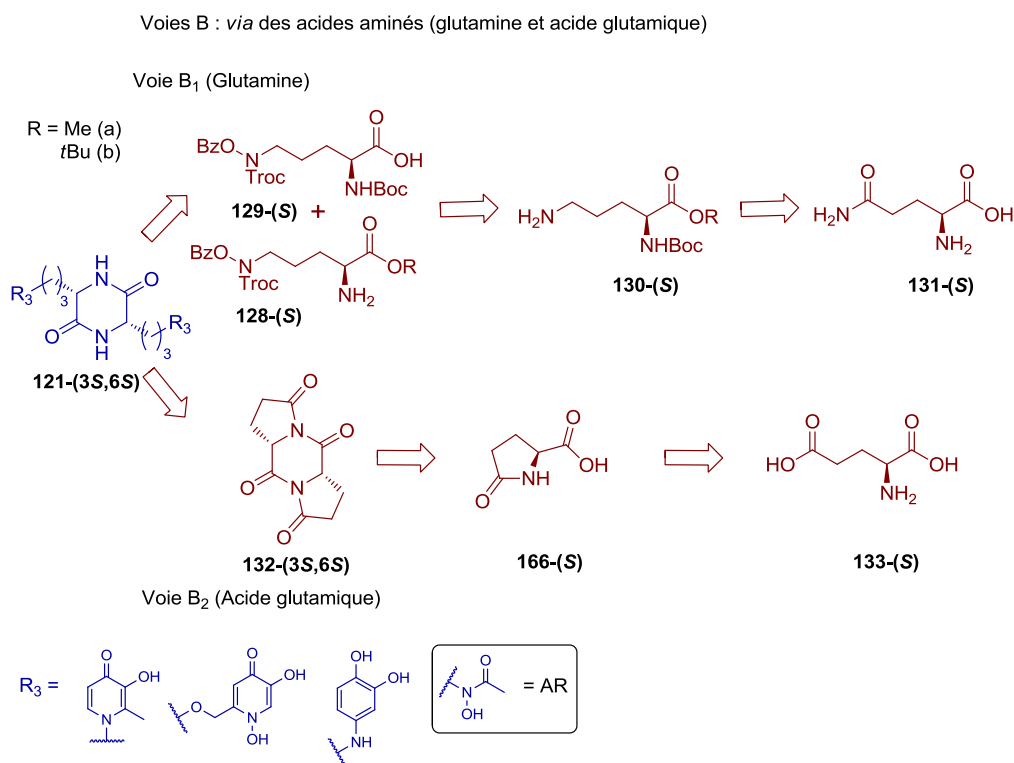


Schéma 56. Rétrosynthèse de l'**AR** et de ses analogues par les voies B₁ et B₂.

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, toutes les synthèses de l'**AR** ont été réalisées à partir d'un dérivé N^δ -hydroxy-L-ornithine. La synthèse de cet intermédiaire est donc primordiale. Nous avons vu précédemment que Miller *et al.* (partie bibliographique, schéma 5) ont proposé une synthèse de ce type de dérivé à partir du L-glutamate protégé **33**, un produit bien plus onéreux que la L-glutamine **131-(S)** que nous avons choisie comme produit de départ.

Afin de pouvoir accéder à ce composé, nous avons proposé une synthèse à partir de la L-glutamine **131-(S)** en 5 étapes : i) protection de l'amine **131-(S)** sous forme de carbamate, ii) déshydratation de l'amide en nitrile **167-(S)**, iii) réduction du nitrile **167-(S)** en amine **130-(S)**, iv) estérification de l'ornithine obtenue, v) oxydation de l'amine de la chaîne latérale en hydroxylamine. Une fois le dérivé N^δ -hydroxy-L-ornithine synthétisé **168-(S)**, une acétylation et deux couplages successifs permettent de former le cycle dioxopipérazinique. Enfin, une hydrogénéolyse conduit à la formation de l'**AR** (Schéma 57).

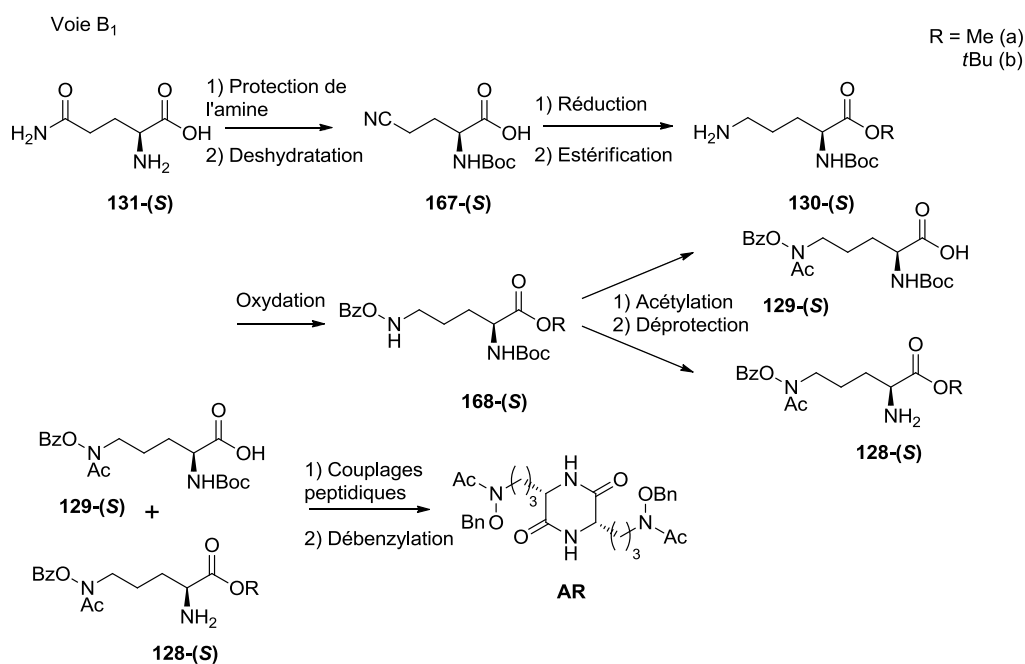


Schéma 57. Synthèse de l'**AR** via la voie B₁.

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux études menées sur la synthèse de la N^δ -hydroxy-L-ornithine **168** à partir de la L-glutamine **131**.

1. Synthèse de la N^δ -hydroxy-L-ornithine

Quatre étapes sont nécessaires pour obtenir la L-ornithine protégée à partir de la L-glutamine **131-(S)**. Dans un premier temps, la fonction amine de la glutamine **131-(S)** est protégée sous forme de carbamate en présence de di-tert-butyl dicarbonate en milieu biphasique (Schéma 58). La fonction amide primaire de la glutamine protégée **169-(S)** est ensuite réduite en nitrile en présence d'anhydride acétique et de pyridine.

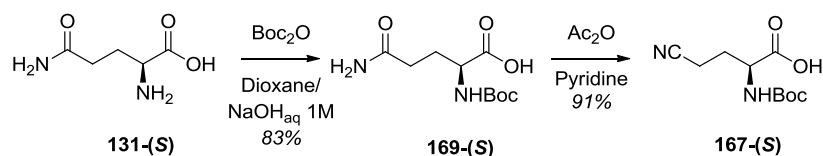


Schéma 58. Synthèse du nitrile **167-(S)** à partir de la L-glutamine **131-(S)**.

La déshydratation de l'amide primaire est initiée par une fonctionnalisation *O*-sélective (Schéma 59). La réaction entre la glutamine **169-(S)** et l'anhydride acétique permet de former l'anhydride mixte **170-(S)**, après élimination d'un premier groupement acétate. La seconde élimination d'un acétate conduit au nitrile **167-(S)** via un intermédiaire nitrillium dont le proton est capté par la pyridine [93].

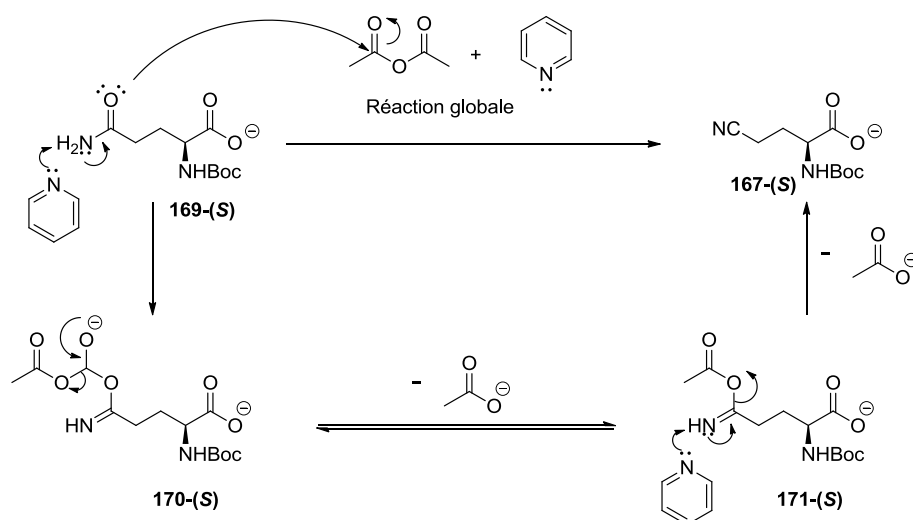


Schéma 59. Mécanisme de la réaction de déshydratation de l'amide **169-(S)**.

Le nitrile **167-(S)** obtenu est réduit en amine par une hydrogénolyse catalysée par le catalyseur de Pearlman pour conduire à l'ornithine **172-(S)** avec 77% de rendement (Schéma 60). Finalement, la fonction acide de l'ornithine obtenue **172-(S)** est estérifiée pour donner le composé désiré **130a-(S)** avec un rendement global de 48%.

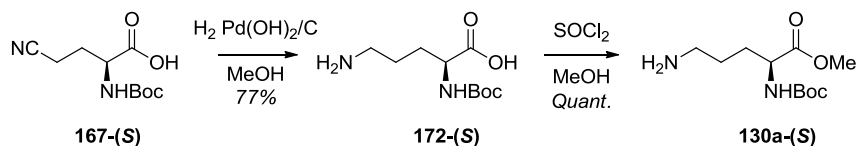


Schéma 60. Synthèse de l'ornithine protégée **130a-(S)**.

L'étape limitante consiste ensuite à former l'hydroxylamine **168-(S)** à partir de l'ornithine protégée **130a-(S)** précédemment synthétisée (Schéma 57). Lors de précédents travaux réalisés au laboratoire sur la synthèse d'analogues simplifiés de la pyoverdine, la synthèse de l'ornithine *N*-formyle hydroxamate **176-(S)** a été mise au point à partir de l'ornithine **130b-(S)** en deux étapes avec 37% de rendement global (Schéma 61). Il s'agit de modifier l'ornithine **130b-(S)** en présence de peroxyde de dibenzoyle, dans un mélange de dichlorométhane et d'une solution tampon ($\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$) à pH 10. En plus d'une sensibilité au pH, cette réaction semble particulièrement délicate et dépendante du substrat : lorsque cette méthode a été appliquée à la lysine au cours des travaux de thèse de Natacha Farvacques [94], le produit désiré n'a pas pu être obtenu.

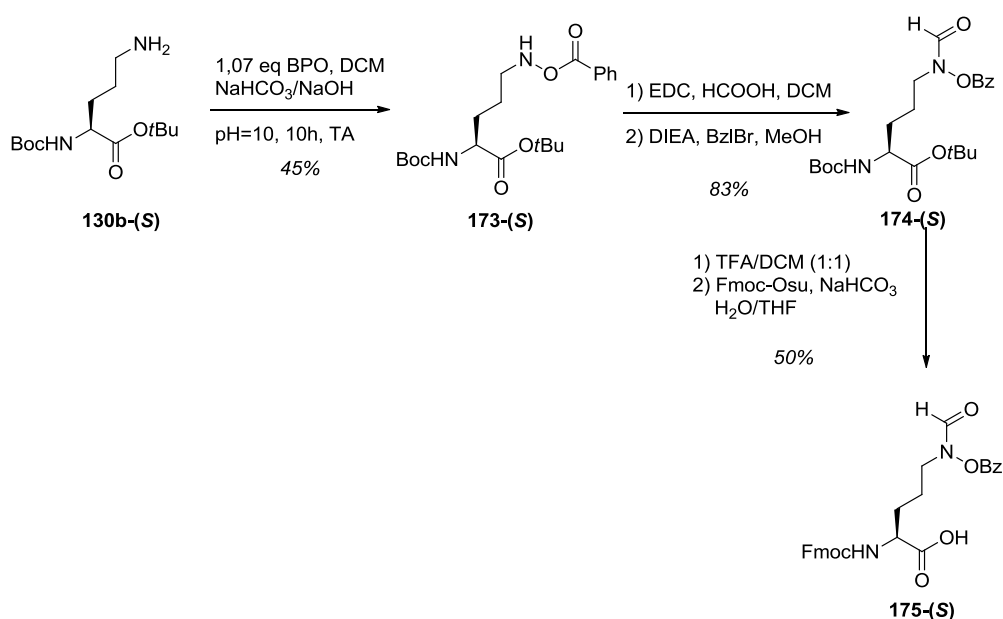
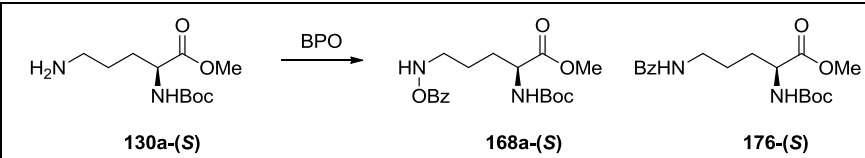


Schéma 61. Synthèse de l'ornithine *N*-formyle hydroxamate **175-(S)** par Farvacques *et al* [94].

Cette méthode élégante a donc été appliquée au dérivé de l'ornithine **130a-(S)** (Tableau 12, entrée 1). Ce premier essai a conduit à la formation d'un mélange de produit désiré **168a-(S)** et d'amine benzoylée **176-(S)**. Dû à une trop faible différence de polarité de ces deux produits, nous n'avons pas pu les séparer ni par les méthodes classiques de chromatographie sur gel de silice ni par chromatoflash. Nous avons alors tenté de modifier le tampon (Na_2HPO_4 ou K_2HPO_4) et le type de solvant (DMF/ H_2O vs DCM/ H_2O), comme décrits dans la littérature [95] mais nous n'avons fait que légèrement améliorer le rapport (1 : 1 vs 2 : 3) entre les deux composés (entrées 2 et 3 vs 1).

Tableau 12. Essais d'oxydation de l'amine **130a-(S)** en hydroxylamine.

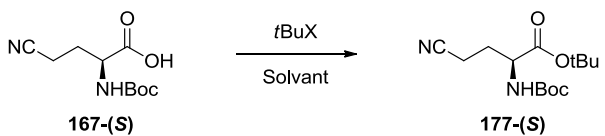
				
Entrées	Base	pH	Solvant	Rapport 168/176
1	$\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$	10	DCM/ H_2O	2 : 3
2	Na_2HPO_4	10	DMF/ H_2O	1 : 1
3	K_2HPO_4	10	DMF/ H_2O	1 : 1

¹ Rapports déterminés par LCMS

Sachant que cette réaction est sensible aux substrats (lysine vs ornithine par exemple) et que la littérature reporte ce type d'oxydation avec des esters *t*-butylique plus lipophile que l'ester méthylique utilisé **130a-(S)**, nous avons envisagé de synthétiser l'ester *t*-butylique **130b-(S)**. Nous aurions pu acheter cet acide aminé modifié disponible commercialement (>100 euro/g) mais nous étions dans l'objectif de réduire les coûts de production par rapport à la synthèse totale de l'**AR** décrite par Miller (schéma 5) et qui utilise la L-glutamine comme produit de départ (76 euros/g). Nous avons donc souhaité synthétiser l'ester *t*-butylique **130b-(S)**. Dans un premier temps, nous avons tenté l'estérification sur le précurseur nitrile **167-(S)**, il suffisait ensuite de réaliser une réduction de la fonction nitrile du produit correspondant **177-(S)** pour obtenir **130b-(S)** (Tableau 13). La formation d'ester *t*-butylique est délicate car la réactivité des alcools tertiaires est très faible. Plusieurs stratégies ont été développées pour permettre ces réactions : i) l'utilisation d'agents de couplage, ii) la formation d'un intermédiaire carbocation *t*-butylique. L'utilisation de différents agents de couplage tels que le DCC, le CDI et l'EDCI sur le composé **167-(S)** dans le DCM ou le *t*-butanol s'est révélée

inefficace pour réaliser cette estérification (Tableau 13, entrées 1 à 7). De même, la stratégie reposant sur la substitution du chloro-*tert*-butyle n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité (Tableau 13, entrées 8 et 9). Dans le meilleur des cas, l'ester désiré **177-(S)** a été obtenu avec un rendement de 12% en présence de MgSO₄ dans des conditions acides.

Tableau 13. Essais réalisés pour l'obtention de l'ester *tert*-butylique **177-(S)**.

 167-(S) $\xrightarrow[\text{Solvant}]{t\text{BuX}}$ 177-(S)					
Essais	Agent de couplage/Catalyseur	X	Solvant	Base	Observations
1	DCC + DMAP	OH	DCM	-	Matière première 167-(S)
2	DCC + CuCl ₂	OH	DCM	-	Matière première 167-(S)
3	EDCI + DMAP	OH	DCM	-	Matière première 167-(S)
4	CDI + DMAP	OH	DCM	-	Matière première 167-(S)
5	DCC + DMAP	OH	<i>t</i> BuOH	-	Matière première 167-(S)
6	EDCI + DMAP	OH	<i>t</i> BuOH	-	Matière première 167-(S)
7	CDI + DMAP	OH	<i>t</i> BuOH	-	Matière première 167-(S)
8	-	Cl	DCM	Et ₃ N	Matière première 167-(S)
9	-	Cl	DCM	K ₂ CO ₃	Matière première 167-(S)
10	H ₂ SO ₄ + MgSO ₄	OH	DCM	-	12%

Le rendement extrêmement faible de cette réaction nous a incité à réaliser l'étape d'estérification sur le composé plus en aval **172-(S)** pour obtenir directement **130b-(S)** (Tableau 14). Trois agents de couplage ont été testés : l'EDCI, le CDI et le DCC. En présence d'EDCI, seul le produit de départ a été isolé. La même réaction en présence de CDI nous a permis d'obtenir le produit désiré avec un faible rendement de 13% (Tableau 14, entrée 2) et finalement, le DCC s'est révélé être le meilleur agent de couplage pour cette réaction, nous conduisant à l'ester *t*-butylique avec un rendement de 53% (Tableau 14, entrée 3).

Tableau 14. Esterification de la Boc-ornithine **172-(S)**.

Essais	Agent de couplage	Rendement
1	EDCI	-
2	CDI	13%
3	DCC	53%

Cet ester **130b-(S)** plus lipophile que l'ester méthylique obtenus **130a-(S)**, nous avons repris nos tests visant à former l'hydroxylamine sur la chaîne latérale de l'ornithine avec le BPO. Dans les différentes conditions utilisées, nous avons de nouveau obtenu un mélange entre le produit désiré et le produit *N*-benzoylé dont la séparation n'a jamais pu être réalisée du fait d'une trop faible différence de polarité (Tableau 15).

Tableau 15. Essais d'oxydation de l'amines **130b-(S)** en hydroxylamines **168b-(S)**.

Essais	Base	pH	Solvant	Rapport 168b/178
1	NaHCO ₃ /NaOH	10	DCM/H ₂ O	2 : 3
2	Na ₂ HPO ₄	10	DMF	1 : 1
3	K ₂ HPO ₄	10	DMF	1 : 1

¹ Rapports déterminés par LCMS

Afin de poursuivre cette voie, l'obtention de l'intermédiaire **168a-(S)** ou **168b-(S)** est essentielle. Il sera donc nécessaire d'effectuer des optimisations afin d'obtenir l'un de ces composés. La synthèse d'hydroxylamine par oxydation d'imine est également une voie envisageable pour obtenir le composé souhaité. Une fois obtenu, deux couplages successifs permettront de former le cycle dioxopipérazinique. Une étape d'acétylation et de débenzoylation devrait alors permettre de fournir l'**AR**.

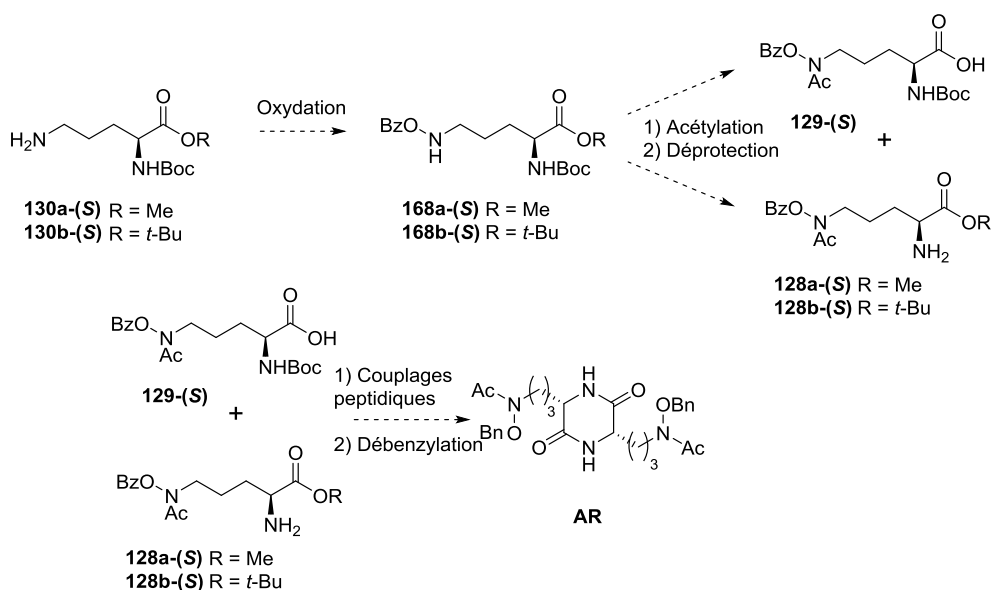


Schéma 63. Dernières étapes pour l'obtention de l'AR *via* la voie B₁.

2. Synthèse de dioxopipérazines à partir du glutamate : voie B₂

La voie B₂ permet d'accéder rapidement à la dioxopipérazine **179-(3S,6S)** à partir du glutamate en trois étapes (Schéma 64) : i) cyclisation intramoléculaire du glutamate, ii) couplage des pyroglutamates **166-(S)** formés et iii) ouverture des cycles pyrrolidines. A partir de cette dioxopipérazine **179-(3S,6S)**, l'AR et des analogues peuvent être obtenus. Lorsque l'ouverture des pyroglutamates **132-(3S,6S)** est réalisé avec du méthanol (voie B_{2a}), le diester correspondant est protégé sous forme de carbamate pour obtenir **180-(3S,6S)**. Une réduction des groupements de type ester méthylique conduit alors au diol **163-(3S,6S)**. Quatre réactions successives sont encore nécessaires pour obtenir l'AR : i) Une réaction de Mitsunobu, ii) l'acétylation et le clivage simultanée des groupements Troc des hydroxylamines et iii) le clivage des groupements protecteurs Boc et Benzyle. La synthèse des analogues **182-(3S,6S)** et **184-(3S,6S)** (voie B_{2b}) s'effectue grâce l'amidification ou l'estérification, en présence de fragments chélateurs du fer, de la dioxopipérazine **132-(3S,6S)** ou **179-(3S,6S)** puis en effectuant une étape de déprotection.

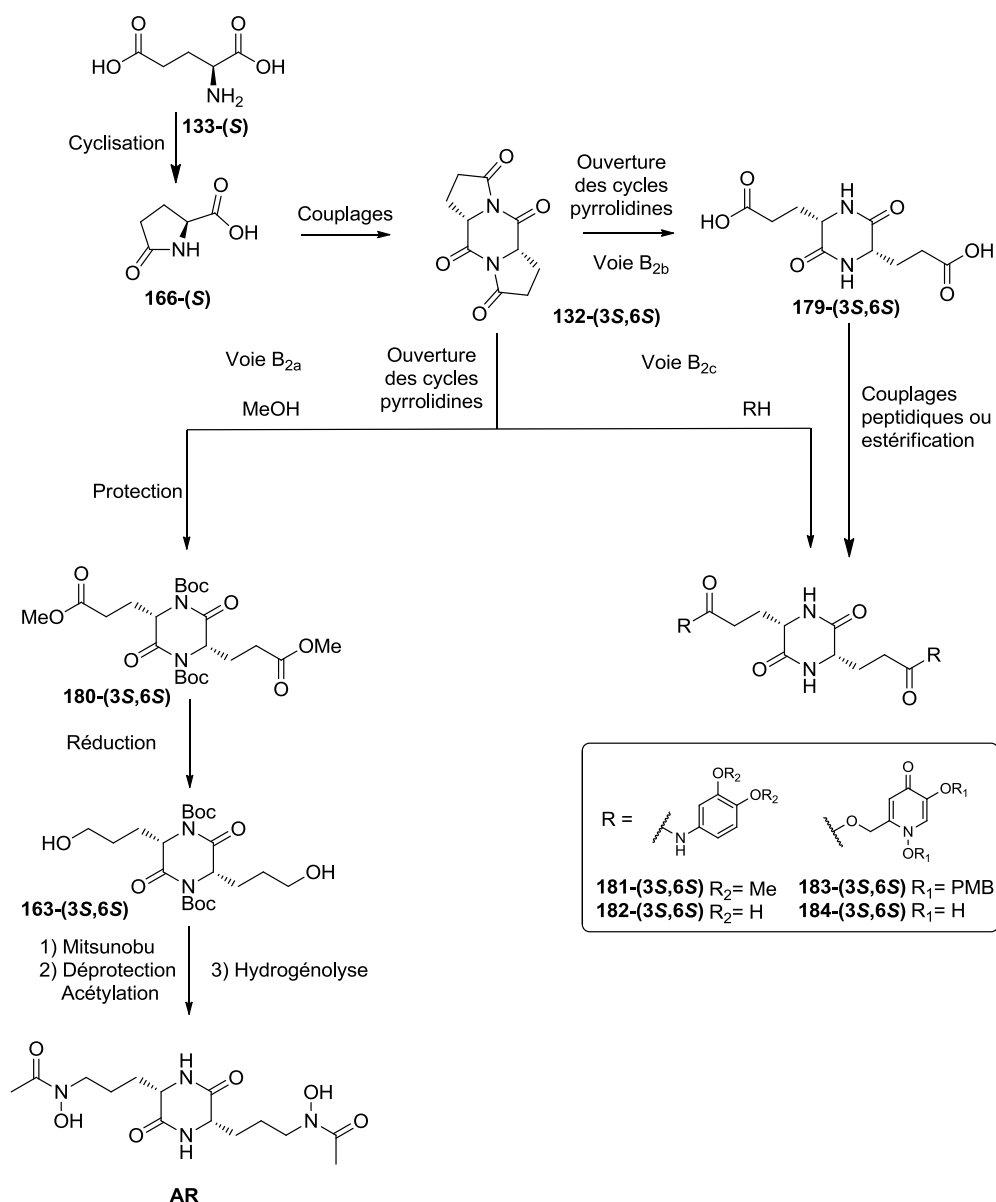


Schéma 64. Synthèse proposée pour obtenir l'**AR** et les analogues de l'**AR** par la voie B₂.

Cette stratégie de synthèse a été inspirée par les travaux de Mathias *et al.* portant sur les dioxopipérazines pyroglutamiques [96]. Ils ont amélioré une méthode permettant d'accéder rapidement à la dioxopipérazine **179-(3S,6S)** en trois étapes à partir du L-glutamate **133-(S)** (Schéma 65). Une première réaction permet de réaliser la cyclisation intramoléculaire aux micro-ondes à 170°C de l'acide aminé pour conduire au pyroglutamate **166-(S)**. Les pyroglutamates formés **166-(S)** sont ensuite couplés en présence de pyridine et d'anhydride acétique pour donner la dioxopipérazine pyroglutamique **132-(3S,6S)**. En milieu acide, cette

dioxopipérazine **132-(3S,6S)** est convertie en diacide **179-(3S,6S)**. Par ailleurs, cette équipe a également réalisé l'ouverture des cycles pyrrolidines en présence de différents alcools pour donner les esters **185-(3S,6S)**, **186-(3S,6S)** et **187-(3S,6S)** correspondants avec de faibles rendements compris entre 19 à 35%.

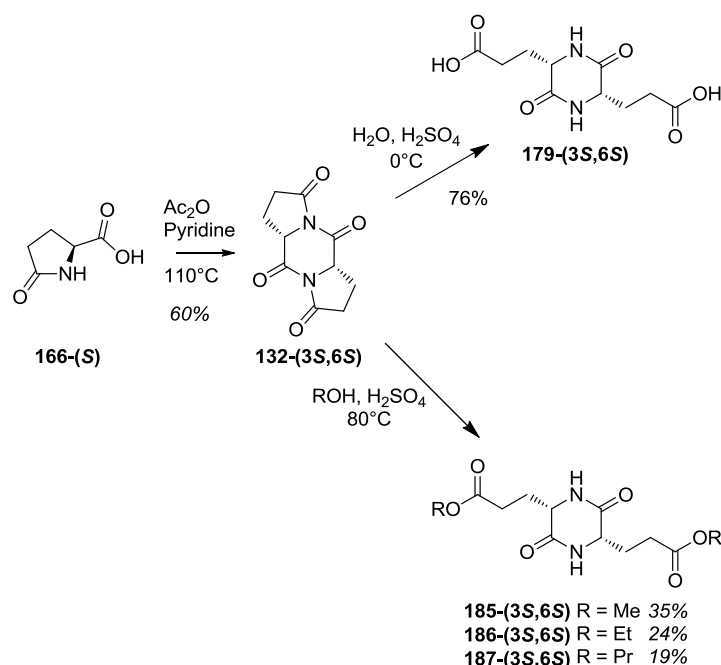


Schéma 65. Synthèse des dioxopipérazines estérifiées **185**, **186** et **187** par Mathias *et al.*

Nous avons donc repris cette stratégie de synthèse et obtenu la dioxopipérazine **132-(3S,6S)** avec 60% de rendement global. Pour accéder à l'AR selon la voie B_{2a} et à ses analogues, nous avons ensuite réalisé une ouverture des cycles pyroglutamiques à l'aide de méthanol en conditions acides pour obtenir le diester de méthyle **185-(3S,6S)** avec un rendement de 34%. Afin d'éviter les problèmes de solubilité du futur diol, nous avons protégé les groupements amides de la dioxopipérazine **185-(3S,6S)** sous forme de carbamates **180-(3S,6S)** (Schéma 66). Enfin, une réduction par le borohydrure de sodium nous a permis d'obtenir le diol désiré **163-(3S,6S)**. Comme nous l'avons décrit précédemment, quatre étapes sont maintenant encore nécessaire pour obtenir l'AR comme Nous avons également obtenu le diol **158-(3S,6S)** par réduction du diester **185-(3S,6S)**. Les deux composés **158-(3S,6S)** obtenus par la voie A₂ (Schéma 54, p 127) ou par la voie B₂ possèdent des spectres RMN ¹H et des pouvoirs rotatoires identiques. Nous pouvons ainsi affirmer que lors de l'étape

de dialkylation (voie A2), nous avons bien formé deux centres stéréogènes de configuration (S).

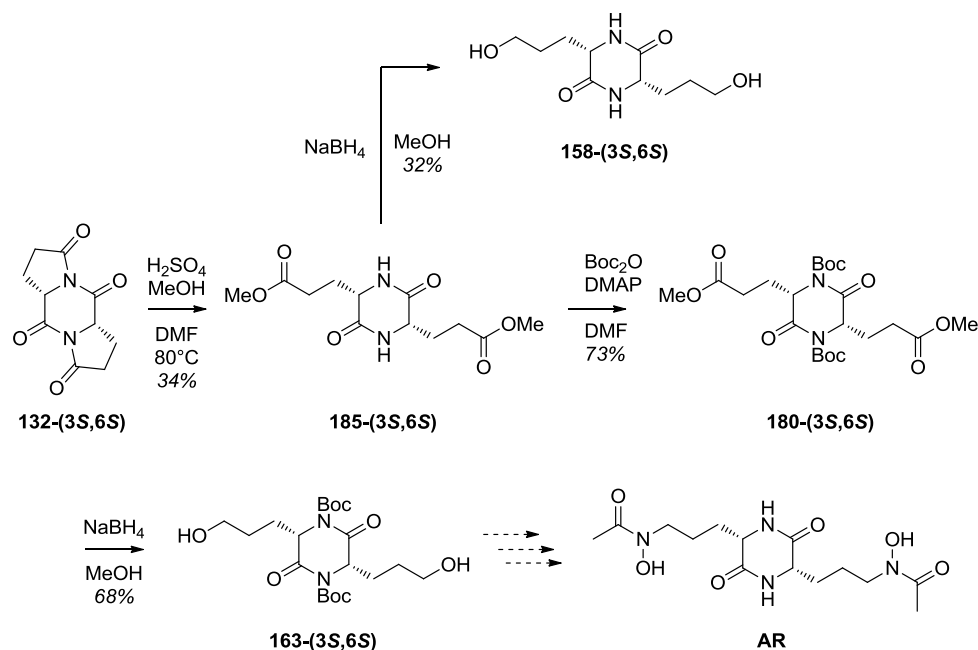


Schéma 66. Synthèse du diol **163-(3S,6S)** à partir de la dioxopipérazine **132-(3S,6S)** selon la voie B_{2a}.

En parallèle, nous avons souhaité accéder à des analogues de l'AR **182-(3S,6S)** et **184-(3S,6S)** portant respectivement deux catéchols et deux hydroxypyridinones à partir du diacide **179-(3S,6S)**. Plusieurs tests de couplage peptidique avec l'aminovératrol **188** ou d'estérification avec l'hydroxypyridinone **108** en présence d'agents de couplages tels que l'EDCI ou le DCC ont été réalisés (Tableau 16, entrées 1, 5, 7 et 11) mais n'ont pas permis de fournir les produits désirés. La durée des réactions a été augmentée sans pour autant permettre d'obtenir le produit attendu (Tableau 16, entrées 2 et 8 vs 1 et 7). Des tests ont été effectués à différentes températures (Tableau 16, entrées 3, 4, 9 et 10 vs 1 et 7) mais cette fois encore, seuls les produits de départ ont été retrouvés. Enfin, des essais aux micro-ondes ont également été réalisés sans succès (Tableau 16, entrées 13 et 14).

Tableau 16. Essais d'amidification et d'estérification de la dioxopipérazine **179-(3S,6S)** (voie B_{2b}).

<chem>COc1cc(N)cc(OC)c1</chem> 188 ou <chem>COc1cc(O)cc(OC)n1</chem> 108 179-(3S,6S) Agent de couplage DMF 181 R = a 183 R = b R = <chem>COc1cc(N)cc(OC)c1</chem> a ou <chem>COc1cc(O)cc(OC)n1</chem> b					
Essais	Agent de couplage	Durée	Réactif	Température	Observations
1	EDCI/HOBt	10h	Hydroxypyridinone 108	25°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
2	EDCI/HOBt	24h	Hydroxypyridinone 108	25°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
3	EDCI/HOBt	24h	Hydroxypyridinone 108	80°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
4	EDCI/HOBt	24h	Hydroxypyridinone 108	120°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
5	DCC/DMAP	24h	Hydroxypyridinone 108	80°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
6	DCC/DMAP	24h	Hydroxypyridinone 108	120°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
7	EDCI/HOBt	10h	Aminovératrol 188	25°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
8	EDCI/HOBt	24h	Aminovératrol 188	25°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
9	EDCI/HOBt	24h	Aminovératrol 188	80°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
10	EDCI/HOBt	24h	Aminovératrol 188	120°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
11	DCC/DMAP	24h	Aminovératrol 188	80°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
12	DCC/DMAP	24h	Aminovératrol 188	120°C	Produit de départ 179-(3S,6S)
13	-	30 min	Hydroxypyridinone 108	120°C (MW)	Produit de départ 179-(3S,6S)
14	-	30 min	Aminovératrol 188	120°C (MW)	Produit de départ 179-(3S,6S)

Face à ces échecs, nous avons décidé de mettre la dioxopipérazine pyroglutamique **132-(3S,6S)** en réaction avec **188** dans les conditions expérimentales développées par Mathias *et al.* (Schéma 67). Nous avons ainsi obtenu le composé désiré avec un rendement de 31%.

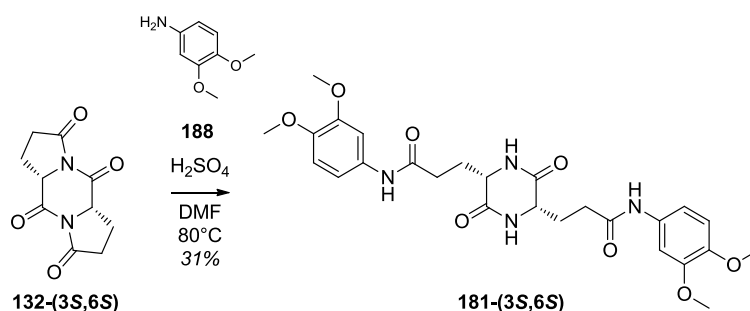


Schéma 67. Synthèse de la dioxopipérazine **181-(3S,6S)** selon la voie B_{2c}.

Finalement une étape de déprotection, en présence de trichlorure d'aluminium et d'iodure de sodium, nous a permis de synthétiser l'analogue **182-(3S,6S)** de l'AR portant deux fonctions chélatrices du fer de type catéchol avec un rendement global de 15%.

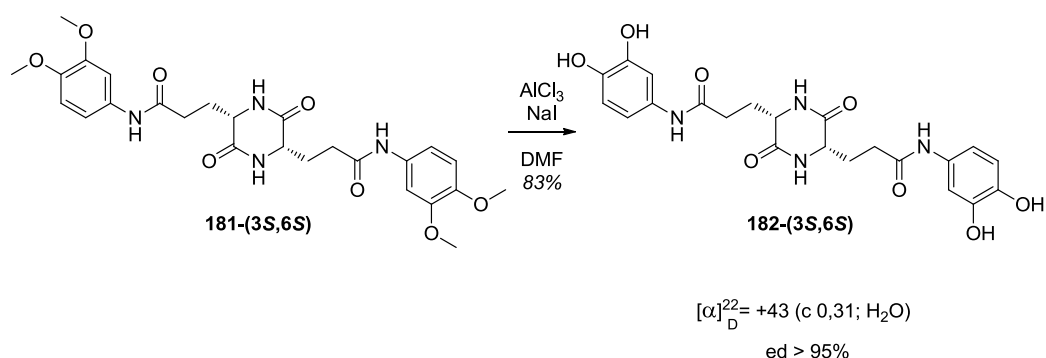


Schéma 68. Déprotection des fonctions catéchols de la dioxopipérazine **181-(3S,6S)**.

Le spectre RMN ¹H de la dioxopipérazine **182-(3S,6S)** indique la présence d'un centre de symétrie confirmant que le composé obtenu est bien *cis*-disubstitué. Les multiplets 1 et 2 correspondent aux groupements CH₂ des chaînes portant les fonctions chélatrices du fer et le multiplet 3 correspond aux protons du cycle pipérazinique.

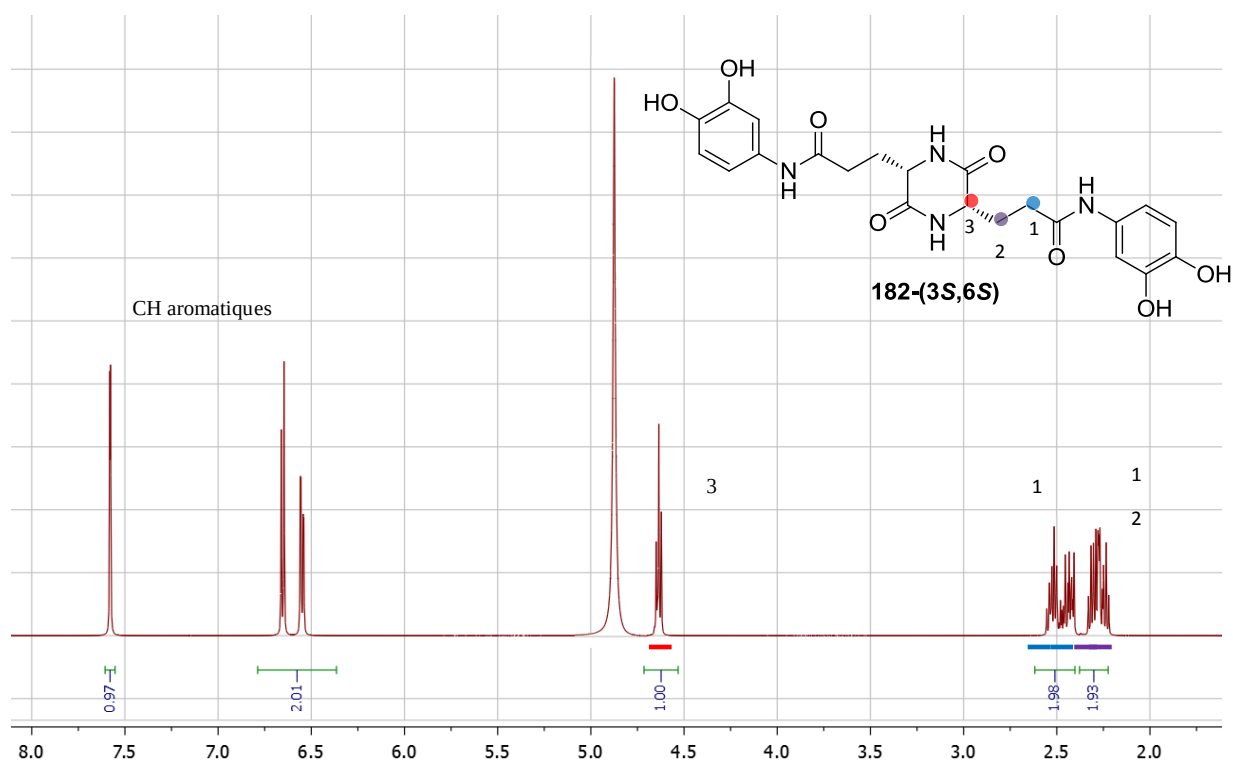


Figure 44. Analyse du spectre RMN ^1H de la dioxopipérazine **182-(3S,6S)**.

Ces résultats encourageants nous incitent à poursuivre l'étude de cette voie. La même réaction sera appliquée en présence de la dihydroxypyridinone **108** et devrait nous permettre d'obtenir un second analogue de l'**AR**, après déprotection des groupements PMB. La synthèse de l'**AR** sera continuée et ce sidérophore devrait être obtenu en 3 étapes très prochainement : i) réaction de Mitsunobu en présence de la *O*-benzyl-*N*-Troc-hydroxylamine, ii) déprotection et acétylation, iii) hydrogénolyse.

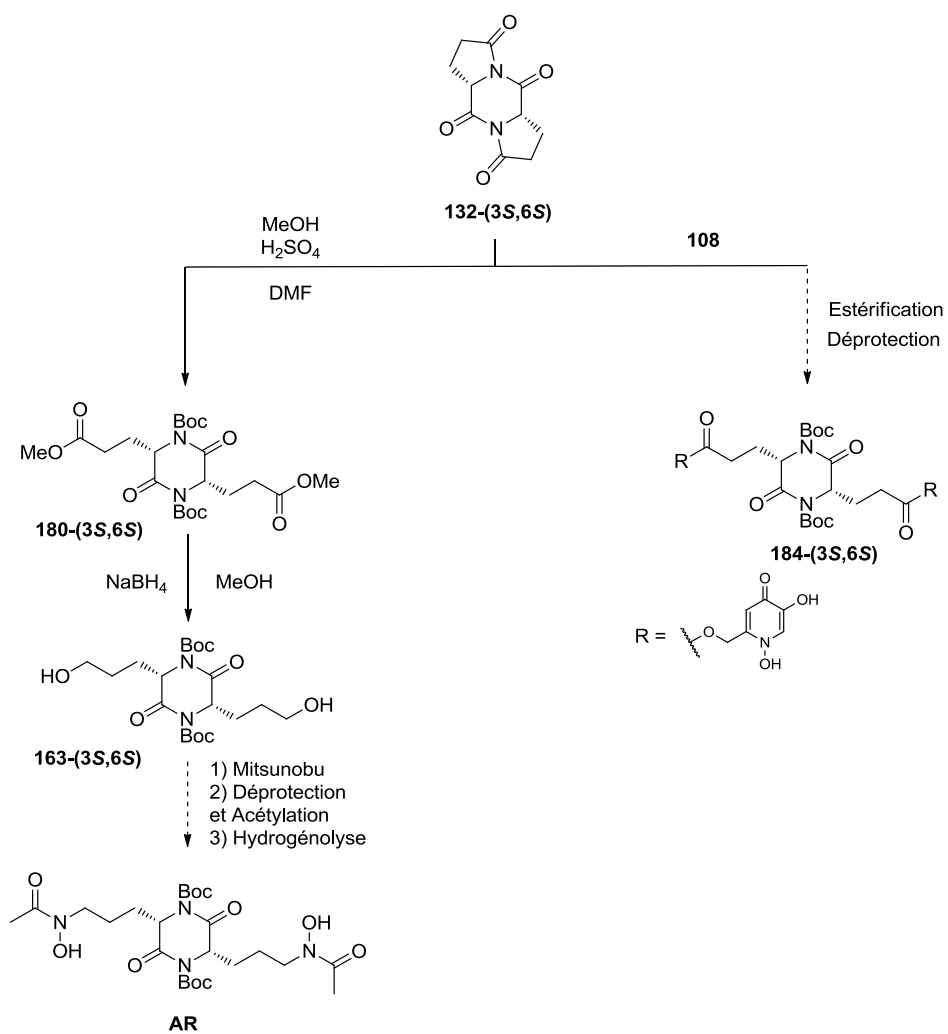


Schéma 69. Dernières étapes pour l'obtention de l'**AR** et de l'analogue hydroxypyridinone par la voie B₂.

Bilan des synthèses effectuées

Au cours de cette thèse de nombreuses voies de synthèse pour accéder à des pipérazines 1,4-disubstituées et à des 3,6-dioxopipérazines disubstituées par des fonctions chélatrices du fer ont été étudiées. Concernant les pipérazines 1,4-disubstituées, la synthèse des pipérazines **105c** et **105d** n'a pas abouti. Cependant leurs deux précurseurs respectifs **120** et **114** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 25% et 7%. L'utilisation d'un réacteur à hydrogénolyse récemment acheté par le laboratoire pourrait permettre de réaliser l'étape de déprotection finale qu'il reste à réaliser sur ces deux composés en utilisant des pressions en dihydrogène plus élevées. Par ailleurs, la synthèse du motif **111** nous a permis d'effectuer des tests physico-chimiques et de comparer ses capacités chélatrices du fer III à d'autres groupements chélateurs de type hydroxypyridinone. Ces résultats seront décrits au chapitre IV.

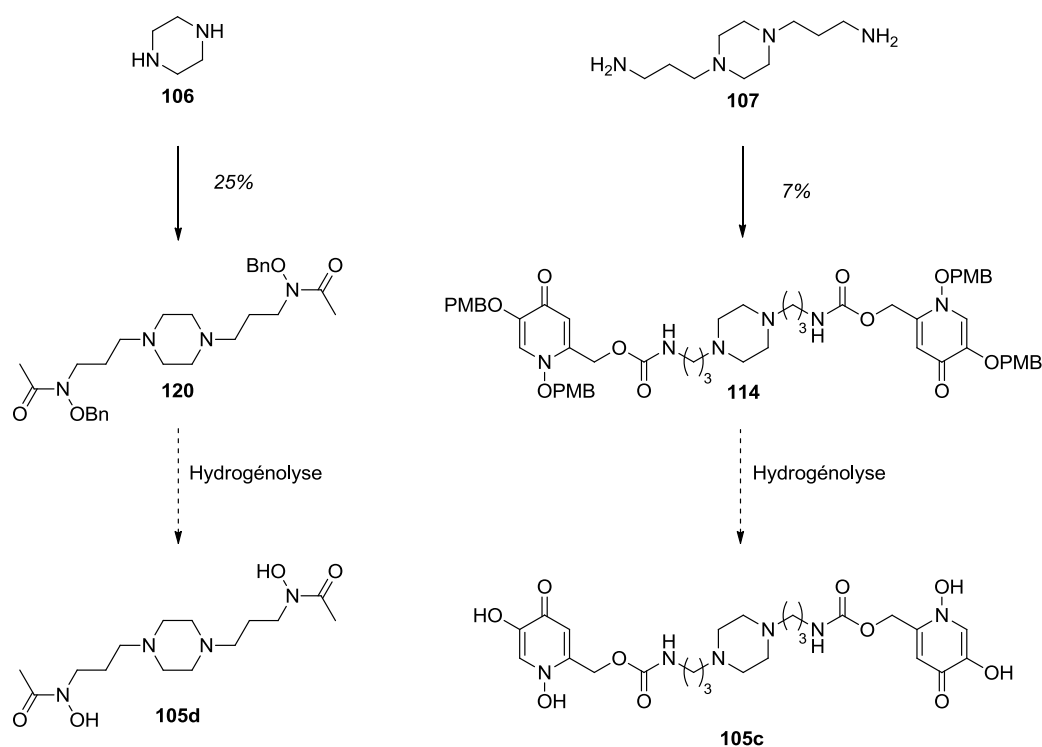


Schéma 70. Récapitulatif des synthèses de pipérazines 1,4-disubstituées.

Une fois ces composés obtenus, leurs propriétés physico-chimiques (pKa, pFe...) pourront être déterminées. Des tests de reconnaissances par des bactéries à Gram négatif seront également effectués.

Pour obtenir l'**AR**, deux voies ont été étudiées : i) la voie A reposant sur l'alkylation stéréosélective de dioxopipérazines portant des copules chirales et ii) la voie B permettant la synthèse de dioxopipérazines à partir d'acides aminés tels que l'ornithine ou la glutamine. Les résultats obtenus pour la voie A sont résumés dans le schéma 71.

Les dioxopipérazines **124-(1S,4S)**, **124-(1R,4R)**, **127-(1R,4S)**, **127-(1S,4S)** et **127-(1S,4S)** ont été obtenues en cinq étapes avec des rendements compris entre 25% et 28% et des excès diastéréoisomériques supérieurs à 95%. La voie A₁ a permis de mettre en place la réaction d'alkylation stéréosélective en présence de bromure de benzyle ou de bromure d'allyle avec des rendements respectifs de 64% et 53% ainsi que des excès diastéréoisomériques de 63% et 70%. Les études continuent pour parvenir à déprotéger la seconde copule chirale. Par la suite, la seconde alkylation pourra être réalisée conduisant à l'**AR** et ses analogues 3,6-disubstitués, après fonctionnalisation des allyles et clivage des copules.

La voie A₂ nous a permis de réaliser l'étape d'alkylation avec un excellent excès diastéréoisomérique supérieur à 95%. La fonctionnalisation des groupements allyles en hydroxamates a fourni la dioxopipérazine **153-(1S,3S,4S,6S)** avec un rendement global de 2%. Malheureusement, nous ne sommes jamais parvenus à cliver les copules chirales à l'aide d'une hydrogénolyse pallado-catalysée. Toutefois, la réalisation de la réduction de Birch sur la dioxopipérazine **151-(1S,3S,4S,6S)**, nous laisse penser que l'application de ce protocole sur la dioxopipérazine **153-(1S,3S,4S,6S)** pourrait nous permettre d'obtenir l'**AR**.

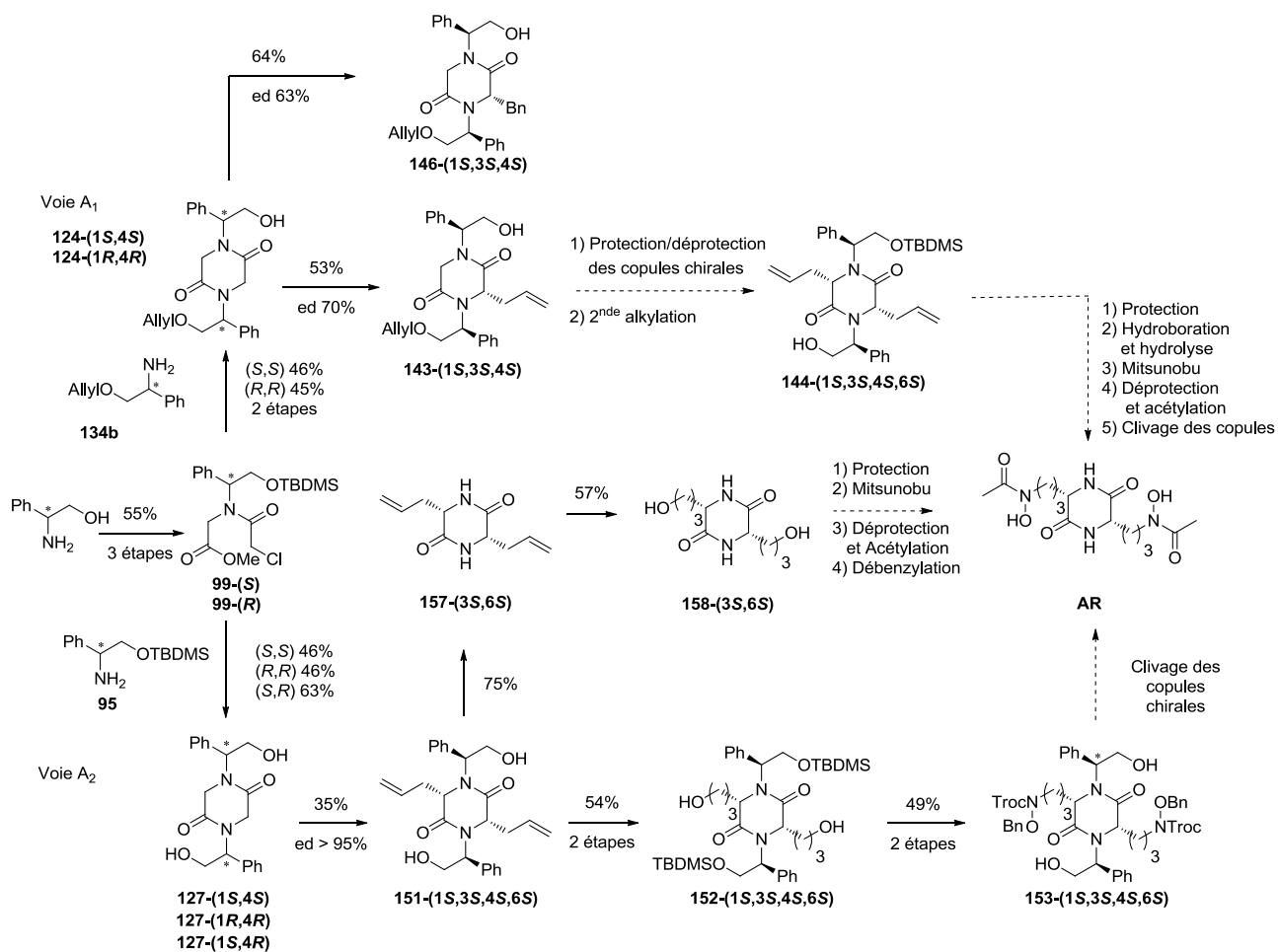


Schéma 71. Récapitulatif des résultats obtenus pour la synthèse de l'AR par la voie A.

La voie B₁ nous a permis de synthétiser les ornithine estérifiée **130a(S)** et **130b(S)**. Malgré de nombreux essais, nous ne sommes pas parvenus à obtenir la fonction hydroxylamine désirée et nécessaire pour la suite de la synthèse. D'autres méthodes, telles que l'oxydation d'imines, devraient nous permettre d'obtenir l'hydroxyornithine désirée. Par la suite deux couplages peptidiques successifs devraient former le cycle dioxopipérazinique puis la déprotection des amines, leur acétylation et une étape de débenzylation pourront fournir l'AR.

Grâce à la voie B₂, le diol **163-(3S,6S)** a pu être synthétisé en 5 étapes, avec un rendement global de 10% et un excès diastéréoisomérique supérieur à 95%. La protection des fonctions amide du cycle dioxopipérazinique nous a permis de contourner les problèmes de solubilité rencontrés avec le diol **158-(3S,6S)**. Une réaction de Mitsunobu, suivie de l'acétylation des amines introduites et du clivage des groupements Boc devrait nous permettre

de synthétiser l'**AR**. Par ailleurs, nous sommes parvenus à obtenir un analogue de l'**AR** portant deux fonctions catéchols **182-(3S,6S)**. Le même schéma de synthèse sera appliqué afin d'obtenir l'analogue **184-(3S,6S)** portant deux fonctions hydroxypyridinones. Des tests de reconnaissances de l'analogue **182-(3S,6S)** par des bactéries à Gram négatif ont été réalisés et sont rapportés au chapitre V.

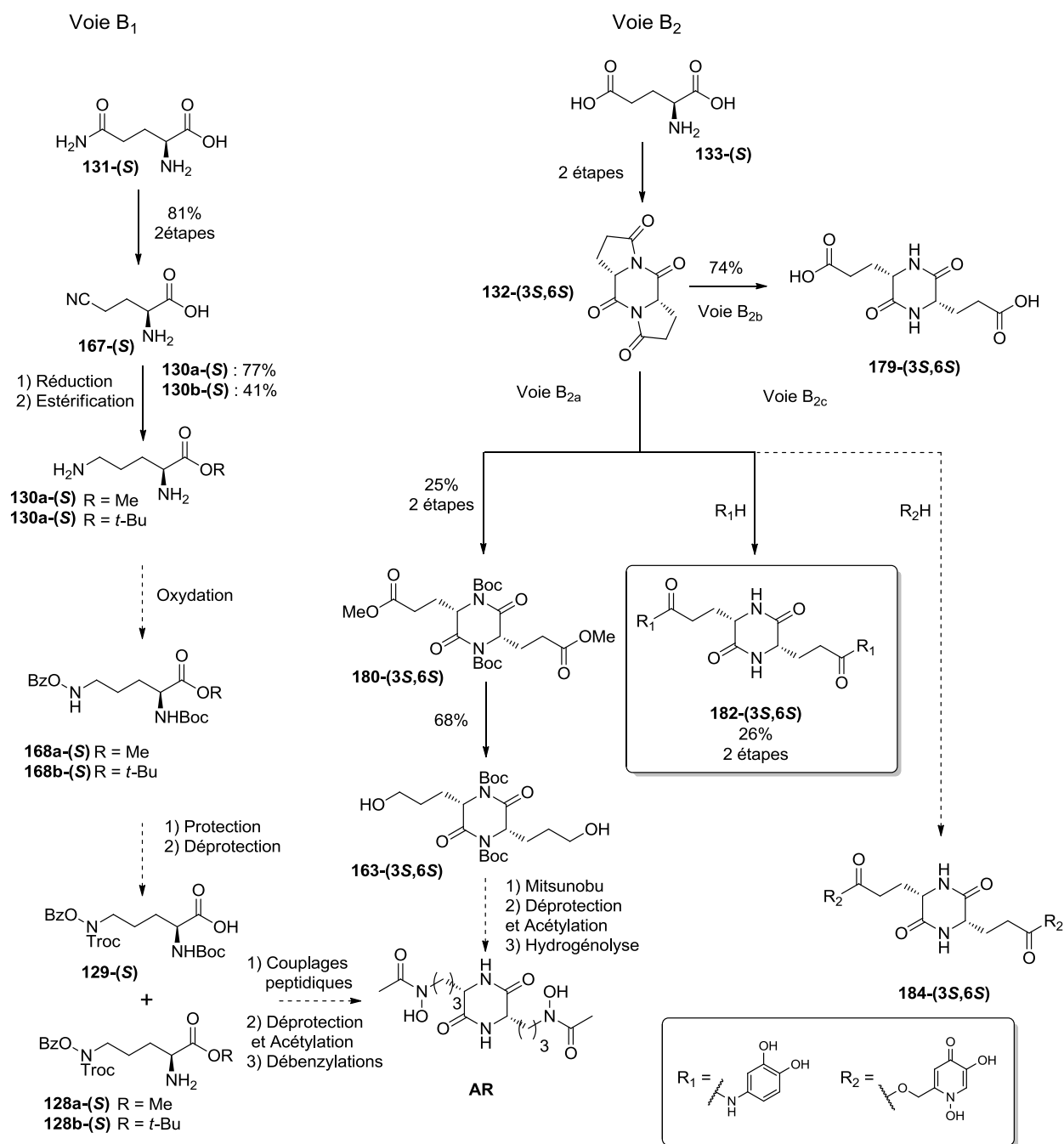


Schéma 72. Récapitulatif des résultats obtenus pour la synthèse de l'**AR** par les voies B₁ et B₂.

III. Formation de complexes sidérophore-Ga(III)

Au cours de ses travaux de thèse, Marine Pillon est parvenue à synthétiser deux analogues 1,4-disubstitués **MPPS0225** et **105a** portant respectivement des ligands du Fe(III) de type catéchol et 3-hydroxypyridinone (schéma 73). Le complexe au gallium **189** a également été obtenu. Au cours de cette thèse, nous avons synthétisé le complexe au gallium **190** pour étudier son activité antibactérienne sur des souches à Gram positif telles que *S. aureus* et *E. faecalis* ou à Gram négatif telles que *E. coli*, *P. aeruginosa*.

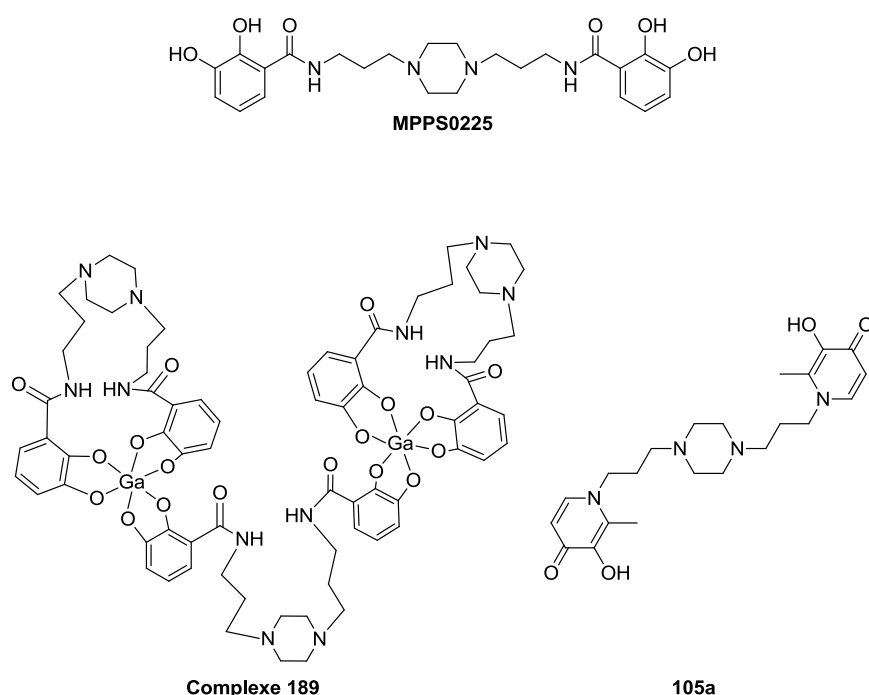


Schéma 73. Structure des analogues 1,4-disubstitués et du complexe au gallium obtenus par Marine Pillon.

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie, la formation de complexes sidérophore-Ga(III) permet de vectoriser cet élément, aux propriétés antibactériennes, à l'intérieur de la bactérie. Lors de précédents travaux effectués au sein du laboratoire, des études physico-chimiques menées sur le composé **MPPS0225** nous ont montré, qu'à pH physiologique, la stœchiométrie entre le Fe(III) et **MPPS0225** était de 2:3. Nous avons alors supposé que cette stœchiométrie était conservée pour des complexes avec la pipérazine tétradentée **190**. Nous avons donc réalisé notre complexe en nous plaçant dans ces conditions (Schéma 74). Nous avons dissout la pipérazine **105a** (13.0 mg, 0.031 mmol, 1,5 éq) dans du

méthanol (10 mL) puis, nous y avons ajouté une solution de nitrate de gallium (5.3 mg, 0.021 mmol, 1 éq) dans du méthanol (1 mL).

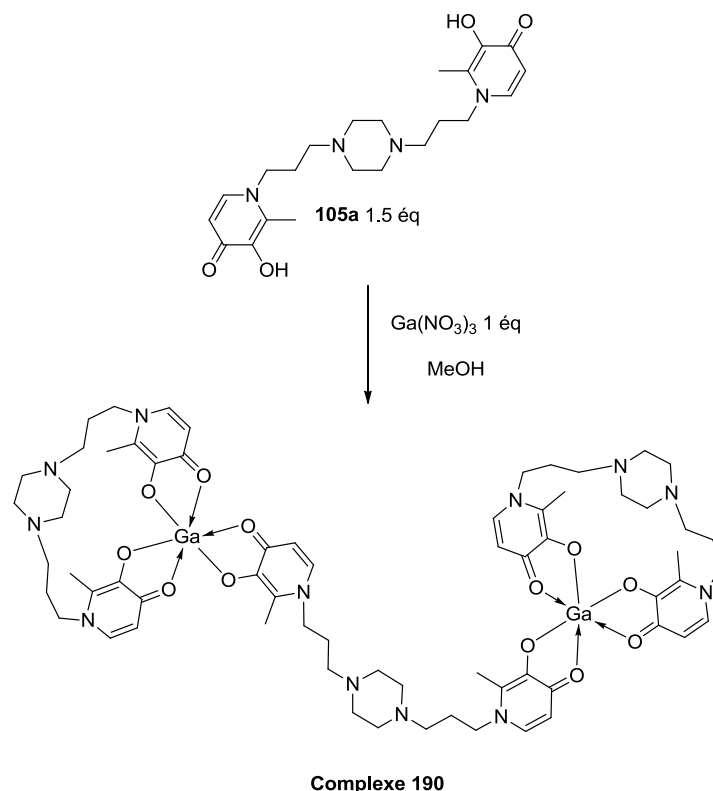


Schéma 74. Formation et structure envisagée du complexe **190** entre la pipérazine **105a** et le nitrate de gallium.

Le spectre RMN ^1H , réalisé dans du méthanol deutéré, indique la présence du complexe **190** dont le déplacement des protons aromatiques varie par rapport au spectre de la dioxopipérazine 1,4-disubstituée **105a**. Le rendement de cette complexation a pu être déterminé par RMN ^1H et est estimé à 93%. L'activité antibactérienne des complexes **189** et **190** ont été évaluée sur des bactéries susceptibles de reconnaître les motifs chélateurs du fer de ces composés. Les résultats de ces analyses sont développés au chapitre V.

Nous développerons, dans le chapitre suivant, les résultats obtenus concernant les analyses physico-chimiques des motifs chélateurs du fer **111** et **108** ainsi que ceux obtenus pour la pipérazine **105a** 1,4-disubstituée par des groupements défériprones.

IV. Etudes physico-chimiques

Les travaux développés dans cette partie ont été réalisés par les docteurs Christina Amarandei et Pierre Vanlemmens ainsi que le professeur Emmanuel Baudrin. Ce chapitre est consacré à l'étude physico-chimique de trois composés afin de comparer entre eux, trois chélateurs du fer : la 5-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)-4-pyrone (acide kojique **108**), la 1,5-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)pyridin-4-one **111** et la 3-hydroxy-1,2-diméthylpyridin-4-one (déféripone). Dans une seconde étape, nous examinerons les propriétés de ligands tétradentates analogues de l'**AR** de type pipérazines substituées en 1,4.

A. Méthode expérimentale pour l'étude des équilibres en solution

Dans un précédent travail réalisé au laboratoire, dans le cadre de la thèse de Marine Pillon, il avait été souligné que les analogues pipéraziniques 1,4-disubstitués présentent une faible solubilité en milieu aqueux [89]. Afin de pouvoir comparer les différents ligands du fer préparés au laboratoire, nous nous sommes donc systématiquement tournés vers l'utilisation d'un mélange de solvants pour réaliser les études physico-chimiques. En effet, la détermination des constantes d'équilibres (acido-basiques et de complexation) nécessite de garder un milieu homogène en absence et en présence des ions métalliques étudiés, en l'occurrence ici les ions Fe(III). Le choix s'est porté sur un mélange eau/DMSO à une fraction molaire de 20% en DMSO utilisé précédemment dans la littérature pour l'étude de complexes Fe(III) avec un complexant thérapeutique l'ICL670 [97]. Notre équipe avait également utilisé ce milieu dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Laurent Dupont de l'ICMR de l'Université de Reims [98].

La comparaison des pKa ou des constantes de complexation ne peut se faire que pour des études réalisées dans le même solvant. En effet, lorsqu'on augmente la quantité de DMSO dans un mélange eau-DMSO les différentes constantes vont évoluer en raison de la différence dans les permittivités de l'eau et du DMSO. La première constante à évoluer est la constante d'autoprotolyse de l'eau comme illustré sur la Figure 46 d'après la littérature [99]. Comme nous pouvons le voir sur la figure 46, la constante de la protolyse de l'eau augmente quand la

fraction molaire de DMSO augmente. Par conséquent, la gamme de pH dans ces milieux sera plus étendue qu'en milieu aqueux pur. En réalisant divers dosages de solutions 0,1 M de HCl par de la potasse 0,1 M, Nous avons déterminé par potentiométrie, pour un mélange eau-DMSO 80:20, un $pK_w = 15,59$ (3), en accord avec les données de la littérature. Un milieu neutre dans ce mélange de solvants sera donc de $pH = 7,8$.

Expérimentalement, la détermination des constantes a été effectuée par potentiométrie couplée si nécessaire à des mesures UV-Vis à 25°C, à force ionique constante (fixée par KCl 0,1 M) dans des solutions sous bullage d'azote. L'électrode pH a été systématiquement calibrée avant chaque mesure grâce à un dosage de HCl 0,1 M et KOH 0,1 M. Ces deux dernières étant préparées dans un mélange eau-DMSO 80:20 et respectivement standardisées par une solution de borax et d'hydrogénophosphate de potassium. Dans un premier temps, les constantes sont estimées en déterminant l'évolution du nombre de protons moyens par ligand, puis par affinement grâce au logiciel Hyperquad 2013. Toutes les constantes seront notées selon la convention suivante : β_{hkl} correspond à la constante de formation du complexe présentant h ligands, k atomes de fer et l protons.

Le travail dans ce type de milieu nécessite d'établir une base de donnée en raison de la différence d'échelle de pH par rapport à de l'eau pure. Par exemple, nous avons déterminé les pK_a de trois tampons usuellement utilisés dans les deux milieux : tampon acétate, tampon bis-tris et tampon HEPES (Tableau 17).

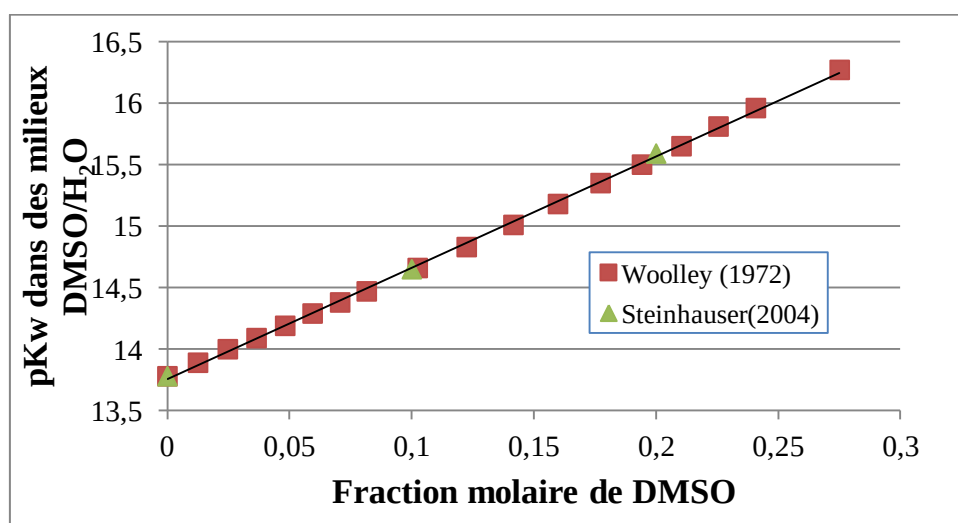


Figure 46. Evolution du produit ionique de l'eau en fonction de la fraction molaire de DMSO dans les mélanges H₂O/DMSO.

Tableau 17. Comparaison des pKa de tampons classiques dans l'eau et dans un mélange H₂O/DMSO 80:20.

	H₂O-DMSO	Eau
Acétate	5,67 (1)	4,56 (2)
Bis-Tris	6,27 (1)	6,45 (1)
HEPES	7,19 (1)	7,55 (1)

Nous retrouvons ici une évolution typiquement observé pour l'ajout de DMSO dans l'eau, c'est-à-dire une augmentation du pKa pour les espèces acido-basiques, conduisant à une espèce anionique (acide acétique/acétate) alors que pour les acides qui forment des espèces cationiques, la valeur du pKa est abaissée. Ceci est dû à une meilleure stabilisation des espèces ioniques en milieux aqueux par rapport aux mélanges eau-DMSO

B. Etude des complexes EDTA-Fe(III)

Il est important de garder en tête que la nature du milieu peut-influencer fortement la formation des complexes, notamment la gamme de stabilité des différences espèces. Lorsque l'on étudie de nouveaux ligands qui forment des complexes relativement stables, il est possible que même à pH très faible, il soit difficile de les dissocier complètement. Aussi, la détermination de toutes les constantes de complexation passe par des études de compétitions avec un ligand dont on connaît les différents équilibres. Nous avons rencontré cette difficulté et nous avons donc débuté une étude sur les complexes EDTA-Fe(III) en milieu H₂O/DMSO afin d'avoir une référence pour les études de compétition. Les propriétés de complexation en milieu aqueux de ce ligand avec le Fe(III) sont bien connues et il est donc utilisé pour les mesures par compétition. En milieu eau-DMSO, la première étape a été de déterminer les pKa (Tableau 18).

Tableau 18. Comparaison des pKa de tampons classiques dans l'eau et dans un mélange H₂O/DMSO 80:20

Solvant	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}	pK _{a4}
H₂O-DMSO	3,15 (1)	3,72 (1)	6,52 (1)	9,82 (1)
H₂O	2	2,68	6,11	10,17

Nous retrouvons quatre constantes d'acidités correspondant à la protonation de deux fonctions acides carboxyliques de l'EDTA (3,15 et 3,72) et aux deux azotes tertiaire (6,52 et 9,82). Les valeurs de ces constantes plus élevées en milieux mixte par rapport au milieu aqueux sont en accord avec la nature anionique des espèces mises en jeu. Les deux autres fonctions ne sont pas protonables dans les conditions de pH étudiées. Des dosages potentiométriques ont ensuite été réalisés en présence de Fe(III). Dans un premier temps, nous avons essayé de prendre un modèle similaire à la complexation du Fe(III) par ce ligand en milieux aqueux. Néanmoins, le meilleur modèle affiné ne conduit qu'à la prise en compte de seulement trois espèces : EDTA-Fe⁻, EDTA-Fe(OH)²⁻ et EDTA-Fe(OH)₂³⁻ dont les constantes de formation sont rassemblées dans le tableau 19. Il n'y a donc pas de protonation du complexe EDTA-Fe(III) ce qui conduit à des domaines d'existences décalés avec une apparition d'hydroxylation sur le fer à plus bas pH. Dès pH 2, le fer est partiellement hydrolysé avec la formation de EDTA-Fe(OH)²⁻. Ce type d'espèce correspond à la formation de cinq liaisons de coordination entre l'EDTA et le fer, la sixième coordination étant remplie par l'ion hydroxyde. Cette tendance des complexes EDTA-Fe(III) à s'hydrolyser a été rapportée dans les années 60 [100]. A plus haut pH, nous observons une dihydroxylation. Ces espèces dihydroxylées peuvent réagir pour conduire à des dimères en solution. Nous avons vérifié si ceci se produisait en milieu H₂O-DMSO par des mesures UV-Visible (Figure 48). A partir d'un pH = 7.5, une large bande d'absorption asymétrique apparaît, présentant un maximum vers 470 nm. L'intensité de cette bande augmente de façon continue jusqu'à pH = 10 puis diminue en accord avec notre modèle (Figure 47). Cette bande est caractéristique de la formation de dimères par formation de ponts μ -oxo comme précédemment rapporté en milieu aqueux [101].

Tableau 19. Constantes de complexation EDTA-Fe(III) déterminées dans un mélange H₂O/DMSO 80:20

	Espèce	Constantes
β_{110}	EDTA-Fe ⁻	26,69 (10)
β_{11-1}	EDTA-Fe(OH) ²⁻	25,29 (6)
β_{11-2}	EDTA-Fe(OH) ₂ ³⁻	16,95 (4)

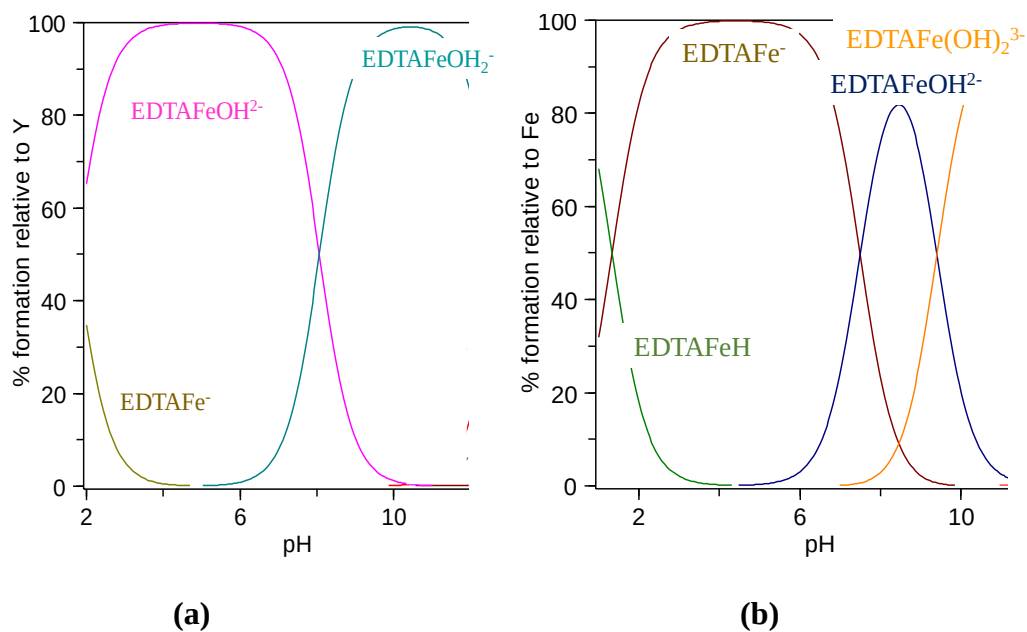


Figure 47. Diagrammes de spéciation des complexes EDTA-Fe(III) en milieu (a) H₂O/DMSO 80:20 et (b) aqueux.

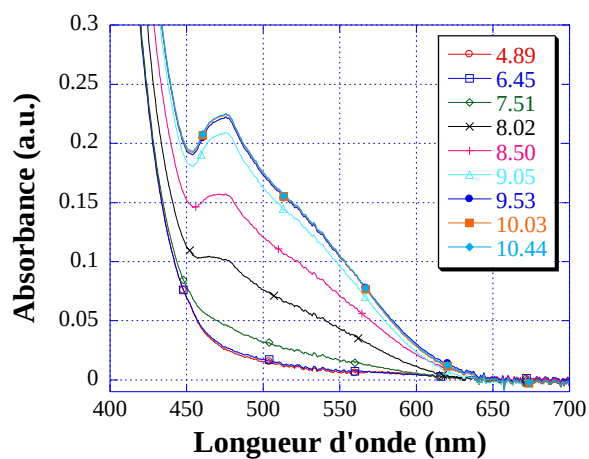


Figure 48. Evolution du spectre UV-Visible d'une solution EDTA-Fe(III) en milieu H₂O/DMSO 80:20 en fonction du pH.

Ainsi malgré l'ajout de DMSO, nous voyons que les mêmes types d'espèces sont formés dans les deux milieux avec juste une modification des limites des domaines de prédominance. Nous allons à présent détailler les résultats obtenus sur les ligands du fer que nous avons sélectionnés dans ce travail de thèse et qui pourront potentiellement être utilisables pour la formation d'analogues de sidérophores.

C. Ligands bidentés simples

Nous avons vu dans les paragraphes et chapitres précédents que les sidérophores présentent un nombre restreint de fonctions bidentées différentes. Diverses molécules ont été rapportées pour l'obtention d'analogues, notamment comportant des groupements hydroxypyridinone, hydroxypyrrone et *N*-hydroxy-hydroxypyridinone.

1. Défériprone

La défériprone (1,2-diméthyl-3-hydroxy-4-pyridinone) est un agent chélatant thérapeutique du Fe(III) utilisé initialement pour traiter la thalassémie. Il a été utilisé précédemment seul ou greffé sur différentes structures pour la formation de systèmes tétradentés [102,103] ou hexadentés [104]. Dans certains cas une hydroxypyridinone sans méthyle en position 2 a été utilisée. Nos pipérazines 1,4-disubstituées, analogues de l'**AR**, sont peu solubles en milieu aqueux. Comme référence, nous avons donc repris l'étude de la complexation de la défériprone en milieu H₂O/DMSO. La démarche est identique à celle utilisée pour l'étude de l'EDTA.

La défériprone présente deux équilibres acido-basiques (Schéma 75)

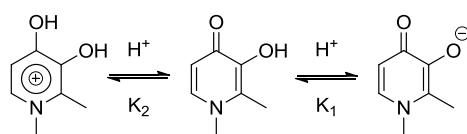


Schéma 75. Equilibres acido-basiques de la défériprone

Le dosage d'une solution de déféripone 4 mM a été réalisé en l'absence et en présence d'ions Fe(III) dans un mélange H₂O/DMSO à 25°C à force ionique constante (KCl 0,1 M) (Figure 49). Pour le ligand seul, on voit clairement apparaître un épaulement pour un nombre d'hydroxyde par ligand de -1 et un palier entre 0 et 1. Ceci correspond aux deux équilibres précédemment cités. Un affinement dans le logiciel HYPERQUAD 2013 a permis d'obtenir les deux valeurs de pKa (Tableau 20). Le pKa₁=10,76 (1) correspond à la déprotonation de l'hydroxyde phénolique. La diminution de pKa₂ par rapport aux résultats obtenus dans l'eau confirme l'attribution de cet équilibre conduisant à la formation de l'espèce cationique. En présence de Fe(III) la diminution du pH pour un nombre fixé d'hydroxydes introduit démontre la formation de complexes déféripone-Fe(III).

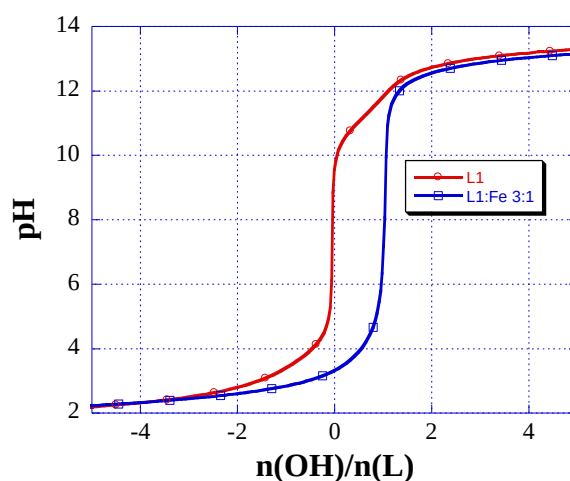


Figure 49. Dosage d'une solution de déféripone (C = 4 mM) à 25 °C sous N₂ seul et avec 3 équivalents de Fe(III).

Tableau 20. Comparaison des pKa de la déféripone et des constantes de complexation avec le Fe(III) dans l'eau et dans un mélange H₂O/DMSO 80:20.

	H ₂ O/DMSO	H ₂ O (d'après la littérature [105])
pKa ₁	10,76 (1)	9,82 (1)
pKa ₂	3,56 (1)	3,66 (1)
β ₁₁₀	15,15 (1)	15,01 (1)
β ₂₁₀	27,85 (1)	27,30 (1)
β ₃₁₀	37,62 (1)	37,43 (1)

Nous sommes partis du modèle établi par Nurchi *et al.* [105] en milieu aqueux pour affiner notre courbe de dosage en présence de Fe(III). Les affinements ont permis rapidement

de bien simuler la courbe avec l'obtention des trois constantes de complexation (Tableau 20) conduisant aux trois complexes de stœchiométries ligand(s)/Fe(III) de 1:1, 2:1 et 3:1. L'évolution des espèces en fonction du pH est semblable pour les deux milieux H₂O et H₂O/DMSO (Figure 50).

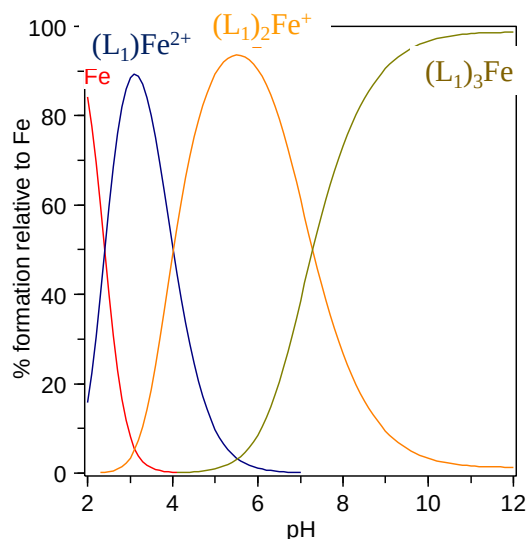


Figure 50. Diagrammes de spéciation des complexes défériprone-Fe(III) en milieu H₂O/DMSO 80:20 pour trois équivalents de ligands

Enfin, nous avons étudié les spectres de ces complexes par spectrométrie UV-visible (mesure non rapportées ici). Nous avons pu affiner également l'évolution de ces différents spectres en fonction du pH sur la base du modèle obtenu par potentiométrie. Ceci nous a permis d'obtenir la signature optique de chacun des trois complexes formés (Figure 51). Sur cette figure, nous pouvons observer un comportement hypsochrome classique de formation de complexes successifs de coordinence 2, 4 puis 6. Ces spectres nous seront utiles pour la discussion sur la formation des complexes entre le Fe(III) et la pipérazine 1,4 disubstituée.

2. Acide kojique **109**

L'acide kojique **109** (5-hydroxy-2-hydroxyméthyl-4*H*-pyran-4-one) est un composé dérivé du maltol, similaire à la défériprone. La principale différence entre ces deux composés est le remplacement de l'atome d'azote par un atome d'oxygène (Schéma 76). Ce

type de groupement a également été rapporté pour la formation d'analogues de sidérophores [106–108].

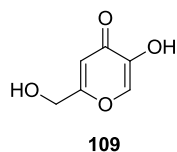


Schéma 76. Structure de l'acide kojique **109**.

Nous avons, dans un premier temps, déterminé les propriétés acido-basiques de ce ligand dans le mélange H₂O/DMSO. Le dosage donne un unique saut de pH indiquant un équilibre unique pour ce composé à un pH compris entre 2 et 14. A partir de ce dosage, nous avons calculé le nombre de protons moyens par ligand en fonction du pH (Figure 52)

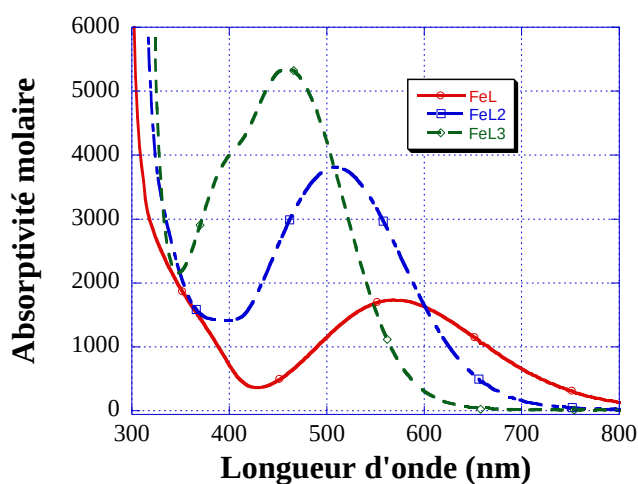


Figure 51. Signature optique des complexes défériprone-Fe(III) en milieu H₂O/DMSO.

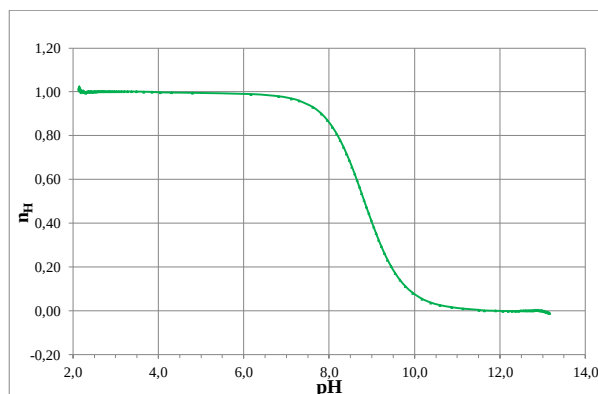


Figure 52. Evolution du nombre de proton moyen par ligand en milieu H₂O/DMSO.

Sur ce graphique, on observe que cet équilibre concerne la déprotonation de l'acide kojique **109** qui porte un proton énolique. L'hydroxyle se déprotone vers un pH de 8,5. L'affinement de la courbe conduit à une valeur du pKa = 8,826 (3) (Tableau 5). Contrairement à la déféripone nous n'observons pas la protonation supplémentaire sur le carbonyl conduisant à l'espèce protonique. En milieu aqueux, Nurchi *et al.* [106], en plus de la déprotonation de l'énol avec un pKa = 7,70 (1), avaient obtenu un pKa très faible de -1,86 (1). Il est donc normal que nous ne puissions déterminer ce pKa par potentiométrie en milieu mixte H₂O/DMSO puisque cet équilibre conduisant à une espèce cationique serait décalé vers des milieux encore plus acides, comme discuté ci-dessus.

Tableau 21. Comparaison des pKa de la déféripone et des constantes de complexation avec le Fe(III) dans l'eau et dans un mélange H₂O/DMSO 80:20.

	H ₂ O-DMSO	Eau (d'après la littérature [106])
pKa	8,826(3)	7,70 (1)
β ₁₁₀	10,4(3)	8,5 (1)
β ₂₁₀	20,14(11)	17,04 (7)
β ₃₁₀	28,15(8)	24,15 (7)

Les différents dosages réalisés en présence de Fe(III) pour différents rapports ligand(s)/métal ont été simulés sur la base d'un modèle formant successivement les complexes 1:1, 2:1 et 3:1. Un bon affinement des différentes courbes de dosage a été obtenu

et conduit aux constantes de formation rassemblées dans le tableau 21. On note une complexation moins efficace que pour la déféripone avec une valeur de β_{310} plus faible. Ceci est bien visible sur le diagramme de spéciation (Figure 53) avec une difficulté à former le complexe hexadenté. Néanmoins, il faut nuancer ces propos puisque nous avons observé systématiquement en fin de dosage la formation d'un précipité (Figure 54). La présence d'un solide lors de la détermination de constantes d'équilibres est problématique et influence fortement sur la qualité des résultats. Nurchi *et al.* avaient noté en milieu aqueux la formation de précipités qu'ils avaient identifiés à un hydroxyde de Fe(III) « $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ». Si c'est le cas, il serait nécessaire d'affiner de nouveau nos données en prenant en compte les différents équilibres d'hydrolyse du Fe(III). Bien connues en milieu aqueux les constantes d'équilibre doivent être redéterminées dans le milieu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$. A notre connaissance, une seule publication rapporte de telles constantes d'hydrolyse pour le même mélange de solvants mais toutefois avec un sel support différent [109]. Nous n'avons pu réaliser ces mesures durant ce travail mais elles feront l'objet de futurs travaux au laboratoire.

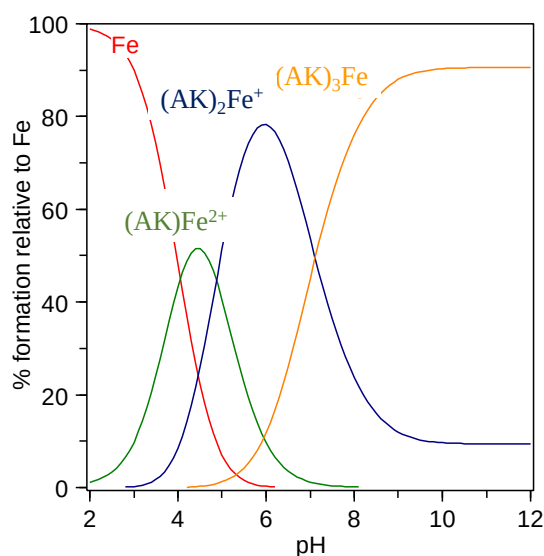


Figure 53. Diagrammes de spéciation des complexes acide kojique **109**-Fe(III) à partir d'un modèle ne prenant pas en compte l'hydrolyse du Fe(III) en milieu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 80:20 pour trois équivalents de ligands.



Figure 54. Photographie illustrant la formation de précipités lors du dosage de solution d'acide kojique **109**-Fe(III)

3. Hydroxypyridinone **111**

Enfin nous avons synthétisé un dérivé proche de la déféiprone, mais pour lequel le groupement *N*-méthyle est remplacé par un groupement hydroxyde (Schéma 77). Ce type de fonction est apparu récemment dans des travaux qui visent à vectoriser des antibiotiques par la voie des sidérophores [110]. Néanmoins, nous n'avons trouvé aucune information dans la littérature sur les propriétés de ce groupement fonctionnel envers la complexation du Fe(III)

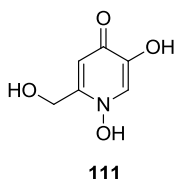


Schéma 77. Structure du composé **111**

Ce composé présente trois fonctions acido-basiques accessibles entre pH = 2 et pH = 14 (Figure 55). Les valeurs de pK_a ont été estimées par la courbe donnant le nombre de protons moyen par ligand puis affinées (Tableau 22).

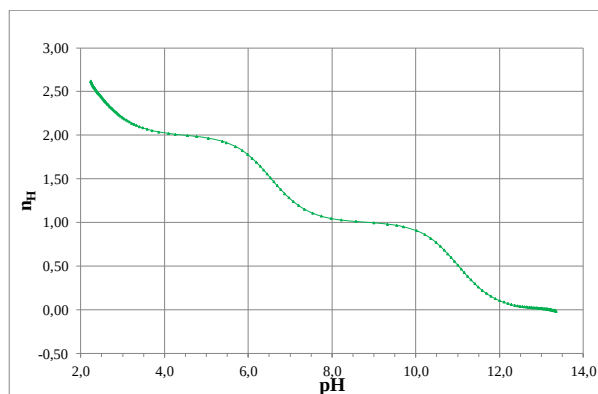


Figure 55. Evolution du nombre de proton moyen par ligand **111** en milieu H₂O/DMSO

Tableau 22. Constantes acido-basiques de **111** et constantes de complexation préliminaires obtenues avec le Fe(III) déterminées dans un mélange H₂O/DMSO 80:20

	H ₂ O-DMSO
pKa ₁	2,43 (5)
pKa ₂	6,56 (1)
pKa ₃	11,04 (1)
β ₁₁₀	17,4 (3)
β ₂₁₀	29,3 (5)
β ₃₁₀	38,5 (6)

Le pKa₃ de 11,04 (1) peut être attribué, par analogie avec le défériprone, à l'hydroxyle énolique. Le plus probable est ensuite d'attribuer l'équilibre acido-basique pKa₁ à la protonation du carbonyle avec délocalisation des charges sur le cycle. Par déduction pKa₂ correspondrait à la déprotonation de l'hydroxyde porté par l'atome d'azote. Dès que l'on ajoute du Fe(III) à une solution de ce ligand, une coloration rouge intense apparaît, caractéristique des complexes du Fe(III) avec les hydroxypyridinones. Nous avons essayé de modéliser la formation des complexes **111**-Fe(III) en utilisant un modèle simple de formation des complexes 1:1, 2:1 et 3:1. Les meilleurs résultats obtenus à ce jour sont donnés dans le tableau 22. Nous avons suivi la formation des complexes par spectrométrie UV-visible. Dès pH = 2 des complexes sont formés avec un maximum d'absorption à 530 nm, compatible avec la formation d'un complexe 1:1 (sur la base de la comparaison avec les spectres des différentes espèces obtenues pour la défériprone ; Figure 51). Le maximum se déplace ensuite jusqu'à 503 nm pour un pH = 4,3, ce qui indique l'incorporation d'un deuxième ligand dans la

sphère de coordination du fer (complexe 2:1). En revanche, en continuant à augmenter le pH, nous observons l'apparition d'une bande à 481 nm jusqu'à pH = 9 puis une disparition de cette bande. Cela indique que la formation du complexe 3:1 n'est pas complète et que d'autres réactions se produisent à partir de pH = 8-9. Le modèle que nous avons proposé est donc insuffisant et il faudra évaluer un modèle plus complet en prenant en compte, comme pour l'acide kojique **109**, l'hydrolyse du Fe(III) et/ou la formation d'autres espèces.

D. Piperazine disubstituée **105a**

Nous avons pu commencer l'étude physico-chimique sur une molécule donc la synthèse avait été développée précédemment au laboratoire par Marine Pillon : la pipérazine **105a** 1,4-disubstituée par la 2-méthyl-3-hydroxypyridinone (Schéma 78).

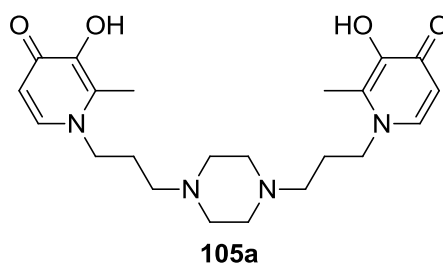


Schéma 78. Structure de la pipérazine **105a** 1,4-disubstituée par la 2-méthyl-3-hydroxypyridinone.

D'après la structure de cette molécule, nous pouvons attendre six valeurs de pKa : deux sur chaque groupe hydroxypyridinone et deux sur la pipérazine. Sur la courbe donnant le nombre de proton moyen par ligand obtenue par dosage par du KOH 0,1 M d'une solution préalablement acidifiée avec HCl 0,1 M (courbe bleue, Figure 56), nous pouvons observer une perte de deux protons vers pH = 11, un proton vers pH = 7 et trois protons moins discriminés en dessous de pH = 4. L'affinement de la courbe de dosage confirme cela et permet de déterminer précisément les six pKa correspondants (Tableau 23).

$pK_{a1} = 2,16$ et $pK_{a2} = 2,75$ correspondent à la protonation des groupes pyridinone. La pipérazine peut être doublement protonée avec $pK_{a3} = 3,75$ et $pK_{a4} = 6,80$. A noter que ces deux valeurs sont très proches de la protonation que la pipérazine **MPPS0225** disubstituée

par deux catéchol qui étaient de 3,37 (3) et 6,95 (3). Le greffage de bras propyle abaisse fortement les pKa par rapport à une pipérazine seule (5,351 (4) et 9,432 (4)). Finalement, $pK_{a5} = 10,55$ et $pK_{a6} = 11,45$ correspondent aux deux protons phénoliques. Le diagramme de spéciation précise que la molécule neutre est l'espèce prédominante à pH physiologique (Figure 56).

Tableau 23. Constantes acido-basiques de la 1,4-pipérazine disubstituée **105a** dans un mélange H₂O/DMSO 80:20.

	H ₂ O-DMSO
pK_{a1}	2,16 (3)
pK_{a2}	2,75 (2)
pK_{a3}	3,75 (4)
pK_{a4}	6,80 (4)
pK_{a5}	10,55 (3)
pK_{a6}	11,45 (3)

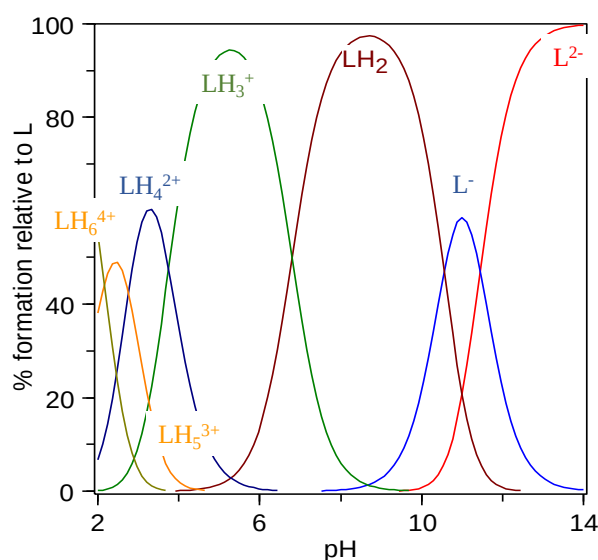


Figure 56. Diagramme de spéciation de la pipérazine **105a** 1,4-di-substituée par la 2-méthyl-3-hydroxypyridinone en milieu H₂O/DMSO 80:20 pour trois équivalents de ligands.

Les interactions de ce ligand avec le Fe(III) ont été mesurées pour deux rapports ligand(s)/Fe(III) différents. Dans une première série de mesures, ce rapport était de 1. Les

résultats de potentiométrie (Figure 57) sont consistants avec la formation du complexe $LFeH^{2+}$ vers $pH = 4,4$. En effet, nous observons bien la perte de deux protons par rapport au ligand seul (différence entre les courbes bleues et oranges à ce pH). Sachant que le ligand à ce pH portait un proton pipérazinique et deux protons phénoliques, nous pouvons envisager la complexation du fer par les deux groupes pyridinones. L'espèce formée perd ensuite un proton entre $pH = 4,4$ et 6. Enfin, le nombre de proton moyen devient négatif, signe d'une hydroxylation. Ceci est en accord avec l'évolution des spectres UV-visible obtenus (Figure 58).

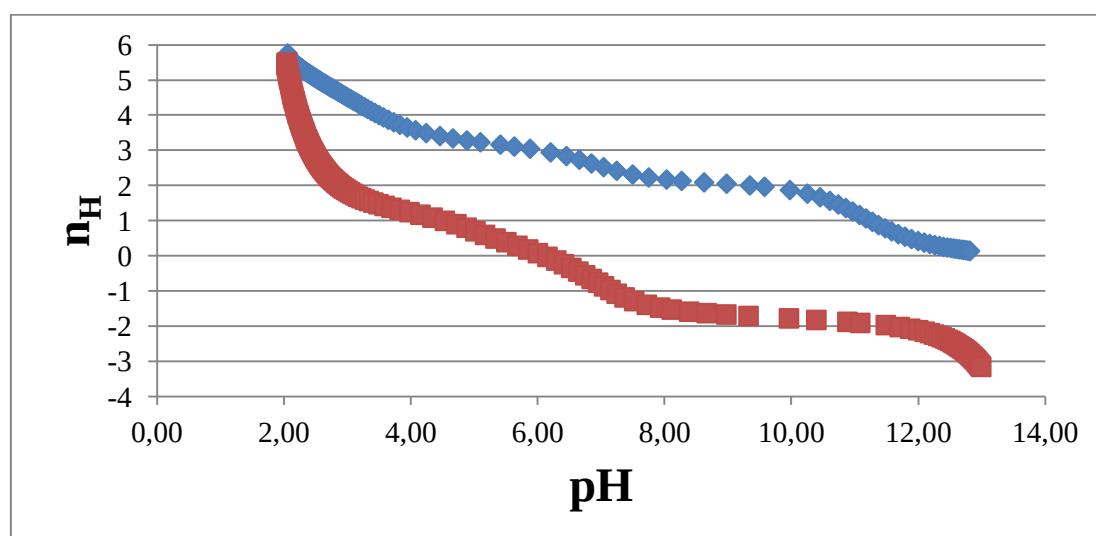


Figure 57. Evolution du nombre de proton moyen par ligand en absence (courbe bleue) ou en présence d'un équivalent de $Fe(III)$ (courbe orange) en milieu $H_2O/DMSO$.

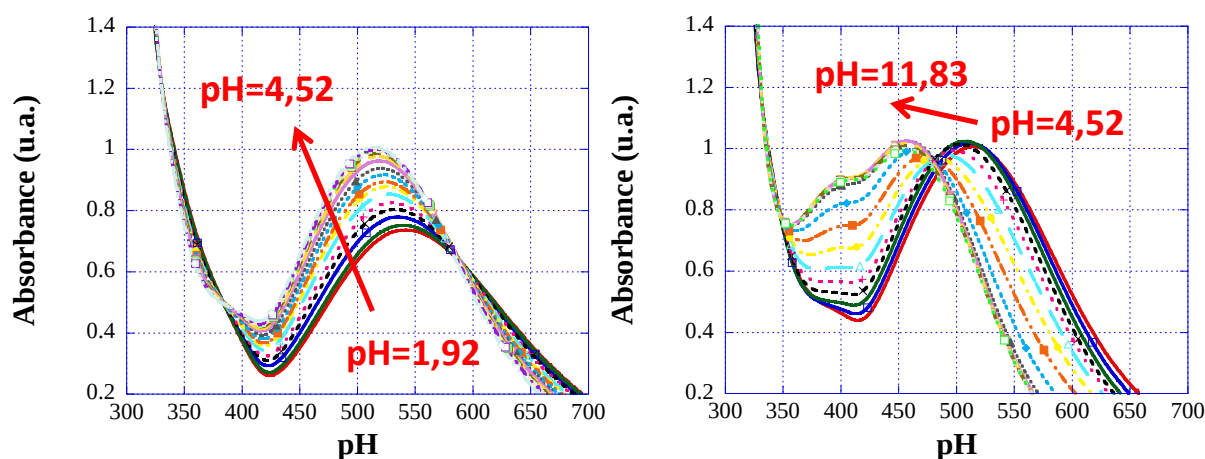


Figure 58. Evolution en fonction du pH des spectres UV-Vis pour une solution de pipérazine **105a** 1,4 disubstituée en présence d'un équivalent de $Fe(III)$ en milieu $H_2O/DMSO$.

D'après ces spectres et en utilisant les données obtenues sur le système déféripone-Fe(III), nous observons qu'à partir de pH avoisinant 2, le Fe(III) est complexé par un groupement hydroxypyridinone (LFeH_3^{4+}). Puis progressivement, entre 2 et 4,5, un point isobestique indique la transformation de cette espèce avec incorporation du second groupement pyridinone. L'utilisation de deux groupements issus de la molécule est le plus favorable (LFeH^{2+}). Pour des pH plus élevés, on voit clairement apparaître la signature d'un complexe tris-hydroxypyridinone L_3Fe_2 . En raison de la stœchiométrie, l'hydroxylation se produit ainsi très probablement en partie sur le complexe et en partie sur du Fe(III) non complexé

Pour une stœchiométrie ligands/Fe(III) 2:1, une évolution différente est détectée en milieu acide à pH = 6, consistant avec la formation du complexe hexacoordonné $\text{Fe}_2(\text{LH})_3^{3+}$. Un proton de chaque pipérazine est alors éliminé pour donner la forme Fe_2L_3 (Figure 59).

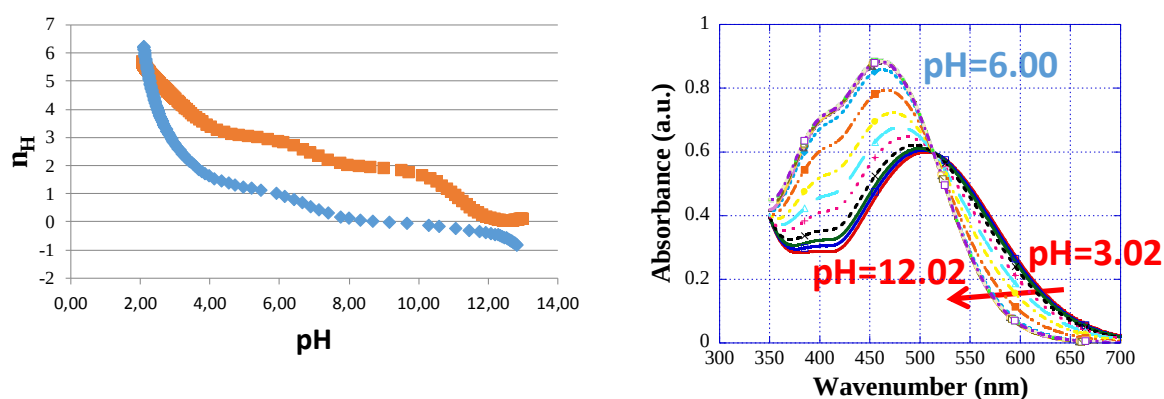


Figure 59. Evolution du nombre de proton moyen par ligand en absence (courbe orange) ou en présence de Fe(III) (courbe bleue ; rapport ligands/Fe = 2) en milieu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ et évolution des spectres UV-visibles des complexes du Fe(III).

Dans cette partie, nous avons montré que l'analogue synthétisé permettait de former des complexes hexacoordonnés avec le Fe(III). Nous n'avons, pour le moment, pas encore obtenu les constantes de complexation. Ces études devront être poursuivies en mettant à profits les mesures que nous avons réalisées sur l'EDTA afin de réaliser des études par compétition. De la même façon, des modèles plus complets pourront être obtenus en prenant en compte l'hydrolyse du Fe(III) dans le milieu mixte $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ utilisé. Néanmoins, les premiers résultats confirment l'intérêt des motifs pyridinones comme ligands du Fe(III) et de l'utilité de les greffer sur des structures pipérazines, analogues de l'AR (Tableau 24).

Tableau 24. Récapitulatif des constantes de complexation préliminaires obtenues avec le Fe(III) déterminées dans un mélange H₂O/DMSO 80:20 pour les trois motifs chélateurs du Fe(III) étudiés.

	Défériprone	Acide kojique 109	Hydroxypyridinone 111
β_{110}	15,15 (1)	10,4 (3)	17,4 (3)
β_{210}	27,85 (1)	20,14 (11)	29,3 (5)
β_{310}	37,62 (1)	28,15 (8)	38,5 (6)

V. Tests biologiques

L'évaluation de l'activité antibiotique des produits synthétisés sur un panel de quatre souches et l'activité « sidérophore-like » sur deux souches de *P. aeruginosa* ont été réalisées au sein du laboratoire, avec l'aide du docteur Catherine DEMAILLY-MULLIE.

A. Souches et protocoles

Pour mesurer la susceptibilité bactérienne envers les complexes au gallium **189** et **190** synthétisés (Figure 45), nous avons utilisé des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* CIP 103.429 et *Enterococcus faecalis* CIP 103.214, et des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* DSM 1103, et *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117. Les différentes souches bactériennes ont été incubées pendant une nuit à 35°C dans un bouillon de soja tryptique et striées sur de l'agar de soja tryptique. Les inocula ont ensuite été préparés selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) et la technique de micro-dilution en milieu liquide Mueller-Hinton (MH, pH 7.3) sans ajout sur une échelle de concentrations allant de 0,25 à 512 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ [111]. Ces concentrations ont été obtenues par dilutions à partir d'une solution mère du produit à tester préparée dans de l'eau. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée visuellement et correspond à la plus basse concentration pour laquelle les puits sont clairs.

L'activité « sidérophore-like » des composés **182** et **105a** (Figure 45) a également été mesurée à l'aide de deux souches de *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et PAD07. PAO1 est utilisée comme souche de référence alors que PAD07 est un double mutant déficient en pyoverdine et en pyochéline, les deux sidérophores endogènes principaux de *P. aeruginosa*. Ces sidérophores possèdent des pFe élevés (pyoverdine pFe = 27, pyochéline pFe = 16) supérieurs à ceux de nos composés. Comme nos composés sont tétradentés, nous avons travaillé en supposant que deux ions ferriques étaient coordonnés à trois molécules de chélateurs **105a** et **182**.

Le milieu utilisé a été le milieu minimum succinate (MMS, pH = 7). Celui-ci correspond à un milieu appauvri en fer et est obtenu en mélangeant une solution à 6,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4 , une solution à 3,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , une solution à 1,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, une solution à 0,2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et une solution à 4,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de succinate de sodium dans de l'eau PPI à pH=7,0. Cette méthode permet de simuler les conditions de développement des

bactéries dans un milieu appauvri en fer. Nos composés ont été évalués sur ce milieu avec addition ou non de FeCl_3 . Pour **182**, la concentration en FeCl_3 a été fixée à 45 μM tandis que la concentration en **182** a été comprise entre 2.11 et 270.00 μM permettant d'obtenir les différents *ratios* entre 0.03125 et 4. Pour **105a**, la concentration en FeCl_3 a été fixée à 77 μM tandis que la concentration en **105a** a été comprise entre 2.40 et 307.00 μM permettant d'obtenir les différents *ratios* entre 0.03125 et 4.

Dans une plaque 96 puits, 5 μL de chaque dilution des produits testés a été répartie avec 5 μL d'eau stérile ou 5 μL d'une solution aqueuse stérile de FeCl_3 . Chaque puits a ensuite été complété avec 220 μL de MMS et 20 μL d'une suspension bactérienne de 0.5 McFarland. Les plaques ont été incubées pendant 24 h à 37 °C. L'absorbance (DO) a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur Multiskan Ex (Thermo Labsystems, Issy les Moulineaux, France) à 600 nm afin d'observer la croissance bactérienne. Les références ont été obtenues en réalisant des puits contenant le milieu et la molécule, sans inoculum, afin de mesurer l'absorbance de nos composés à 600 nm. Des contrôles, contenant les souches bactériennes dans du MMS, sans sidérophore et supplémenté ou non en Fe(III) , ont également été réalisés. Les expériences ont été répétées six fois.

B.Evaluation antibactérienne

Les molécules évaluées correspondent à la pipérazine **105a** 1,4 disubstituée par des motifs hydroxypyridinones, à la dioxopipérazine **182** (3*S*,6*S*)-disubstituée par des catéchols et aux complexes de gallium **189** et **190** (Figure 45).

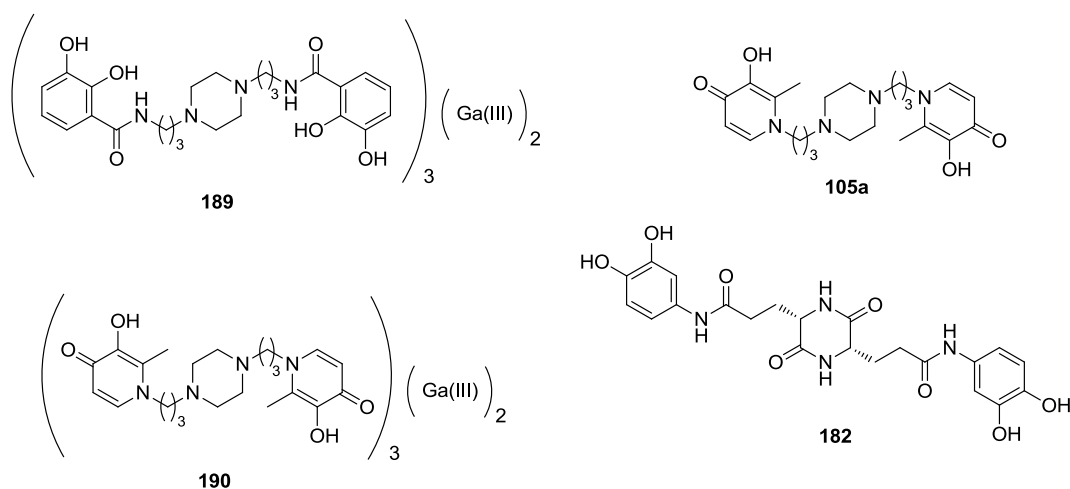


Figure 60. Structure des molécules testées

1. Evaluation antibactérienne des complexes au gallium

Si les sidérophores qui permettent de former les complexes au gallium **189** et **190** sont reconnus par les bactéries, ils devraient posséder un pouvoir bactéricide. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 25 suivant.

Tableau 25. Résultats des tests antibactériens des complexes au gallium **189** et **190** réalisés sur différentes souches.

Essais	Composés	CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)			
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
		MH	MH	MH	MH
1	189	256	>512	256	256
2	190	256	>512	256	256
	Ciprofloxacin	0,5	0,25	4	4

Les complexes se sont révélés être faiblement bactéricides puisqu'ils n'ont démontré que des CMI supérieures ou égales à $256 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Toutefois, lors de travaux antérieurs effectués au sein de notre laboratoire, l'efficacité de conjugués sidérophore-antibiotique a été

fortement dépendante du milieu de culture (MMS ou MH). Dans un milieu appauvri en fer, le pouvoir bactéricide de ces composés s'est révélé être supérieur à celui mesuré dans un milieu riche en Fer(III).

2. Evaluation antibactérienne des pipérazines 105a et 182 disubstituées par des chélateurs du fer

Ces tests ont pour objectif de confirmer que nos composés ne possèdent pas d'action inhibitrice intrinsèque sur la croissance bactérienne. Les résultats obtenus pour les pipérazines **105a** et **182** sont reportés dans le tableau 26. Ces composés ont été synthétisés dans le but d'obtenir des analogues de sidérophores, qui devraient être en mesure de favoriser la croissance bactérienne.

Tableau 26. Résultats des tests antibactériens réalisés sur différentes souches.

Essais	Composés	CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)			
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
		MH	MH	MH	MH
1	105a	>512	>512	>512	>512
2	182	>512	>512	>512	>512
3	Ciprofloxacine	0,5	0,25	4	4

Les résultats obtenus indiquent bien que nos composés ne possèdent pas d'action intrinsèque sur la croissance bactérienne puisque les CMI mesurées sont supérieures à 512 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

C. Mesure de l'activité « siderophore-like »

Ne disposant pas au laboratoire de souches mutantes d'*E. coli* et *A. baumannii* déficientes en production de leur sidérophore endogène, nous avons réalisé l'activité sidérophore-like de nos composés sur des souches sauvages et mutantes de *P. aeruginosa*.

Pour nos composés **105a** et **182**, nous avons supposé qu'ils conduisaient à la formation d'un complexe de stœchiométrie Fe(III)/L de 2:3. La complexation du Fe(III) présent dans le milieu sera totale pour un *ratio* supérieur ou égal à 1,5. Le fer ne sera alors accessible aux bactéries que si elles parviennent à reconnaître le composé comme sidérophore. Si elles ne parviennent pas à accéder au fer car elles ne peuvent pas reconnaître notre sidérophore artificiel, nous devrions observer une chute de la croissance bactérienne.

a. Tests réalisés sur le composé **182**

Dans un premier temps, la molécule **182** a été testée sur la souche PAO1. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 61. Sur ce graphique, la croissance bactérienne en absence de Fe(III) (courbe bleue) est significativement inférieure à la croissance bactérienne en présence de Fe(III) (courbe rouge). Lorsque notre sidérophore artificiel est présent (courbe verte), la croissance bactérienne est naturellement supérieure à la croissance en absence de fer pour un *ratio* [**182**]/[Fe(III)] inférieur à 1,5 puisque la totalité du fer n'est pas chélatée. Quand ce *ratio* est supérieur à 1,5, la totalité du fer est séquestrée. Cependant une croissance bactérienne significativement aussi importante qu'en présence de Fe(III) seul est observée.

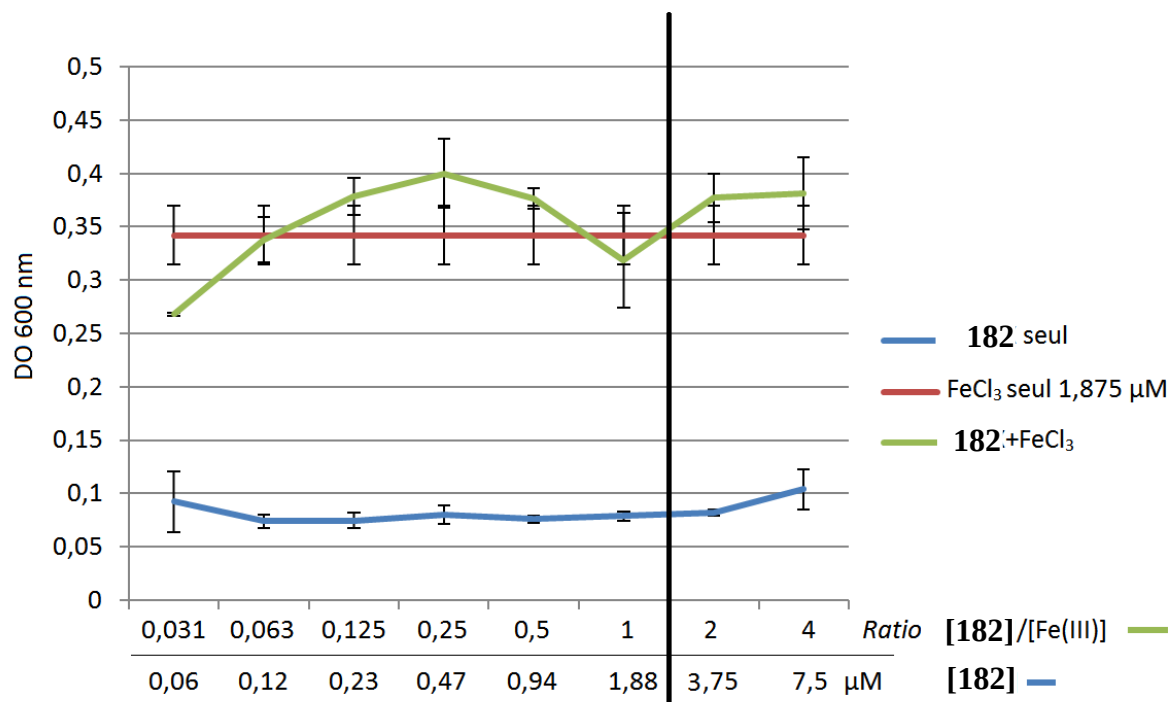


Figure 61. Représentation de la densité optique en fonction du *ratio* [182]/[Fe(III)] pour la souche PAO1.

Cette souche produisant ses sidérophores, des échanges métalliques ont pu avoir lieu entre notre sidérophore et ceux produits par *P. aeruginosa*. Afin de limiter cette possibilité, nous avons donc effectué un second test sur la souche PAD07, déficiente en pyoverdine et pyochéline, ses sidérophores endogènes. Les résultats sont représentés dans la figure 62. Comme précédemment, sur ce graphique, la croissance bactérienne en absence de Fe(III) (courbe bleue) est significativement inférieure à la croissance bactérienne en présence de Fe(III) (courbe rouge). Lorsque le *ratio* [182]/[Fe(III)] est supérieur à 1,5, la totalité du fer est séquestrée. Cependant une croissance bactérienne significativement aussi importante qu'en présence de Fe(III) seul est observée (courbe verte).

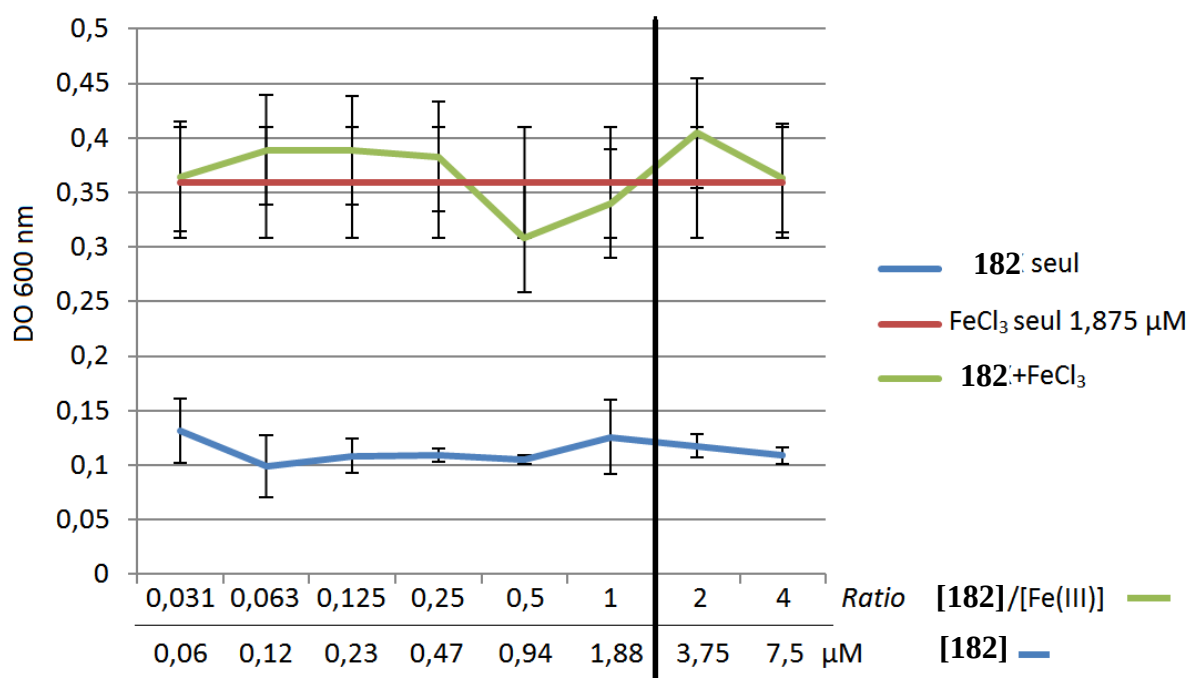


Figure 62. Représentation de la densité optique en fonction du *ratio* [182]/[Fe(III)] pour la souche PAD07.

Ces données laissent supposer que le composé **182** est reconnu par cette souche, la probabilité que des échanges métalliques entre notre sidérophore et des sidérophores produits par PAD07 étant limitée puisque cette souche est incapable de synthétiser ses sidérophores endogènes.

b. Tests réalisés sur le composé 105a

Ce composé a été synthétisé par Marine Pillon au cours de ces travaux de thèse. Afin de poursuivre ces travaux, nous avons décidé de tester ce composé. Dans un premier temps, la molécule **105a** a été testée sur la souche PAO1. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 63. Lorsque le *ratio* [105a]/[Fe(III)] est supérieur à 1,5, nous pouvons observer que la croissance bactérienne est toujours significativement supérieure à la croissance en absence de Fe(III). Il pourrait donc y avoir une reconnaissance de **105a** par les récepteurs aux sidérophores de cette souche.

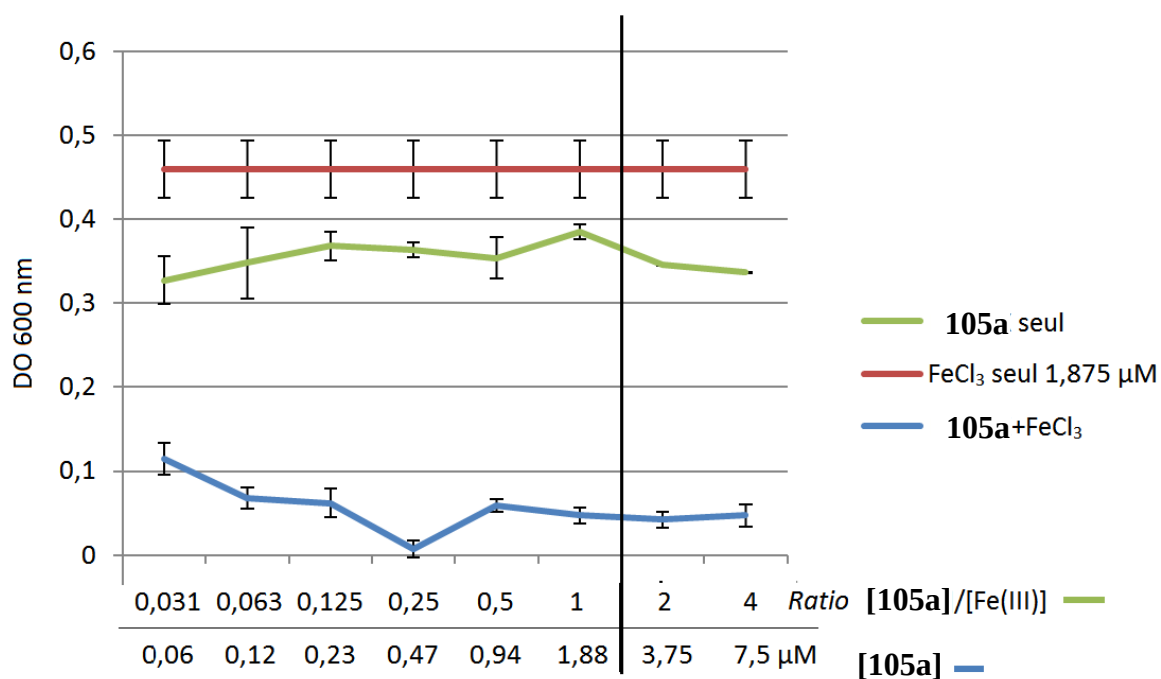


Figure 63. Représentation de la densité optique en fonction du *ratio* [105a]/[Fe(III)] pour la souche PAO1.

Ces résultats étant prometteurs, nous avons donc effectué un second test sur la souche PAD07, déficiente en pyoverdine et pyochéline. Les résultats sont représentés dans la figure 64 suivante. Lorsque le *ratio* [105a]/[Fe(III)] est supérieur à 1,5, nous pouvons observer que la croissance bactérienne est toujours significativement supérieure à la croissance en absence de Fe(III). Il pourrait donc y avoir une reconnaissance de **105a** par les récepteurs aux sidérophores de cette souche, la probabilité que des échanges métalliques entre sidérophores aient eu lieu étant plus faible puisque la souche PAD07 est déficiente en pyochéline et pyoverdine.

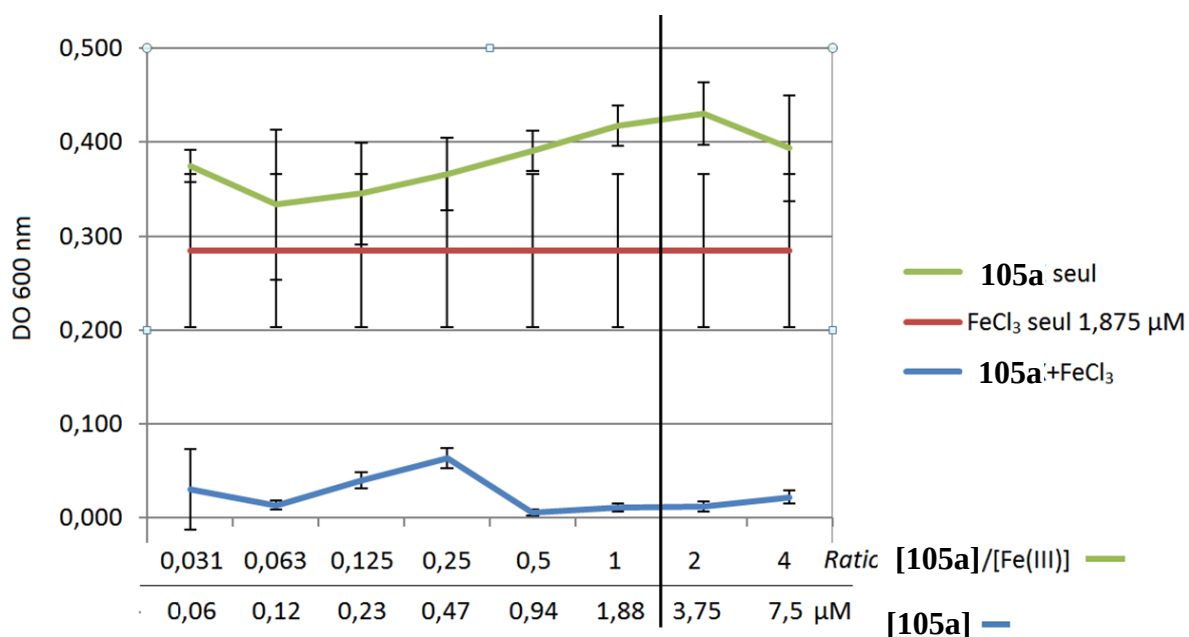


Figure 64. Représentation de la densité optique en fonction du *ratio* [105a]/[Fe(III)] pour la souche PAD07.

Pour conclure, les complexes au gallium **189** et **190** ont une faible activité bactéricide dans des milieux non-appauvris en fer. Des tests complémentaires dans le milieu minimum succinate nous permettront de savoir s'il s'agit d'un problème de reconnaissance ou si ces composés sont plus actifs dans des milieux appauvris en fer. Les tests « sidérophore-like » ont mis en évidence des résultats prometteurs. En effet, les molécules **105a** et **182** sont potentiellement reconnues par *P. aeruginosa*. Afin de confirmer ces résultats, la synthèse de composés analogues possédant une sonde fluorescente est envisagée.

Conclusion et perspectives

De par leurs besoins en fer, et la faible solubilité du fer ferrique dans les milieux aérobies, les micro-organismes ont développé des stratégies originales pour acquérir ce métal présent chez leur hôte sous différentes formes. Les bactéries biosynthétisent et sécrètent notamment des chélateurs du fer ferrique multidentés nommés sidérophores. Ces complexants du fer parviennent à entrer en compétition avec les protéines contenant du fer pour le leur soutirer. Les complexes sidérophore-Fe(III) ainsi formés sont reconnus par des récepteurs spécifiques et transportés activement jusqu'au périplasme ou au cytoplasme. La vectorisation d'antibiotiques ou d'ion gallium au travers de ces voies a été démontré grâce à la formation de conjugués sidérophore-antibiotique ou de complexes sidérophore-Ga(III).

L'objectif de cette thèse était de synthétiser l'**AR** ainsi que des analogues dioxopipéraziniques 3,6-disubstitués et pipéraziniques 1,4-disubstitués. L'étude des propriétés physico-chimiques de ces composés avait pour objectif de mettre en exergue un ou plusieurs complexants du fer possédant une forte affinité pour le Fe(III). Ces complexants devaient ensuite être couplés à un antibiotique ou complexés à du gallium pour mesurer leurs propriétés antibactériennes.

L'**AR**, produit par *Rhodotorula pilimanae*, est une dioxopipérazine (3S,6S)-disubstituée par des fonctions chélatrices du fer de type hydroxamate. La stéréochimie de ce composé joue un rôle crucial dans sa reconnaissance par ses récepteurs spécifiques. Nous souhaitons réaliser une synthèse originale et convergente pour obtenir l'**AR** mais également des analogues dioxopipéraziniques énantiomériquement purs 3,6-disubstitués par des ligands du fer. L'objectif était alors de pouvoir étudier l'influence sur la complexation: i) de la nature des ligands du fer, ii) de la stéréochimie des composés, iii) de la longueur des chaînes portant les fonctions chélatrices du fer.

La synthèse asymétrique de pipérazines 3,6-disubstituées nécessite un nombre d'étapes important et implique une ou plusieurs étapes délicates d'induction asymétrique. Nous avons souhaité, dans un premier temps, obtenir des 1,4-disubstituées par des chélateurs du fer qui possèdent une haute affinité pour le fer ferrique pour étudier leurs propriétés

physico-chimiques et complexantes afin de sélectionner les meilleurs motifs à greffer, par la suite, pour former des pipérazines 3,6-disubstituées.

Deux pipérazines 1,4-disubstituées, **114** et **120** ont été obtenues avec les fonctions chélatrice protégées (Figure 78). L'acquisition récente d'un réacteur à hydrogénolyse permettant de faire varier la pression en dihydrogène devrait nous permettre de pouvoir obtenir les pipérazines 1,4-disubstituées par des fonctions hydroxypyridinones (**105c**) ou par des fonctions hydroxamates (**105d**).

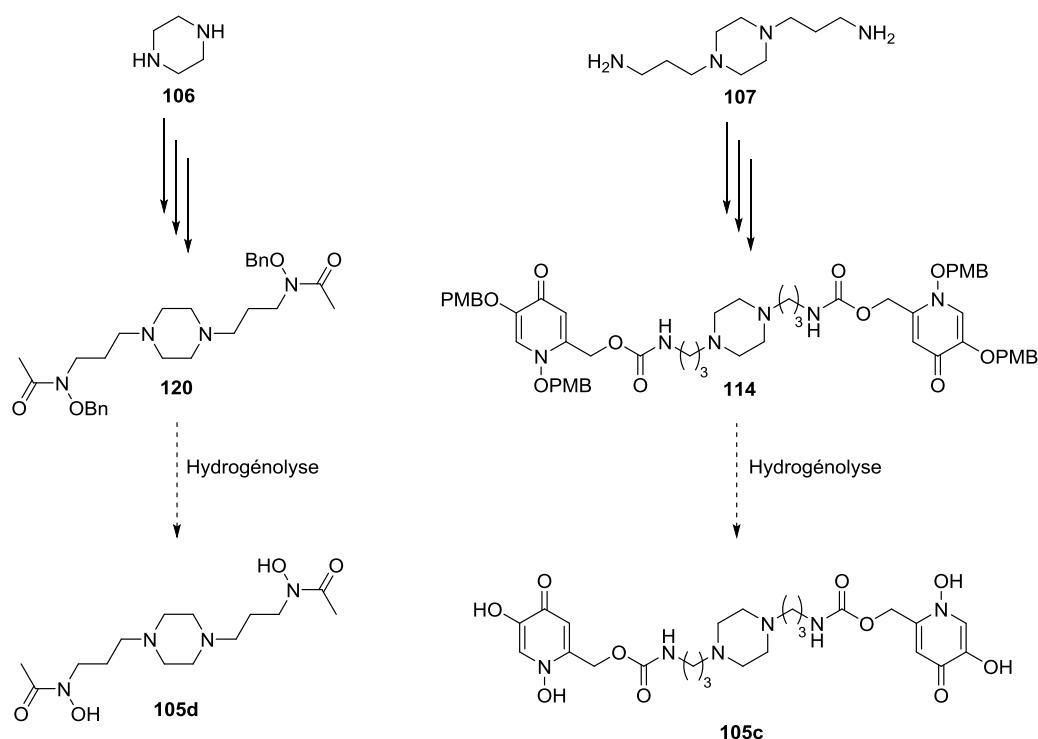


Schéma 78. Récapitulatif des synthèses de pipérazines 1,4-disubstituées

Toutefois l'objectif principal de cette thèse était la synthèse asymétrique de l'**AR** et d'analogues dioxopipéraziniques 3,6-disubstitués par des ligands du fer. Deux voies ont été étudiées : i) la voie A reposant sur l'alkylation stéréosélective de dioxopipérazines portant des copules chirales et ii) la voie B permettant la synthèse de dioxopipérazines à partir d'acides aminés tels que l'ornithine ou la glutamine. Les résultats obtenus pour la voie A sont résumés dans le schéma 79.

La voie A₁ a permis de mettre en place la réaction d'alkylation stéréosélective en présence de bromure de benzyle ou de bromure d'allyle avec des rendements respectifs de 64% et 53% ainsi que des excès diastéréoisomériques de 63% et 70%. Les études continuent pour parvenir à déprotéger la seconde copule chirale. Par la suite, la seconde alkylation pourra être réalisée conduisant à l'**AR** et ses analogues 3,6-disubstitués, après fonctionnalisation des allyles et clivage des copules. Le principal intérêt de cette voie réside dans sa capacité à conduire à des analogues portant deux groupements chélateurs du fer différents, permettant ainsi d'accéder à de nouveaux composés.

La voie A₂ nous a permis de réaliser l'étape de di-alkylation avec un excellent excès diastéréoisomérique supérieur à 95%. La fonctionnalisation des groupements allyles en hydroxamates a fourni la dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** avec un rendement global de 2%. Malheureusement, nous ne sommes jamais parvenus à cliver les copules chirales à l'aide d'une hydrogénolyse pallado-catalysée. Toutefois, la réalisation de la réduction de Birch sur la dioxopipérazine **157-(1S,3S,4S,6S)**, nous laisse penser que l'application de ce protocole sur la dioxopipérazine **154a-(1S,3S,4S,6S)** pourrait nous permettre d'obtenir l'**AR**.

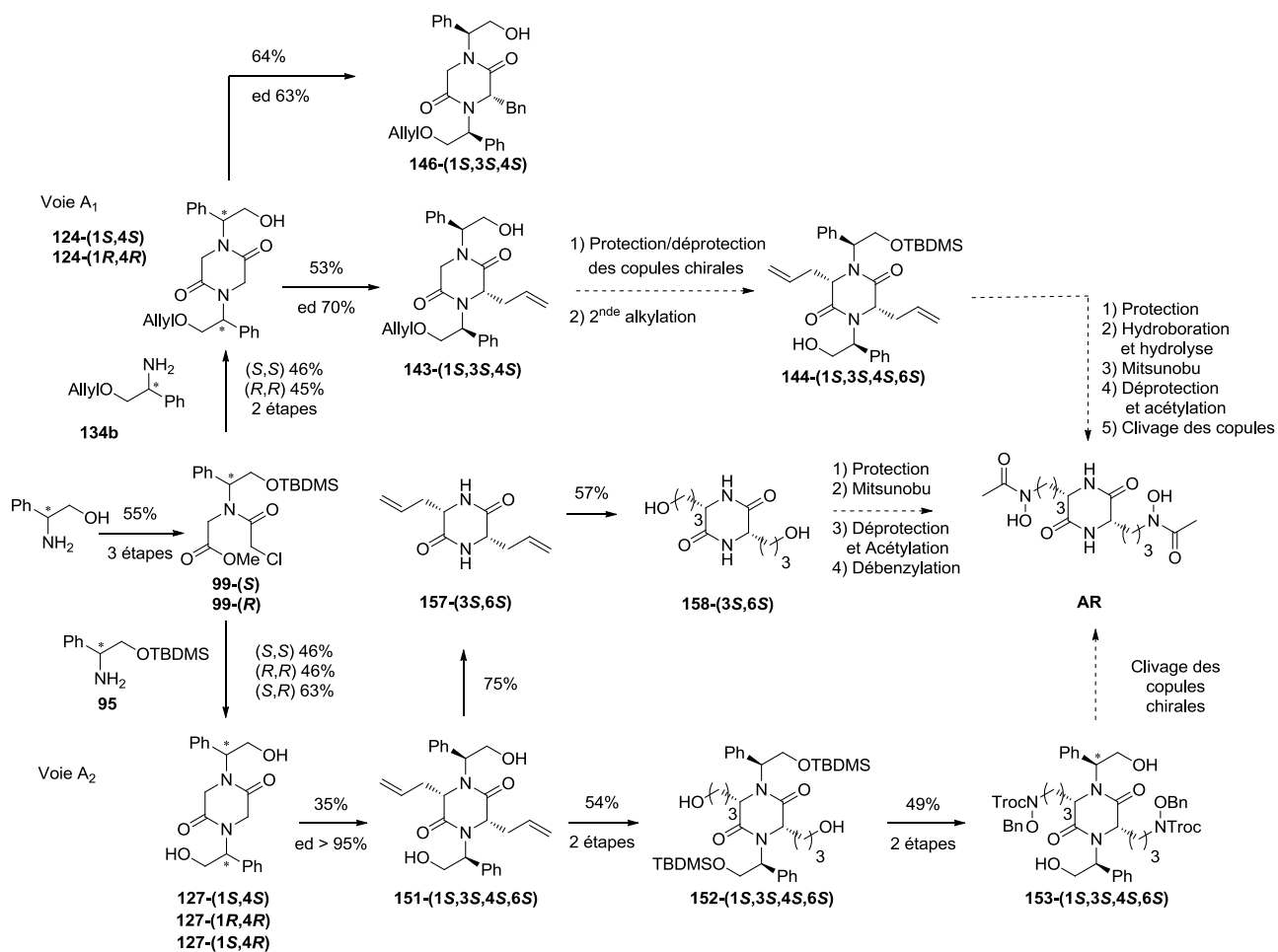


Schéma 79. Récapitulatif des résultats obtenus pour la synthèse de l'AR par la voie A.

La voie B₁ nous a permis de synthétiser les ornithines estérifiées **130a-(S)** et **130b-(S)**. Malgré de nombreux essais, nous ne sommes pas parvenus à obtenir la fonction hydroxylamine désirée et nécessaire pour la suite de la synthèse. D'autres méthodes, telles que l'oxydation d'imines, devraient nous permettre d'obtenir l'hydroxy-ornithine désirée. Par la suite deux couplages peptidiques successifs devraient former le cycle dioxopipérazinique puis la déprotection des amines, leur acétylation et une étape de débenzylation pourront fournir l'AR.

Grace à la voie B₂, le diol **163-(3S,6S)** a pu être synthétisé en 5 étapes, avec un rendement global de 10% et un excès diastéréoisomérique supérieur à 95%. La protection des fonctions amides du cycle dioxopipérazinique nous a permis de contourner les problèmes de solubilité rencontrés avec le diol **158-(3S,6S)**. Une réaction de Mitsunobu, suivie de l'acétylation des amines introduites et du clivage des groupements Boc devrait nous permettre de synthétiser l'AR. Par ailleurs, nous sommes parvenus à obtenir un analogue de l'AR

portant deux fonctions catéchols **182-(3S,6S)**. Le même schéma de synthèse sera appliqué afin d'obtenir l'analogue **184-(3S,6S)** portant deux fonctions hydroxypyridinones.

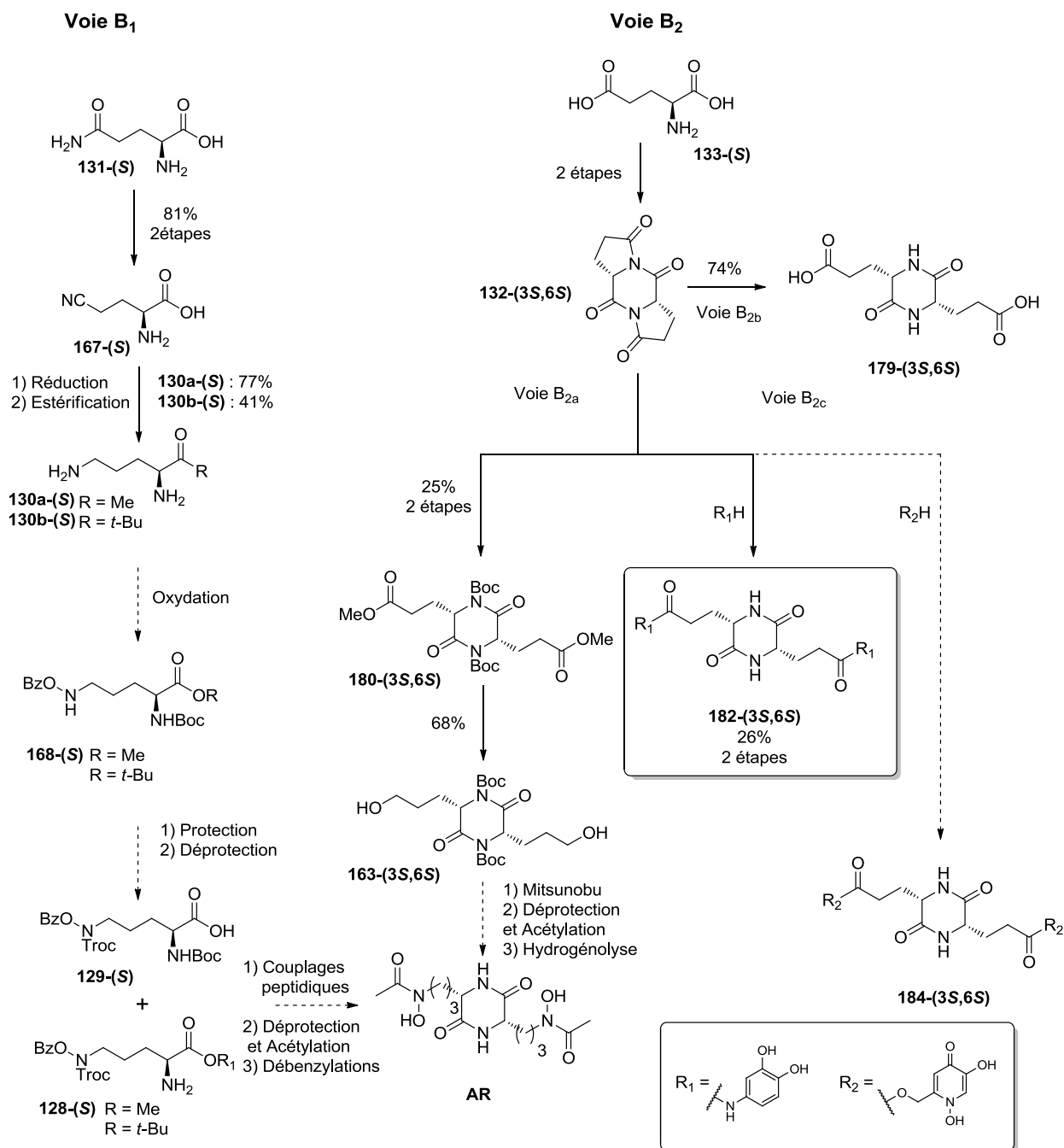


Schéma 80. Récapitulatif des résultats obtenus pour la synthèse de l'AR par les voies B₁ et B₂.

Des tests antibactériens ont été réalisés sur les complexants du fer **105a** et **182** ainsi que sur les complexes sidérophore-Ga(III) **189** et **190**. Les analogues de sidérophore n'ont pas révélé d'activité antibactérienne comme nous le supposions. En revanche, les complexes au gallium se sont révélés légèrement actifs, avec des CMI de $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur les souches de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Enfin les tests « sidérophores-like » effectués au sein du laboratoire ont été réalisés sur deux souches *Pseudomonas aeruginosa* : PAO1, une souche produisant ses sidérophores endogènes (pyoverdine et pyochéline), et PAD07, une souche incapable de produire ces sidérophores. Les résultats obtenus nous laissent supposer que les analogues de sidérophore **105a** et **182** pourraient être reconnus et internalisés par *Pseudomonas aeruginosa*. Ces composés pourraient alors être intéressants pour la vectorisation d'antibiotiques grâce à la stratégie du « Cheval de Troie ».

Au cours de ces travaux, nous avons pu observer l'intérêt général de l'utilisation des sidérophores dans la lutte contre la résistance bactérienne. La poursuite de ce sujet de recherche devrait permettre d'obtenir rapidement l'**AR** et des analogues 3,6-disubstitués. Par la suite ces composés pourront être utilisés afin de former des conjugués sidérophore-antibiotique dont l'activité antibactérienne pourra être étudiée.

Partie expérimentale

1. Généralités et appareillages

Purification des solvants et des réactifs

Les réactions chimiques ont été réalisées sous atmosphère inerte sous azote ou argon, dans des conditions anhydres lorsque ces conditions se sont montrées impératives. Les solvants anhydres utilisés sont les suivants :

- THF distillé sur sodium en présence de benzophénone ou séché sur un sécheur de solvant (Pure Solv-Innovative Technology PS-MD-5 de chez Serlabo Technologies)
- DCM, DMF, MeCN, MeOH séché sur un sécheur de solvant (Pure Solv-Innovative Technology PS-MD-5 de chez Serlabo Technologies),
- Et₂O distillé sur sodium en présence de benzophénone.

Les différents produits réactionnels ont été achetés chez Acros, Sigma-Aldrich et VWR et ont été utilisés sans purifications additionnelles.

Chromatographie

Les CCM ont été réalisées sur plaques de silice Merck 60F₂₅₄, observées sous ultraviolet ($\lambda = 254$ nm) avant d'être révélées chimiquement par une solution d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol à 95 % suivi d'un chauffage jusqu'à coloration maximale.

Les chromatographies préparatives sur colonne ont été réalisées par la technique chromatographique sur gel de silice Kielselgel 60 (40-63 μ m) et par chromatographie flash en utilisant l'appareil Grace Reveleris[®].

Les analyses par Spectroscopie de Masse (SM) ont été faites sur un spectromètre Shimadzu LCMS-2020.

Les analyses par Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR) ont été réalisées sur un appareil haute résolution Micromass-Waters Q-TOF Ultima en mode d'ionisation électrospray positif.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire ont été obtenus sur des appareils RMN Bruker 600 MHz (^1H RMN à 600 MHz et ^{13}C RMN à 150 MHz) et RMN Bruker 400 MHz (^1H RMN à 400 MHz et ^{13}C RMN à 100 MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (δ , ppm) par rapport au solvant deutéré utilisé comme référence interne. L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C est donnée en spécifiant le déplacement chimique, la multiplicité (s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quin = quintuplet, m = multiplet, sl = singulet large), l'intégration et la constante de couplage (J) en Hertz (Hz).

L'attribution des protons et des carbones a été faite après analyse RMN 2D (HMBC, HSQCQ, COSY).

Infra-Rouge (IR)

Les spectres infrarouge (IR) ont été enregistrés sur un spectrophotomètre FT/IR-4200 Jasco muni d'un système ATR-Golden gate permettant une analyse des solides et des liquides et sont reportés en utilisant le nombre d'onde (cm^{-1}).

Température de fusion (T_f)

Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil Stuart SMP3.

Pouvoirs rotatoires ($[\alpha]_D^T$)

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Jasco P-1010.

2. Méthodes Générales

2.1 Protection d'un alcool sous forme d'éther de silyle

A une solution d'alcool (1 éq) dans du DCM anhydre (0,91 M) est ajouté de l'imidazole (1,1 éq) et du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (1,1 éq). Le milieu réactionnel est agité à 20°C pendant 18 heures. Puis le mélange est neutralisé par une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium. La phase aqueuse est extraite par trois fois avec du DCM.

Les phases organiques sont réunies et lavées par de l'eau puis séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au produit souhaité.

2.2 Protection d'une fonction alcool par un groupement PMB

A une solution d'alcool dans la NMP (0,11 M), est ajouté du K_2CO_3 (1,2 éq) puis du bromure de PMB (1,2 éq) goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité goutte à goutte pendant 16 h à 20 °C. De l'eau distillée est ajoutée et la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu brut est purifié par une colonne chromatographique afin d'obtenir le produit souhaité.

2.3 Fermeture du cycle dioxopipérazine

A une solution de chloracétamide (1 éq) et de NEt_3 (3,0 éq) dans du MeOH (0,85 M) est ajouté l'amine (1,2 éq). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 3 jours puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu brut est purifié par une colonne chromatographique afin d'obtenir le produit souhaité.

2.4 Protection d'une fonction amine par le groupement Boc

A une solution d'amine (1 éq) dans du MeOH anhydre (0,57 M), à 0°C, est ajouté du dicarbonate de di-*tert*-butyle (1 éq). Le milieu est agité à 20°C pendant 17 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par de l'éther diéthylique. Le solide obtenu est filtré et le filtrat est lavé par trois fois avec une solution d'acide citrique à 5%. Les phases aqueuses sont rassemblées et alcalinisées à pH = 9 par ajout d'une solution aqueuse de NaOH à 50% et sont extraites par quatre fois avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au produit souhaité.

2.5 Protection d'une fonction amine par le groupement Troc

A une solution d'amine (1 éq) et de NaHCO_3 dans un mélange THF/Eau 1:1 (0,46 M), à 0°C, est ajouté, goutte à goutte, du chloroformate de 2,2,2-trichloroéthyle (1,2 éq). Le milieu est agité à 20°C pendant 17 heures. La phase aqueuse est extraite par trois fois à l'AcOEt et les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% puis séchées sur Na_2SO_4 . Le solvant est évaporé sous pression réduite afin d'obtenir le produit souhaité.

2.6 Déprotection d'une fonction alcool protégée par un groupement PMB

A une solution d'alcool protégé par un groupement PMB (1 éq) dans du MeOH (0,013 M) est ajouté du Pd/C (10% à 50% mol) sous atmosphère d'hydrogène. Le milieu réactionnel est agité à 20°C pendant 7-24h. Le milieu réactionnel est filtrée sur papier filtre, puis le filtrat est évaporé sous pression réduite pour conduire au produit souhaité.

2.7 Déprotection d'une fonction alcool protégée par un groupement silyle

A une solution d'alcool protégé (1 éq) dans du DCM (0,12 M) est ajouté du TBAF (2 éq). Le milieu réactionnel est agité à 20°C pendant 17 heures. De l'eau est ajoutée et le milieu est extrait par trois fois avec du DCM. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée sous pression réduite.

2.8 Réaction d'alkylation en α d'une fonction carbonyle

A une solution de dioxopipérazine (1 éq) dans du THF (0,08 M) à -78°C est ajoutée une solution de LiHMDS (3 éq) dans du THF (0,1 M). Le milieu est agité à -10 °C pendant 1 heure puis le mélange est refroidi à -78°C. L'électrophile (5 éq) dans du THF (1,75 M) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité à -78°C pendant 2-6 heures. Le milieu est neutralisé par ajout d'une solution aqueuse saturée de NH_4Cl . La phase aqueuse est extraite par trois fois avec du DCM. Les phases organiques sont réunies et lavées par trois fois avec de l'eau, séchées sur Na_2SO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu brut est purifié par une colonne chromatographique afin d'obtenir le produit souhaité.

2.9 Réaction de dialkylation en α d'une fonction carbonyle

A une solution de dioxopipérazine (1 éq) et de HMPA (5 éq) dans du THF (0,08 M) à -78°C est ajoutée une solution de LiHMDS (5 éq) dans du THF (0,1 M). Le milieu est agité à -10 °C pendant 1 heure puis le mélange est refroidi à -78°C. L'électrophile (5 éq) dans du THF (1,75 M) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité à -78°C pendant 2-6 heures. Le milieu est neutralisé par ajout d'une solution aqueuse saturée de NH₄Cl. La phase aqueuse est extraite par trois fois avec du DCM. Les phases organiques sont réunies et lavées par trois fois avec de l'eau, séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu brut est purifié par une colonne chromatographique pour conduire au produit souhaité.

2.10 Déprotection d'une fonction amine par le groupement Boc

A une solution d'amine protégée par un groupement Boc (1 éq) dans de l'acétonitrile anhydre (0,05 M), à 0°C, a été ajoutée du HCl (10 éq) en solution dans du dioxane (4 M). Le milieu réactionnel a été agité à 20°C pendant 1h30. Le solvant a été évaporé sous pression réduite afin d'obtenir le produit souhaité.

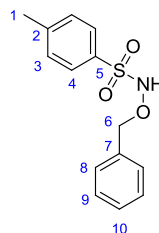
2.11 Déprotection d'une fonction amine par le groupement Troc et acétylation de l'amine formée

A une solution d'amine protégée par un groupement Troc (1 éq) dans de l'acide acétique (0,29 M), à 0°C, est ajouté de l'anhydride acétique (2 éq) et du zinc en poudre (15 éq). Le milieu est agité à 20°C pendant 24 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par de l'AcOEt. Le solide obtenu est filtré et le filtrat est lavé par trois fois avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé. Le résidu brut obtenu est purifié par une colonne chromatographique pour conduire au produit souhaité.

***N*-(benzyloxy)-4-méthylbenzènesulfonamide (2)**

$C_{14}H_{15}NO_3S$

Masse molaire : 277,34 g.mol⁻¹



A une solution réfrigérée de *O*-benzylhydroxylamine (1,00 g, 8,12 mmol) dans la pyridine (2,0 ml) est ajoutée lentement une solution de chlorure de *p*-toluènesulfonyl (1,540 g, 8,12 mmol) dans la pyridine (2 ml). Le milieu réactionnel est agité 2 heures à 20°C et laissé au repos pendant une nuit. Ensuite, de l'acétate d'éthyle est ajouté au milieu et un précipité blanc est apparu. Le précipité est filtré et le filtrat obtenu est extrait avec une solution d'acide chlorhydrique à 2N puis par de l'eau. La phase organique est séchée avec du sulfate de sodium et évaporée sous vide pour donner le produit **2** sous la forme d'un solide blanc et avec un rendement de 79% (1.78 g).

$T_f = 93\text{ }^{\circ}\text{C}$

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H₄), 7.39 – 7.32 (m, 7H, H_{3,8,9,10}), 4.97 (s, 2H, H₆), 2.44 (s, 3H, H₁).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 144,8 (C₅), 135,2 (C₇), 133,6 (C₂), 129,7 (C₉), 129,2 (C₄), 128,6 (C₃), 128,5 (C₁₀), 128,4 (C₈), 79,3 (C₆), 21,6 (C₁).

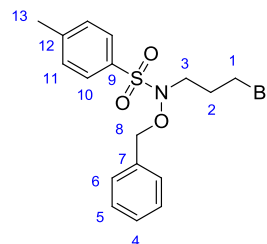
IR $\nu_{\text{max}} = 3221, 1325, 1157, 1017, 809, 693\text{ cm}^{-1}$

SMHR (ESI⁺) m/z : calculé pour C₁₄H₁₅NO₃SNa [M+Na]⁺ 300,0670, trouvé 300,0659.

***N*-(benzyloxy)-*N*-(3-bromopropyl)-4-méthylbenzènesulfonamide (3)**

C₁₇H₂₀BrNO₃S

Masse molaire : 398,31 g.mol⁻¹



A du 1,3-dibromopropane (0.68 mL, 6.70 mmol, 10 éq) dans du DMF (2 mL) sont ajoutés une solution de sulfonamide **2** (0.186 g, 0.67 mmol, 1 éq) dans du DMF (1 mL) et du carbonate de césium (0.684 g, 2.10 mmol, 3 éq). Après 4 h d'agitation à 20 °C, de l'acétate d'éthyle est ajouté puis la phase organique est lavée avec une solution d'acide chlorhydrique 2 M puis avec de l'eau distillée et enfin séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié sur colonne chromatographique (cyclohexane/acétate d'éthyle 9:1) pour donner le bromocarbamate **3** (0.168 g, 63%) sous la forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H₁₀), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₆), 7.46 – 7.33 (m, 5H, H_{4,5,11}), 5.04 (s, 2H, H₈), 3.52 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₁), 2.99 (m, 2H, H₃), 2.42 (s, 3H, H₁₃), 2.00 (quin, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₂).

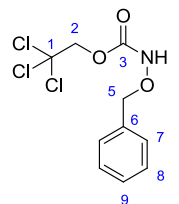
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 141.7 (C₁₂), 138.4 (C₇), 135.4 (C₉), 129.4 (C₁₁), 128.9 (C₅), 127.9 (C₁₀), 127.5 (C₆), 127.1 (C₄), 75.2 (C₈), 49.2 (C₃), 31.8 (C₁), 31.0 (C₂), 21.6 (C₁₃).

SM (ESI⁺) 398, 400 [M+H]⁺

Benzyloxycarbamate de 2,2,2-trichloroéthyle (35)

$C_{10}H_{10}Cl_3NO_3$

Masse molaire : 298.55 g.mol⁻¹



Le composé est obtenu à partir de la *O*-benzylhydroxylamine commerciale **1** (1.0 g, 8.12 mmol, 1.0 éq) sous la forme d'un solide blanc, selon la méthode générale de protection d'une fonction amine par un groupement Troc (Méthode 2.5) (2.317 g, 95%).

$T_f = 79\text{ }^{\circ}\text{C}$

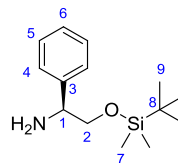
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 – 7.36 (m, 5H, H_{7,8,9}), 4.95 (s, 2H, H₂), 4.82 (s, 2H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 155.2 (C₃), 134.9 (C₆), 129.3 (C₈), 128.9 (C₉), 128.6 (C₇), 94.9 (C₁), 78.9 (C₅), 74.7 (C₂).

IR $\nu_{\max}$ = 1778, 1663, 1422, 1098 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 298, 300 [M+H]⁺

(1S)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthanamine (95-(S))



C₁₄H₂₅NOSi

Masse molaire : 251.44 g.mol⁻¹

Le composé **95-(S)** est obtenu à partir du S-phénylglycinol commercial (10.00 g, 72.9 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de protection d'une fonction alcool sous forme d'éther silylé (Méthode 2.1) avec un rendement de 98% (huile jaune, 17.96 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.22 (m, 5H, H₄₋₆), 4.14 (dd, *J* = 8.1, 4.1 Hz, 1H, H₁), 3.80 (dd, *J* = 9.9, 4.1 Hz, 1H, H₂), 3.63 (dd, *J* = 9.9, 8.1 Hz, 1H, H₂), 0.93 (s, 9H, H₉), 0.02 (s, 6H, H₇).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 142.6 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 127.0 (C_{Ar}), 69.5 (C₂), 57.6 (C₁), 30.4 (C₈), 25.9 (C₉), -5.4 (C₇).

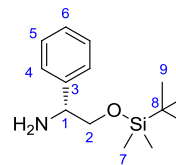
IR ν_{max} = 3045, 2953, 1466, 1253, 1085 cm⁻¹

SM (ESI⁺) m/z : calculé pour C₁₄H₂₆NOSi [M+H]⁺ 252,1784 , trouvé 252,1784.

[α]_D²⁰ = +16 (c 0,22 AcOEt)

(1*R*)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthamine) (95-(*R*))

C₁₄H₂₅NOSi



Masse molaire : 251.44 g.mol⁻¹

Le composé **95-(*R*)** est obtenu à partir du *R*-phénylglycinol commercial (10.00 g, 72.9 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de protection d'une fonction alcool sous forme d'éther silylé (Méthode 2.1) avec un rendement de 97% (huile jaune, 17.78 g).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C et IR sont identiques à l'énantiomère **95-(*S*)** précédemment décrit.

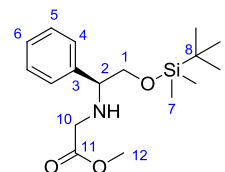
SM (ESI⁺) m/z : calculé C₁₄H₂₅NOSiNa pour [M+Na]⁺ 274,1614, trouvé 274,1616.

[α]_D²² = -18 (c 0,25 AcOEt)

(1S)-2-((2-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)amino)acétate de méthyle (97-(S))

C₁₇H₂₉NO₃Si

Masse molaire : 323.50 g.mol⁻¹



A une solution de **95-(S)** (18.00 g, 71.6 mmol, 1.0 éq) dans du THF anhydre (280 mL) est ajoutée, à 0°C, de la triéthylamine (11.6 mL, 85.9 mmol, 1.2 éq). Une solution de bromoacétate de méthyle (7.5 mL, 78.7 mmol, 1.1 éq) dans du THF anhydre (100 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 20 °C pendant 20 h puis le milieu est neutralisé par une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (300 mL). Le milieu est extrait avec de l'éther diéthylique (3 x 300 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (90:10 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir l'amine secondaire **97-(S)** sous la forme d'une huile jaune (15.98 g, 69 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.43 – 7.21 (m, 5H, H₄₋₆), 3.81 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H, H₂), 3.70 (s, 3H, H₁₂), 3.69 – 3.65 (dd, *J* = 9.9, 4.0 Hz, 1H, H₁), 3.59 (dd, *J* = 9.9, 9.0 Hz, 1H, H₁), 3.38 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, H₁₀), 3.21 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, H₁₀), 0.91 (s, 9H, H₉), 0.05 (s, 6H, H₇).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.7 (C₁₁), 142.9 (C_{Ar}) 128.6 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 68.4 (C₁), 64.6 (C₂), 51.8 (C₁₂), 48.7 (C₁₀), 30.6 (C₈) 26.0 (C₉), -5.2 (C₇).

IR ν_{max} 2952, 1753, 1462, 1254, 1087 cm⁻¹

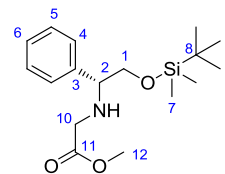
SMHR (ESI⁺) m/z : calculé C₁₇H₂₉NO₃SiNa pour [M+Na]⁺ 346,1814, trouvé 346,1813.

[α]_D²² = +48 (c 0,41 AcOEt)

(1*R*)-2-((2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)amino)acétate de méthyle (97-(*R*))

C₁₇H₂₉NO₃Si

Masse molaire : 323.50 g.mol⁻¹



A une solution de **95-(*R*)** (13.00 g, 51.7 mmol, 1.0 éq) dans du THF anhydre (280 mL) est ajoutée, à 0°C, de la triéthylamine (8.38 mL, 62.0 mmol, 1.2 éq). Une solution de bromoacétate de méthyle (5.42 mL, 56.9 mmol, 1.1 éq) dans du THF anhydre (100 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 20 °C pendant 20 h puis le milieu est neutralisé par une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (300 mL). Le milieu est extrait avec de l'éther diéthylique (3 x 300 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (90:10 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir l'amine secondaire **97-(*R*)** sous la forme d'une huile jaune (12.21 g, 73 %).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C et IR sont identiques à l'énantiomère **97-(*S*)** précédemment décrit.

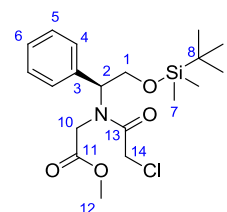
SMHR (ESI⁺) m/z : calculé C₁₇H₃₀NO₃Si pour [M+H]⁺ 324,1995, trouvé 324,1983

[α]_D²² = -49 (c 0,37 AcOEt)

(1S)-2-(N-(2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)-2-chloroacétamido)acétate de méthyle (99-(S))

C₁₉H₃₀ClNO₄Si

Masse molaire : 399.98 g.mol⁻¹



A une solution de **97-(S)** (14.23 g, 43.9 mmol, 1.0 éq) dans du DCM anhydre (280 mL) est ajoutée, à 0°C, de la triéthylamine (7.1 mL, 52.7 mmol, 1.2 éq). Une solution de chlorure de chloracétyle (3.8 mL, 48.3 mmol, 1.1 éq) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 20 °C pendant 18 h puis le milieu est neutralisé par une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (300 mL). Le milieu est extrait avec de l'éther diéthylique (3 x 300 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (90:10 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir l'amide **99-(S)** sous la forme d'une huile jaune (14.40 g, 82 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.51 – 7.31 (m, 5H, H₄₋₆), 5.22 (dd, *J* = 8.3, 3.9 Hz, 1H, H₂), 4.53 (s, 2H, H₁₄), 4.28 – 3.97 (m, 3H, H_{1,10}), 3.81 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H, H₁₀), 3.60 (s, 3H, H₁₂), 0.91 (s, 9H, H₉), 0.01 (s, 6H, H₇).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 171.9 (C₁₁), 171.1 (C₁₃), 138.7 (C_{Ar}), 131.8 (C_{Ar}), 130.9 (C_{Ar}), 65.7 (C₁), 64.7 (C₂), 55.3 (C₁₂), 47.8 (C₁₀), 41.4 (C₁₄), 29.9 (C₈), 28.8 (C₉), -5.9 (C₇).

IR ν_{max} = 2953, 1750, 1662, 1538, 1208 cm⁻¹

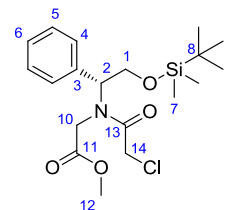
SMHR (ESI⁺) m/z : calculé pour C₁₉H₃₀NO₄NaSiCl [M+Na]⁺ 422,1530, trouvé 422,1528.

[α]_D²¹ = +26 (c 0,23 ; AcOEt)

(1*R*)-2-(*N*-(2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)-2-chloroacétamido)acétate méthyle (99-(*R*))

C₁₉H₃₀ClNO₄Si

Masse molaire : 399.98 g.mol⁻¹



A une solution d'amine **97-(*R*)** (12.21 g, 37.7 mmol, 1.0 éq) dans du DCM anhydre (280 mL) est ajoutée, à 0°C, de la triéthylamine (6.1 mL, 45.3.7 mmol, 1.2 éq). Une solution de chlorure de chloracétyle (3.3 mL, 41.5 mmol, 1.1 éq) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 20 °C pendant 18h puis le milieu est neutralisé par une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (300 mL). Le milieu est extrait avec de l'éther diéthylique (3 x 300 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (90:10 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir l'amide **99-(*R*)** sous la forme d'une huile jaune (11.76 g, 78 %).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C et IR sont identiques à l'énantiomère **99-(*S*)** précédemment décrit.

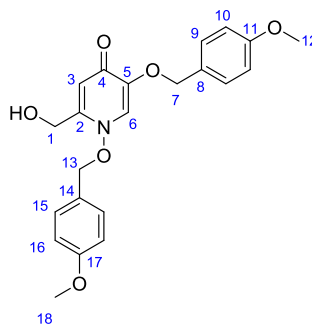
SMHR (ESI⁺) m/z : calculé pour C₁₉H₃₀NO₄NaSiCl [M+Na]⁺ 422,1530, trouvé 422,1519.

[α]_D²² = -28 (c 0,25 ; AcOEt)

2-(hydroxyméthyl)-1,5-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)pyridin-4(1H)-one (**108**)

C₂₂H₂₃NO₆

Masse molaire : 397,42 g.mol⁻¹



A une solution de **110** (4.10 g, 15.64 mmol, 1 éq) dans de la NMP (20mL) sont ajoutés du carbonate de potassium (6.50 g, 46.94 mmol, 3 éq) et de l'hydroxylamine (3.26 g, 46.94 mmol, 3 éq). Le mélange est chauffé à 75 °C pendant 18h puis du chlorure de PMB est ajouté goutte à goutte (3,2 mL, 23.46 mmol, 1.5 éq). La réaction est chauffée à 75 °C pendant 18h. Le mélange est refroidi puis extrait au DCM (3 x 50 mL), la phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite. L'huile obtenue est purifiée sur colonne chromatographique (DCM : MeOH 95:5) pour donner le composé désiré **108** avec un rendement de 20% (1.26 g)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.87 (s, 1H, H₆), 7.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₉), 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₁₅), 6.94 – 6.88 (m, 4H, H_{10,16}), 6.07 (s, 1H, H₃), 5.10 (s, 2H, H₇), 4.86 (s, 2H, H₁₃), 4.30 (s, 2H, H₁), 3.72 (s, 3H, H₁₂), 3.70 (s, 3H, H₁₈).

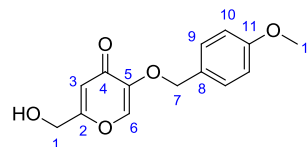
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.3 (C₄), 160.6 (C₂), 159.6 (C₁₁), 159.2 (C₁₇), 148.0 (C₅), 146.9, 132.4 (C₉), 130.3 (C₁₅), 129.0 (C₁₄), 125.5 (C₈), 123.2, 114.7 (C₁₆), 114.4 (C₁₆), 114.2 (C₆), 111.2 (C₃), 80.2 (C₁₃), 70.7 (C₇), 57.2 (C₁), 55.8 (C₁₂), 55.5 (C₁₈).

SM (ESI⁺) 398 [M+H]⁺

2-(hydroxyméthyl)-5-((4-méthoxybenzyl)oxy)-4H-pyran-4-one (110)

C₁₄H₁₄O₅

Masse molaire : 262,26 g.mol⁻¹



Le composé **110** est obtenu à partir de l'acide kojique **109** (5.000 g, 142.11 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de protection d'alcool par un groupement PMB (Méthode 2.2) avec un rendement de 92% (poudre marron).

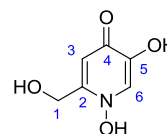
RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 7.94 (s, 1H, H₆), 7.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₉), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₁₀), 6.45 (s, 1H, H₃), 4.90 (s, 2H, H₇), 4.36 (s, 2H, H₁), 3.75 (s, 3H, H₁₂).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) δ 179.6 (C₄), 173.0 (C₂), 163.9 (C₁₁), 150.7 (C₅), 145.8 (C₆), 133.5 (C₉), 131.7 (C₈), 117.4 (C₁₀), 114.6 (C₃), 74.9 (C₇), 63.5 (C₁), 58.5 (C₁₂).

SM (ESI⁺) 263 [M+H]⁺

1,5-dihydroxy-2-(hydroxyméthyl)pyridin-4(1H)-one (111)

$C_6H_7NO_4$



Masse molaire : 157,12 g.mol⁻¹

Le composé **111** est obtenu à partir de l'hydroxypyridinone **108** (0.500 g, 30.6 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de déprotection d'une fonction alcool protégée par un groupement PMB (Méthode 2.6) avec un rendement de 85% (poudre marron).

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 7.83 (s, 1H, H₆), 6.99 (s, 1H, H₃), 4.65 (s, 2H, H₁).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) δ 174.3 (C₄), 151.0 (C₅), 137.95 (C₂), 124.58 (C₆), 109.16 (C₃), 57.48 (C₁).

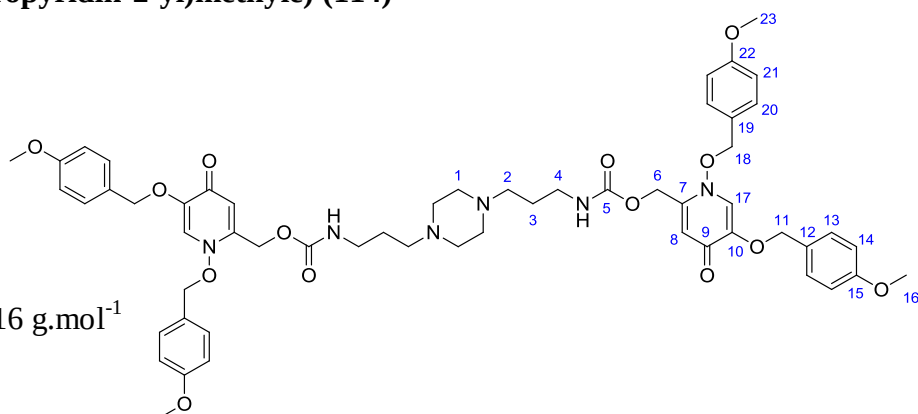
IR $\nu_{\max}$ = 3314, 1875, 1208 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 158 [M+H]⁺

(Pipérazine-1,4-diylbis(propane-3,1-diyl))dicarbamate de bis((1,5-bis((4-méthoxybenzyl)-oxy)-4-oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl)méthyle) (114)

C₅₆H₆₆N₆O₁₄

Masse molaire : 1047,16 g.mol⁻¹



Une solution de pyridinone **108** (0.861 g, 2.17 mmol, 2.8 éq) dans du THF (39 mL), est ajouté du CDI (0.999 g, 6.16 mmol, 8 éq). Le milieu réactionnel est agité pendant 18 heures puis de la pipérazine **107** (0.155 g, 0.77 mmol, 1.0 éq) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 18 heures puis le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (99:1 DCM/MeOH) permettant d'obtenir la pipérazine **114** sous la forme d'une poudre beige (0.306 g, 38%).

T_f (°C) = 138–140°C

RMN ¹H (300 MHz, MeOD) δ 7.61 (s, 2H, H₁₇), 7.34 – 7.14 (m, 8H, H_{13,20}), 6.96 – 6.85 (m, 8H, H_{14,21}), 6.38 (s, 2H, H₈) 5.01 (s, 4H, H₆), 4.91 (s, 8H, H_{11,18}), 3.82 (s, 6H, H₁₆), 3.78 (s, 6H, H₂₃), 3.15 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H, H₄), 2.57 (sl, 8H, H₁), 2.44 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H, H₂), 1.71 (quin, *J* = 7.0 Hz, 4H, H₃).

RMN ¹³C (75 MHz, MeOD) δ 171.1 (C₉), 159.2 (C_{15,22}), 157.9 (C₅), 149.1 (C₇), 142.6 (C₁₀), 133.1 (C₁₉), 129.5 (C_{12,20}), 129.2 (C₁₃), 122.6 (C₁₇), 113.9 (C_{14,21}), 108.5 (C₈), 80.3 (C₁₈), 71.0 (C₁₁), 58.0 (C₆), 55.3 (C_{16,23}), 53.5 (C₂), 51.8 (C₁), 38.2 (C₄), 24.7 (C₃).

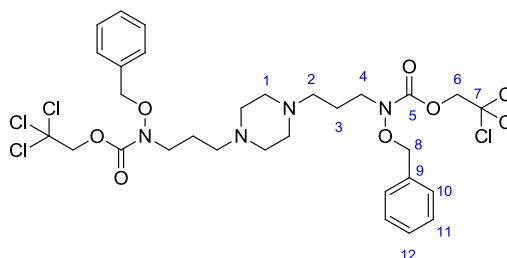
IR √_{max} = 2164, 1678, 1321, 1154 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 1048 [M+H]⁺

(Pipérazine-1,4-diylbis(propane-3,1-diyl))bis(benzyloxycarbamate) de bis(2,2,2-trichloroéthyle) (116)

$C_{30}H_{38}Cl_6N_4O_6$

Masse molaire : 763,36 g.mol⁻¹



Une solution de pipérazine **106** (0.051 g, 0.60 mmol, 1.0 éq) dans du DCM (6 mL), est ajouté **117** (1.00 g, 2.38 mmol, 4 éq) et de la triéthylamine (0.334 mL, 2.38 mmol, 4 éq). Le milieu réactionnel est agité pendant 18 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (9:1 Cyclohexane/EtOAc jusque 0:1 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir la pipérazine dialkylée sous la forme d'un solide blanc (0.242 g, 53%).

$T_f = 133\text{ }^{\circ}\text{C}$

RMN ¹H (300 MHz, MeOD) 7.52 – 7.33 (m, 10H, H₁₀₋₁₂), 4.95 (s, 4H, H₆), 4.91 (s, 4H, H₈), 3.59 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H, H₂), 2.46 (sl, 8H, H₁), 2.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H, H₄), 1.83 (quin, $J = 7.1$ Hz, 4H, H₃).

RMN ¹³C (75 MHz, MeOD) δ 157.1 (C₅), 135.1 (C₉), 128.9 (C_{10,11}), 127.9 (C₁₂), 95.1 (C₇), 76.1 (C₈), 74.6 (C₆), 53.5 (C₅), 51.8 (C₁), 47.7(C₄), 25.3 (C₃).

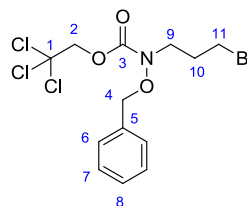
IR $\nu_{\text{max}} = 2144, 1615, 1321, 1025\text{ cm}^{-1}$

SM (ESI⁺) 761, 763, 765 [M+H]⁺

Benzyloxy(3-bromopropyl)carbamate de 2,2,2-trichloroéthyle (**117**)



Masse molaire : 419.53 g.mol⁻¹



A du 1,3-dibromopropane (0.68 mL, 6.70 mmol, 10 éq) dans du DMF (2 mL) sont ajoutés une solution de carbamate **35** (0.200 g, 0.67 mmol, 1 éq) dans du DMF (1 mL) puis du carbonate de césium (0.684 g, 2.10 mmol, 3 éq). Après 4 h d'agitation à 20 °C, de l'acétate d'éthyle (10 mL) est ajouté. La phase organique est successivement lavée avec une solution d'acide chlorhydrique 2 M et de l'eau distillée. Cette phase est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié sur colonne chromatographique (cyclohexane/acétate d'éthyle 9:1) pour donner conduire à **117** (0.232 g, 83%) sous la forme d'un solide blanc.

T_f = 85 °C

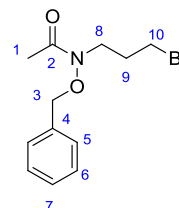
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 – 7.34 (m, 5H, H₆, ₇, ₈), 4.97 (s, 2H, H₂), 4.87 (s, 2H, H₄), 3.70 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₁₁), 3.44 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₉), 2.20 (quin, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₁₀).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 155. 0 (C₃), 134.5 (C₅), 129.6 (C₇), 128.9 (C₈), 128.6 (C₆), 95.19 (C₁), 77.2 (C₄), 75.2 (C₂), 48.2 (C₉), 30.3 (C₁₁), 30.2 (C₁₀).

IR √_{max} = 2354, 1647, 1423, 1047 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 418, 420, 422 [M+H]⁺

***N*-(benzyloxy)-*N*-(3-bromopropyl)acétamide (**118**)**



Masse molaire : 286,16 g.mol⁻¹

A une solution de bromocarbamate **117** (0.200 g, 0.48 mmol, 1 éq) dans l'acide acétique (3.5 mL) sont ajoutés de la poudre de zinc (0.250 g) et de l'anhydride acétique (91 µL, 0.96 mmol, 2 éq). Le mélange est laissé sous agitation pendant 24 h puis la solution est filtrée. Le filtrat est lavé avec des solutions aqueuses saturées de carbonate de sodium et de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite. L'huile obtenue est purifiée sur colonne chromatographique (Cyclohexane/Acétate d'éthyle 9:1) pour fournir l'acétamide **118** (0.092 g, 67%) sous la forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.52 – 7.38 (m, 5H, H_{5,6,7}), 4.84 (s, 2H, H₃), 3.79 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₁₀), 3.43 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₈), 2.19 (quin, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₉), 2.11 (s, 3H, H₁).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 159.8 (C₂), 134.7 (C₄), 128.9 (C₆), 127.6 (C₇), 127.1 (C₅), 72.7 (C₃), 48.8 (C₈), 30.8 (C₁₀), 30.6 (C₉), 20.2 (C₁).

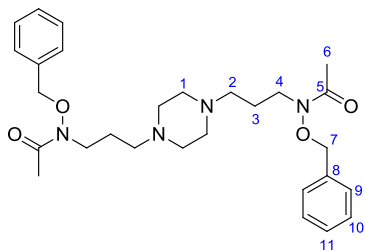
IR ν_{max} = 2415, 1678, 1423 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 286, 288 [M+H]⁺

***N,N'*-(pipérazine-1,4-diyl-bis(propane-3,1-diyl))bis(*N*-(benzyloxy)acétamide) (**120**)**

C₂₈H₄₀N₄O₄

Masse molaire : 496,64 g.mol⁻¹



Une solution de pipérazine dialkylée **116** (0.242 g, 0.32 mmol, 1.0 éq) dans de l'acide acétique (3 mL), est ajouté de l'anhydride acétique (0.121 mL, 1.28 mmol, 4 éq) et du zinc en poudre (0.332 g, 5.07 mmol, 16 éq). Le milieu réactionnel est agité pendant 17 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (9:1 Cyclohexane/EtOAc jusque 0:1 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir la pipérazine dialkylée **120** sous la forme d'une huile incolore (0.120 g, 75%).

RMN ¹H (300 MHz, MeOD) δ 7.69 – 6.82 (m, 10H, H₉₋₁₁), 4.79 (s, 4H, H₇), 3.18 (t, *J* = 7.7 Hz, 4H, H₄), 3.12 – 2.92 (m, 4H, H₂), 2.89 (sl, 8H, H₁), 2.07 (s, 6H, H₆), 2.00 (tt, *J* = 7.7, 6.3 Hz, 4H, H₃).

RMN ¹³C (75 MHz, MeOD) δ 173.9 (C₅), 135.5 (C₈), 128.6 (C_{9,10}), 127.4 (C₁₁), 75.3 (C₇), 53.9 (C₂), 51.6 (C₁), 46.8 (C₄), 25.1 (C₃), 19.5 (C₆).

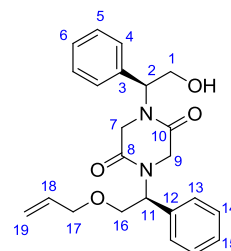
IR ν_{max} = 2154, 1658, 1315, 1221, 1135 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 497 [M+H]⁺

**1-((S)-2-(allyloxy)-1-phényléthyl)-4-((S)-2-hydroxy-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione
124-(1S,4S)**

C₂₃H₂₆N₂O₄

Masse molaire : 394,46 g.mol⁻¹



Le composé **124-(1S, 4S)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **137b-(1S, 4S)** (4.15 g, 8.17 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de déprotection des fonctions alcool protégées sous forme d'éther de silyle (Méthode 2.7) avec un rendement de 82% (huile incolore, 2.64 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36 – 7.01 (m, 10H, H_{4-6,13-15}), 5.95 – 5.73 (m, 2H, H_{11,18}), 5.64 (dd, *J* = 8.0, 6.3 Hz, 1H, H₂), 5.28 – 4.95 (m, 2H, H₁₉), 4.11 – 3.87 (m, 7H, H_{1,7,16,17}), 3.82 (dd, *J* = 10.6, 5.0 Hz, 1H, H₁₆), 3.66 (t, *J* = 17.2 Hz, 2H, H₉).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 165.3 (C₈), 164.9 (C₈), 135.2 (C_{Ar}), 134.8 (C_{Ar}), 134.1 (C₁₈), 129.3 (C_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 118.0 (C₁₉), 72.2 (C₁₇), 67.8 (C₁₆), 60.7 (C₁), 57.8 (C₁₁), 54.1 (C₂), 45.9 (C_{7,9}).

IR ν_{max} = 3496, 2983, 1665, 1354, 1208, 1039 cm⁻¹

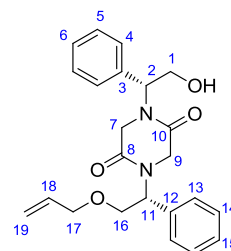
SM (ESI⁺) : 395 [M+H]⁺

[α]_D²² = -63 (c 0,38 ; AcOEt)

**1-((*R*)-2-(allyloxy)-1-phényléthyl)-4-((*R*)-2-hydroxy-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione
(**124-(1*R*,4*R*)**)**

C₂₃H₂₆N₂O₄

Masse molaire : 394,46 g.mol⁻¹



Le composé **124-(1*R*, 4*R*)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **137b-(1*R*, 4*R*)** (6.56 g, 16.4 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de déprotection des fonctions alcool protégées sous forme d'éther de silyle (Méthode 2.7) avec un rendement de 61% (huile incolore, 3.94 g).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C, et IR sont identiques à l'énantiomère **124-(1*S*, 4*S*)** précédemment décrit.

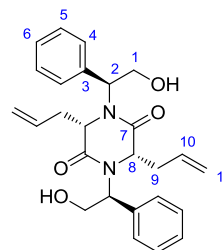
SM (ESI⁺) 395 [M+H]⁺

[α]_D²² = +68 (c 0,34 ; AcOEt)

(3*S*,6*S*)-3,6-diallyl-1,4-bis((*S*)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (126-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*))

C₂₆H₃₀N₂O₄

Masse molaire : 434,53 g.mol⁻¹



Le composé **126-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **127-(1*S*,4*S*)** (0.250 g, 0.71 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de dialkylation stéréosélective de dioxopipérazine (Méthode 2.9) avec un rendement de 35% (0.107 g, huile incolore) et un excès diastéréoisomérique supérieur à 95% (déterminé par RMN ¹H).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36 – 7.12 (m, 10H, H₄₋₆), 5.75 (ddt, *J* = 17.2, 10.1, 7.2 Hz, 2H, H₁₀), 5.12 – 4.95 (m, 4H, H₁₁), 4.80 (dd, *J* = 8.6, 4.3 Hz, 2H, H₂), 4.26 (dd, *J* = 12.2, 8.6 Hz, 2H, H₁), 4.03 – 3.76 (m, 4H, H_{1,8}), 2.55 (m, 2H, H₉), 2.39 (m, 2H, H₉).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168.0 (C₇), 135.9 (C_{Ar}), 132.8 (C₁₀), 129.0 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 118.8 (C₁₁), 64.8 (C₂), 63.3 (C₁), 61.3 (C₈), 39.5 (C₉).

IR ν_{max} = 3348, 2957, 1681, 1438, 1118 cm⁻¹

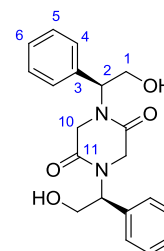
SM (ESI⁺) 435 [M+H]⁺

[α]_D²² = +104 (c 0,58 ; AcOEt)

1,4-bis((S)-2-hydroxy-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (127-(1S,4S))

C₂₀H₂₂N₂O₄

Masse molaire : 354,40 g.mol⁻¹



Le composé **127-(1S, 4S)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **137a-(1S, 4S)** (2.157 g, 3.70 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de déprotection des fonctions alcool protégées sous forme d'éther de silyle (Méthode 2.7) avec un rendement de 73% (huile incolore, 0.96 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.48 – 7.08 (m, 10H, H_{4,5,6}), 5.25 (dd, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₂), 4.50 – 4.23 (m, 4H, H_{1,10}), 4.12 – 4.00 (m, 4H_{1,10}).

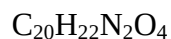
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 166.8 (C₁₁), 138.1 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 126.7 (C_{Ar}), 62.3 (C₁), 60.4 (C₂), 45.7 (C₁₀).

IR ν_{max} = 3422, 1658, 1318, 1225 cm⁻¹

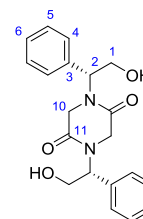
SM (ESI⁺) 355 [M+H]⁺

[α]_D²¹ = -57 (c 0,44 ; AcOEt)

1,4-bis((R)-2-hydroxy-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (127-(1R,4R))



Masse molaire : 354,40 g.mol⁻¹



Le composé **127-(1R, 4R)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **137a-(1R, 4R)** (1.11 g selon la méthode générale de déprotection des fonctions alcool protégées sous forme d'éther de silyle (Méthode 2.7) avec un rendement de 70% (huile incolore ;).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C, et IR sont identiques à l'énantiomère **127-(1S, 4S)** précédemment décrit.

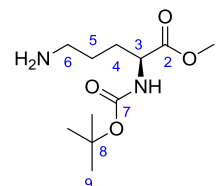
SM (ESI⁺) 355 [M+H]⁺

[α]_D²¹ = +59 (c 0,47 ; AcOEt)

(S)-5-amino-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pentanoate de méthyle (130a-(S))

C₁₁H₂₂N₂O₄

Masse molaire : 246,30 g.mol⁻¹



A une solution de Boc-ornithine **172-(S)** (0.94 g, 4.06 mmol, 1.0 éq) dans du méthanol (50 mL) est ajouté du SOCl₂ (0.353 mL, 4.87 mmol, 1.2 éq). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu brut obtenu est purifié par recristallisation (MeOH/Et₂O) permettant d'obtenir l'ester **130a-(S)** sous la forme d'une poudre blanche (1.00 g, quantitatif)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5.05 (dd, *J* = 7.0, 6.3 Hz, 1H, H₃), 3.71 (s, 3H, H₁), 3.04 – 2.95 (m, 2H, H₆), 2.04 (ddt, *J* = 12.3, 6.9, 1.1 Hz, 1H, H₄), 1.97 – 1.81 (m, 2H, H_{4,5}), 1.68 (m, , 1H, H₅), 1.44 (s, 9H, H₉).

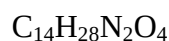
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 172.6 (C₂), 155.8 (C₇), 79.7 (C₈), 53.0 (C₃), 52.3 (C₁), 39.7 (C₆), 29.6 (C₄), 28.1 (C₉), 25.7 (C₅).

IR ν_{max} = 3149, 1750, 1203 cm⁻¹

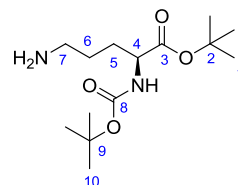
SM (ESI⁺) 247 [M+H]⁺

[α]_D²² = +21 (c 0,09 ; AcOEt)

(S) -5-amino-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pentanoate de *tert*-butyle (130b-(S))



Masse molaire : 288,38 g.mol⁻¹



A une solution de Boc-ornithine **172-(S)** (0.200 g, 0.86 mmol, 1.0 éq) dans du *tert*-butanol (5 mL) est ajouté du DCC (0.195 g, 0.95 mmol, 1.1 éq) et du DMAP (0.004 g, 0.03 mmol, 0.04 éq). Le milieu réactionnel est chauffé à 45°C pendant 18 heures puis le mélange est ramené à 20 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (90:10 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir l'ester **130b-(S)** sous la forme d'une huile incolore (0.131 g, 53%)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.88 (dd, *J* = 7.3, 6.3 Hz, 1H, H₄), 3.27 – 2.98 (m, 1H, H₇), 2.93 – 2.79 (m, 1H, H₇), 2.13 – 1.90 (m, 2H, H₅), 1.73 – 1.59 (m, 2H, H₆), 1.47 (s, 9H, H₁₀), 1.38 (s, 9H, H₁).

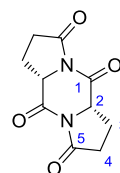
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.3 (C₃), 156.2 (C₈), 81.4 (C₂), 79.6 (C₉), 47.7 (C₄), 40.1 (C₇), 29.3 (C₅), 28.5 (C₁₀), 27.6 (C₁), 25.2 (C₆).

IR ν_{max} = 3259, 1733, 1129 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 289 [M+H]⁺

[α]_D²² = +24 (c 0,36 ; MeOH)

(5a*S*,10a*S*)-tetrahydrodipyrrolo[1,2-*a*:1',2'-*d*]pyrazine-3,5,8,10(2*H*,5a*H*)-tetraone 132-(3*S*,6*S*)



$C_{10}H_{10}N_2O_4$

Masse molaire : 222,20 g.mol⁻¹

La pyrrolidine **166-(*S*)** (8.77 g, 67.97 mmol, 1éq) est dissoute dans un mélange pyridine/Ac₂O (1:3) (20 mL) puis est chauffée à 110°C pendant 1 heure. Le précipité formé est filtré et lavé avec de l'eau froide, permettant de fournir la dioxopipérazine **132-(3*S*,6*S*)** avec un rendement de 60% (4.53 g), sous la forme d'une poudre beige.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.84 (dd, *J* = 8.9, 7.9 Hz, 2H, H₂), 2.84-2.11 (m, 8H, H_{3,4}).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.7 (C₅), 165.7 (C₁), 58.4 (C₂), 31.2 (C₄), 18.9 (C₃).

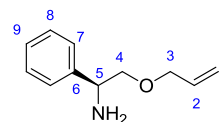
IR $\nu_{\max}$ = 1724, 1672, 1408 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 223 [M+H]⁺

[α]_D²² = +65 (c 0,51 ; MeOH)

(S)-2-(allyloxy)-1-phényléthanamine (134b-(S))

C₁₁H₁₅NO



Masse molaire : 177,24 g.mol⁻¹

Une solution de *N*-Boc-phénylglycinol *O*-allylé **136-(S)** (200 mg, 0,72 mmol, 1.0 éq) dans de l'acétonitrile (15 mL), à 0°C, est ajouté de l'acide chlorhydrique (4M dioxane, 1.8 mL, 7.2mmol, 10 éq). Le mélange est ramené à 20 °C et est laissé sous agitation pendant 2h. Le solvant est évaporé puis le produit est dissout dans du méthanol et recristallisé dans de l'éther. Le phénylglycinol *O*-allylé **134b-(S)** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (14.84 g, 63 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.20 (m, 5H, H₇₋₉), 5.87 (ddt, *J* = 17.2, 10.4, 5.6 Hz, 1H, H₂), 5.35 – 5.12 (m, 2H, H₁), 4.90 – 4.70 (m, 1H, H₅), 4.16 – 3.86 (m, 2H, H₃), 3.70 (dd, *J* = 9.8, 4.5 Hz, 1H, H₄), 3.64 – 3.57 (m, 1H, H₄).

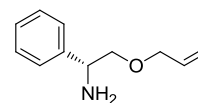
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 156.1 (C₁₀), 128.0 (C_{Ar}), 127.2 (C_{Ar}), 126.5(C_{Ar}), 139.0 (C₆), 135.7 (C₂), 116.1 (C₁), 79.5 (C₁₁), 66.3 (C₄), 63.4 (C₅), 49.4 (C₃), 28.0 (C₁₂).

IR ν_{max} = 3257, 1358, 1211 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 178 [M+H]⁺

[α]_D²³ = +11 (c 0,18 ; AcOEt)

(R)-2-(allyloxy)-1-phényléthamine (134b-(R))



C₁₁H₁₅NO

Masse molaire : 177,24 g.mol⁻¹

Une solution de *N*-Boc-phénylglycinol *O*-allylé **136-(R)** (200 mg, 0,72 mmol, 1.0 éq) dans de l'acétonitrile (15 mL), à 0°C, est ajoutée de l'acide chlorhydrique (4M dioxane, 1.8 mL, 7.2mmol, 10 éq). Le mélange est ramené à 20 °C et est laissé sous agitation pendant 2h. Le solvant est évaporé puis le produit est dissout dans du méthanol et recristallisé dans de l'éther. Le phénylglycinol *O*-allylé **134b-(R)** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (14.84 g, 63 %).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C, et IR sont identiques à l'énantiomère **135-(S)** précédemment décrit.

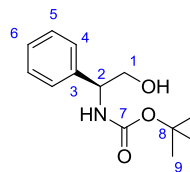
SM (ESI⁺) 178 [M+H]⁺

[α]_D²³ = -10 (c 0,13 ; AcOEt)

(S)-(2-hydroxy-1-phenylethyl)carbamate de *tert*-butyle (135-(S))

C₁₃H₁₉NO₃

Masse molaire : 237,29 g.mol⁻¹



Le composé **135-(S)** est obtenu à partir du (S)-phénylglycinol commerciale (1.00 g,) selon la méthode générale de protection des fonctions amines par un groupement Boc (Méthode 2.4) avec un rendement de 89% (huile incolore, 1.54 g).

RMN ¹H (300 MHz, MeOD) δ 7.21–7.02 (m, 5H, H₄₋₆), 4.84 – 4.79 (m, 1H, H₂), 3.65 (dd, *J* = 10.3, 4.4Hz, 1H, H₁), 3.56 (dd *J*=10.3, 8.1, Hz, 1H, H₁), 1.45 (s, 9H, H₉).

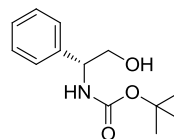
RMN ¹³C (75 MHz, MeOD) δ 156.9 (C₇), 140.0 (C₃), 128.7 (2 C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 126.6 (2 C_{Ar}), 80.0 (C₆), 66.6 (C₂), 57.2 (C₁), 28.4 (C₉).

IR ν_{max} = 3345, 3305, 2895, 1663, 1363, 1285, 1176 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 238 [M+H]⁺

[α]_D²² = +11 (c 0,57 ; AcOEt)

(R)-(2-hydroxy-1-phényléthyl)carbamate de *tert*-butyle (135-(R))



$C_{13}H_{19}NO_3$

Masse molaire : 237,29 g.mol⁻¹

Le composé **135-(R)** est obtenu à partir du (*R*)-phénylglycinol commerciale (1.00 g,) selon la méthode générale de protection des fonctions amines par un groupement Boc (Méthode 2.4) avec un rendement de 93% (huile incolore, 1.61 g).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C, et IR sont identiques à l'énantiomère **135-(S)** précédemment décrit.

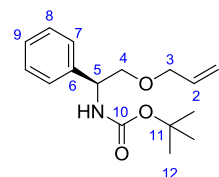
SM (ESI⁺) : 238 [M+H]⁺

[α]_D²² = -19 (c 0,25 ; AcOEt)

(S)-(2-(allyloxy)-1-phényléthyl)carbamate de *tert*-butyle (136-(S))

C₁₆H₂₃NO₃

Masse molaire : 277,36 g.mol⁻¹



A une solution de *N*-Boc-phénylglycinol **135-(S)** (200 mg, 0,84 mmol, 1.0 éq) dans du THF (5 mL), à 0°C, est ajouté de l'hydru de sodium (60% paraffine, 0.067 g, 1.68 mmol, 2 éq). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 20 minutes puis du bromure d'allyle (0.073 mL, 0.84 mmol, 1 éq) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est ramené à 20 °C et est laissé sous agitation pendant 16 h. Le milieu est extrait avec de l'AcOEt (3 x 10 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (90:10 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir le *N*-Boc-phénylglycinol *O*-allylé **136-(S)** sous la forme d'une huile jaune (0.156 g, 67 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.20 (m, 5H, H₇₋₉), 5.87 (ddt, *J* = 17.1, 10.4, 5.3 Hz, 1H, H₂), 5.35 – 5.12 (m, 2H, H₁), 4.87 – 4.68 (m, 1H, H₅), 3.70 (dd, *J* = 9.7, 4.5 Hz, 1H, H₂), 3.64 – 3.57 (m, 1H, H₂), 1.45 (s, 9H, H₁₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 156.1 (C₁₀), 128.0 (C_{Ar}), 127.2 (C_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 139.0 (C₆), 135.7 (C₂), 116.1 (C₁), 79.5 (C₁₁), 66.3 (C₄), 63.4 (C₅), 49.4 (C₃), 28.0 (C₁₂).

IR ν_{max} = 1729, 1654, 1567, 1231 cm⁻¹

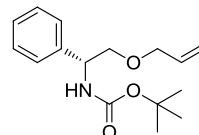
SM (ESI⁺), 278 [M+H]⁺

[α]_D²² = +14 (c 0,46 ; AcOEt)

(R)-(2-(allyloxy)-1-phényléthyl)carbamate de *tert*-butyle (136-(R))

C₁₆H₂₃NO₃

Masse molaire : 277,36 g.mol⁻¹



A une solution de *N*-Boc-phénylglycinol **135-(R)** (0.200 g, 0,84 mmol, 1.0 éq) dans du THF (5 mL), à 0°C, est ajouté de l'hydruure de sodium (60% paraffine, 0.067 g, 1.68 mmol, 2 éq). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 20 minutes puis du bromure d'allyle (0.073 mL, 0.84 mmol, 1 éq) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est ramené à 20 °C et est laissé sous agitation pendant 16 h. Le milieu est extrait avec de l'AcOEt (3 x 10 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (90:10 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir le *N*-Boc-phénylglycinol *O*-allylé **136-(R)** sous la forme d'une huile jaune (0.158 g, 68 %).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C, et IR sont identiques à l'énantiomère **(136-(S))** précédemment décrit.

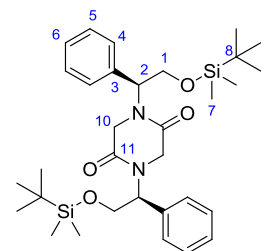
SM (ESI⁺) 278 [M+H]⁺

[α]_D²² = -17 (c 0,26 ; AcOEt)

1,4-bis((S)-2-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (137a-(1S,4S))

C₃₂H₅₀N₂O₄Si₂

Masse molaire : 582.92 g.mol⁻¹



Le composé **137a-(1S, 4S)** est obtenu à partir du chloracétamide **99-(S)** (12.231 g, 30.6 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de fermeture du cycle dioxopipérazine (Méthode 2.3) avec un rendement de 63 % (huile jaune, 11.24 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.48 – 7.19 (m, 10H, H₄₋₆), 5.35 (m, 2H, H₂), 4.57 – 4.03 (m, 8H, H_{1,10}), 0.96 (s, 18H, H₉), 0.08 (s, 12H, H₇).

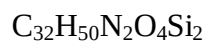
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 167.4 (C₁₁), 138.4 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 65.1 (C₂), 61.4 (C₁), 45.2 (C₁₀), 25.7 (C₈), 19.2 (C₉), -5.4 (C₇).

IR ν_{max} = 1674, 1476, 1172 cm⁻¹

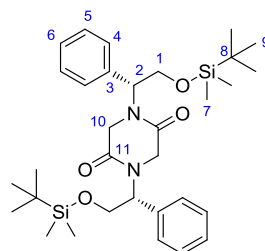
SM (ESI⁺) : 584 [M+H]⁺

[α]_D²² = -48 (c 0,14 ; AcOEt)

1,4-bis((*R*)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (137a-(1*R*,4*R*))



Masse molaire : 582.92 g.mol⁻¹



Le composé **137a-(1*R*, 4*R*)** est obtenu à partir du chloracétamide **99-(*R*)** (10.157 g, 25.4 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de fermeture du cycle dioxopipérazine (Méthode 2.3) avec un rendement de 65% (huile jaune, 9.62 g).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C et IR sont identiques à l'énantiomère **137a-(1*S*, 4*S*)** précédemment décrit.

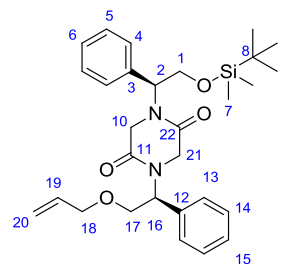
SM (ESI⁺) : 584 [M+H]⁺

[α]_D²² = +50 (c 0,15 ; AcOEt)

1-((S)-2-(allyloxy)-1-phényléthyl)-4-((S)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)piperazine-2,5-dione (137b-(1S,4S))

C₂₉H₄₀N₂O₄Si

Masse molaire : 508,72 g.mol⁻¹



Le composé **137b-(1S, 4S)** est obtenu à partir du chloracétamide **99-(S)** (7.149 g, 17.9 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de fermeture du cycle dioxopipérazine (Méthode 2.3) avec un rendement de 61% (huile jaune, 5.55 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.23 (m, 10H, H_{4-6,13-15}), 6.03 – 5.84 (m, 2H, H_{16,19}), 5.75 (dd, *J* = 7.4, 5.5 Hz, 1H, H₂), 5.38 – 5.14 (m, 2H, H₂₀), 4.20 – 3.66 (m, 10H, H_{1,10,17,18,21}), 0.92 (s, 9H, H₉), 0.12 (s, 6H, H₇).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 167.1 (C_{11,22}), 138.5 (C_{Ar}), 133.9 (C₁₉), 128.2 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 126.8 (C_{Ar}), 116.9 (C₂₀), 71.2 (C₂), 70.8 (C₁₆), 65.3 (C₁₈), 61.7 (C₁), 61.1 (C₁₇), 45.7 (C_{10,21}), 30.6 (C₆), 25.8 (C₉).

IR ν_{max} = 3057, 1662, 1635, 1043 cm⁻¹

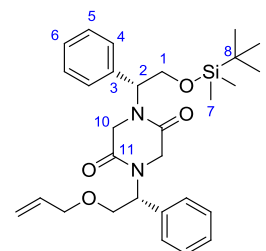
SM (ESI⁺) : 509 [M+H]⁺

[α]_D²² = -43 (c 0,42 ; AcOEt)

1-((*R*)-2-(allyloxy)-1-phényléthyl)-4-((*R*)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (137b-(1*R*,4*R*)**)**

C₂₉H₄₀N₂O₄Si

Masse molaire : 508,72 g.mol⁻¹



Le composé **137b-(1*R*, 4*R*)** est obtenu à partir du chloracétamide **99-(*R*)** (6.561 g, 16.4 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de fermeture du cycle dioxopipérazine (Méthode 2.3) avec un rendement de 61% (huile jaune, 5.08 g).

Les spectres RMN ¹H, ¹³C et IR sont identiques à l'énantiomère **137b-(1*S*, 4*S*)** précédemment décrit.

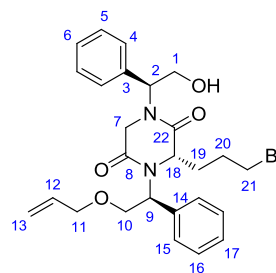
SM (ESI⁺) : 509 [M+H]⁺

[α]_D²² = +49 (c 0,54 ; AcOEt)

(S)-4-((S)-2-(allyloxy)-1-phényléthyl)-3-(3-bromopropyl)-1-((S)-2-hydroxy-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (140a-(1S,3S,4S))

C₂₆H₃₁BrN₂O₄

Masse molaire : 515,44 g.mol⁻¹



Le composé **140a-(1S,3S,4S)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** (0.100 g, 0.25 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale d'alkylation de dioxopipérazine (Méthode 2.8) avec un rendement de 10% (0.013 g, huile jaune).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.42 – 7.04 (m, 10H, H_{4-6,15-17}), 5.87 (ddt, *J* = 16.3, 9.9, 6.0 Hz, 1H, H₁₂), 5.64 (dd, *J* = 8.3, 5.3 Hz, 1H, H₉), 5.59 (dd, *J* = 8.5, 5.2 Hz, 1H, H₂), 5.36 – 5.14 (m, 2H, H₁₃), 4.23 – 3.53 (m, 7H, H_{1,7,10,11,18}), 3.60 – 3.36 (m, 1H, H₂₁), 3.29 (td, *J* = 12.4, 3.1 Hz, 1H, H₂₁), 2.09 (m, 1H, H₂₀), 1.88 (tdd, *J* = 12.4, 9.6, 1.1 Hz, 1H, H₂₀), 1.68 (dddd, *J* = 16.3, 12.5, 8.0, 3.8 Hz, 1H, H₁₉), 1.38 (m, 1H, H₁₉).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 169.3 (C₈), 168.4 (C₂₂), 138.7 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 133.2 (C₁₂), 128.3 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.4 (2 C_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 116.8 (C₁₃), 71.0 (C₁₁), 70.4 (C₁₀), 62.3 (C₉), 61.2 (C₂), 54.1 (C₁₈), 45.9 (C₇), 36.4 (C₂₁), 31.8 (C₂₀), 30.9 (C₁₉).

IR $\nu_{\max}$ = 3441, 2964, 1656, 1337, 1225 cm⁻¹

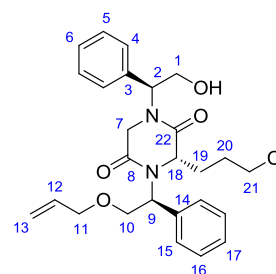
SM (ESI⁺) 515-517 [M+H]⁺

[α]_D²¹ = +148 (c 0,14 ; AcOEt)

(S)-4-((S)-2-(allyloxy)-1-phényléthyl)-3-(3-chloropropyl)-1-((S)-2-hydroxy-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (140b-(1S,3S,4S))

C₂₆H₃₁ClN₂O₄

Masse molaire : 470,99 g.mol⁻¹



Le composé **140b-(1S,3S,4S)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** (0.100 g, 0.25 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale d'alkylation de dioxopipérazine (Méthode 2.8) avec un rendement de 19% (0.022, huile jaune).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.42 – 7.04 (m, 10H, H_{4-6,15-17}), 5.89 (ddt, *J* = 16.3, 9.9, 6.0 Hz, 1H, H₁₂), 5.65 (dd, *J* = 8.3, 5.3 Hz, 1H, H₉), 5.57 (dd, *J* = 8.5, 5.2 Hz, 1H, H₂), 5.36 – 5.14 (m, 2H, H₁₃), 4.23 – 3.53 (m, 7H, H_{1,7,10,11,18}), 3.60 – 3.36 (m, 1H, H₂₁), 3.29 (td, *J* = 12.4, 3.1 Hz, 1H, H₂₁), 2.09 (m, 1H, H₂₀), 1.88 (tdd, *J* = 12.4, 9.6, 1.1 Hz, 1H, H₂₀), 1.68 (dddd, *J* = 16.3, 12.5, 8.0, 3.8 Hz, 1H, H₁₉), 1.38 (m, 1H, H₁₉).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168.7 (C₈), 168.3 (C₂₂), 138.4 (C_{Ar}), 137.6 (C_{Ar}), 134.0 (C₁₂), 128.8 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 127.7 (2 C_{Ar}), 126.4 (C_{Ar}), 116.7 (C₁₃), 71.6 (C₁₁), 70.3 (C₁₀), 62.0 (C₉), 61.3 (C₂), 54.2 (C₁₈), 45.9 (C₇), 36.3 (C₂₁), 31.8 (C₂₀), 30.5 (C₁₉).

IR ν_{max} = 3437, 2965, 1659, 1333, 1221 cm⁻¹

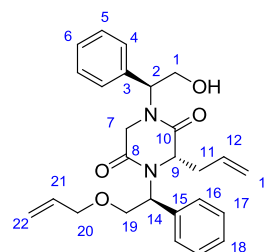
SM (ESI⁺) 471-473 [M+H]⁺

[α]_D²² = +112 (c 0,19 ; AcOEt)

(S)-3-allyl-4-((S)-2-(allyloxy)-1-phényléthyl)-1-((S)-2-hydroxy-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (143-(1S,3S,4S))

$C_{26}H_{30}N_2O_4$

Masse molaire : 434,53 g.mol⁻¹



Le composé **143-(1S,3S,4S)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **124-(1S,4S)** (0.150 g, 0.38 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale d'alkylation stéréosélective de dioxopipérazine (Méthode 2.8) avec un rendement de 53% (0.088 g, huile incolore) et un excès diastéréoisomérique de 70%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.44 – 7.00 (m, 10H, H_{4-6,16-18}), 5.90 (ddt, *J* = 16.5, 10.8, 5.5 Hz, 1H, H₂₁), 5.68 (dd, *J* = 8.3, 5.3 Hz, 1H, H₁₄), 5.62 (dd, *J* = 8.5, 5.2 Hz, 1H, H₂), 5.49 (ddt, *J* = 17.4, 10.2, 7.4 Hz, 1H, H₁₂), 5.36 – 5.14 (m, 2H, H₂₂), 4.91 – 4.81 (m, 2H, H₁₃), 4.25 – 3.88 (m, 7H, H_{1,9,19,20}), 3.81 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, H₇), 3.68 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, H₇), 2.19 – 1.82 (m, 2H, H₁₁).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168.9 (C₁₀), 167.7 (C₈), 138.5 (C_{Ar}), 137.7 (C_{Ar}), 134.1 (C₂₁), 131.4 (C₁₂), 128.7 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 126.8 (C_{Ar}), 120.1 (C₁₃), 117.7 (C₂₂), 72.4 (C₉), 68.2 (C₁), 60.8 (C₁₄), 58.8 (C₈), 58.6 (C₂), 56.8 (C₁₄), 47.2 (C₇), 37.2 (C₁₁).

IR $\nu_{\max}$ = 3427, 2974, 2953, 1667, 1538, 1202 cm⁻¹

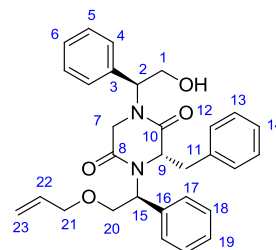
SM (ESI⁺) 435 [M+H]⁺

[α]_D²² = +181 (c 0,58 ; AcOEt)

(S)-4-((S)-2-(allyloxy)-1-phényléthyl)-3-benzyl-1-((S)-2-hydroxy-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (146-(1S,4S))

C₃₀H₃₂N₂O₄

Masse molaire : 484,59 g.mol⁻¹



Le composé **146-(S)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **137b-(S)** (0.100 g, 0.25 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale d'alkylation stéréosélective de dioxopipérazine (Méthode 2.8) avec un rendement de 64% (0.078 g, huile jaune) et un excès diastéréoisomérique de 63%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.57 – 7.05 (m, 15H, H_{4-6,12-14,17-19}), 5.79 (ddt, *J* = 16.3, 9.9, 6.1 Hz, 1H, H₂₂), 5.51 – 5.25 (m, 2H, H₂₃), 4.87 – 3.93 (m, 12H, H_{1,2,7,9,15,20,21}), 3.59 (dd, *J* = 12.5, 10.3 Hz, 1H, H₁₁), 3.31 – 3.17 (m, 1H, H₁₁).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168.9 (C₁₀), 167.7 (C₈), 138.5 (C_{Ar}), 137.7 (C_{Ar}), 134.1 (C₂₁), 131.4 (C₁₂), 128.7 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 126.8 (C_{Ar}), 120.1 (C₁₃), 117.7 (C₂₂), 72.4 (C₉), 68.2 (C₁), 60.8 (C₁₄), 58.8 (C₈), 58.6 (C₂), 56.8 (C₁₄), 47.2 (C₇), 37.2 (C₁₁).

IR ν_{max} = 2953, 1750, 1662, 1538, 1208 cm⁻¹

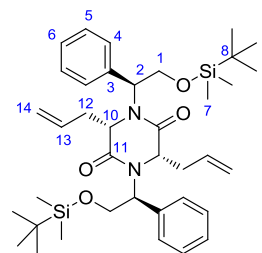
SM (ESI⁺) 485 [M+H]⁺

[α]_D²² = +27 (c 0,82 ; AcOEt)

(3*S*,6*S*)-3,6-diallyl-1,4-bis((*S*)-2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)pipérazine-2,5-dione (151-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*))

C₃₈H₅₈N₂O₄Si₂

Masse molaire : 663.05 g.mol⁻¹



Le composé **151-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*)** est obtenu à partir de la dioxopipérazine **126-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*)** (0.107 g, 0.25 mmol, 1.0 éq) selon la méthode générale de protection des alcools sous forme d'éthers de silyle (Méthode 2.1) avec un rendement quantitatif (0.163 g, huile incolore).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.11 (m, 10H, H₄₋₆), 5.72 (ddt, *J* = 16.9, 10.3, 7.1 Hz, 2H, H₁₃), 5.14 – 4.96 (m, 4H, H₁₄), 4.79 (dd, *J* = 8.2, 4.4 Hz, 2H, H₂), 4.31 (dd, *J* = 12.2, 8.2 Hz, 2H, H₁), 3.99 – 3.78 (m, 4H, H_{1,8}), 2.55 (m, 2H, H₁₂), 2.39 (ddt, *J* = 14.2, 6.8, 6.0, 1.2 Hz, 2H, H₁₂) 0.83 (s, 18H, H₉), 0.00 (s, 12H, H₇).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168.6 (C₁₁), 137.3 (C₃), 133.4 (C₁₃), 128.6 (C_{Ar}), 127.0 (2C_{Ar}), 118.3 (C₁₄), 63.5 (C₁), 61.1 (C₂), 54.7 (C₁₀), 34.1 (C₁₂), 25.6 (C₉), 18.0 (C₈), -5.4(C₇).

IR ν_{max} = 2875, 1640, 1533, 1199 cm⁻¹

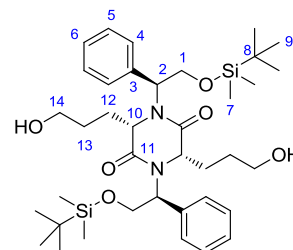
SM (ESI⁺) 664 [M+H]⁺

[α]_D²² = +127 (c 0,62 ; AcOEt)

(3S,6S)-1,4-bis((S)-2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)-3,6-bis(3-hydroxypropyl)pipérazine-2,5-dione (152-(1S,3S,4S,6S))

C₃₈H₆₂N₂O₆Si₂

Masse molaire : 699,08 g.mol⁻¹



A une solution de dioxopipérazine dialkylée **151-(1S,3S,4S,6S)** (1.549 g, 2.34 mmol, 1.0 éq) dans du THF distillé (10mL) est ajouté une solution de 9-BBN (28 mL, 14.00 mmol, 6.0 éq) à 0.5 M dans du THF. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 20 °C pendant 3 heures puis ce milieu est refroidi à 0°C. A cette température, une solution aqueuse de soude 6.0 M (2.8 mL), de l'eau oxygénée (2.1 mL) et de l'éthanol (10.4 mL) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant 1h. Le milieu est extrait avec de l'AcOEt (3 x 30 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (5:5 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir le diol **152-(1S,3S,4S,6S)** sous la forme d'une huile jaune (0.866 g, 54 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.52 – 7.32 (m, 10H, H₄₋₆), 5.06 (dd, *J* = 7.7, 5.7 Hz, 2H, H₂), 4.46 (dd, *J* = 10.5, 7.7 Hz, 2H, H₁), 4.18 (dd, *J* = 10.3, 3.1 Hz, 2H, H₁₀), 4.04 (dd, *J* = 10.5, 5.7 Hz, 2H, H₁), 3.61 (dt, *J* = 10.3, 5.1 Hz, 2H, H₁₄), 3.51 (dt, *J* = 11.2, 5.7 Hz, 2H, H₁₄), 1.67 – 1.49 (m, 4H, H₁₂), 1.29 – 1.11 (m, 4H, H₁₃), 0.85 (s, 18H, H₉), 0.02 (s, 12H, H₇).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168.6 (C₁₁), 137.7 (C₃), 128.7 (C_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 63.2 (C₁), 61.2 (C_{2,14}), 55.2 (C₁₀), 31.5 (C₁₃), 30.1 (C₁₂), 25.8 (C₉), 18.2 (C₈), -5.4(C₇).

IR ν_{max} = 3457, 1712, 1646, 1519, 1187 cm⁻¹

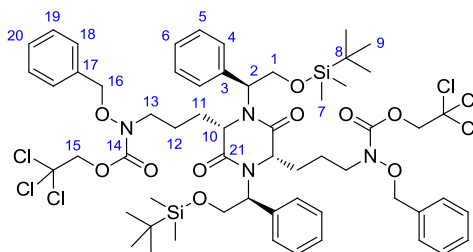
SM (ESI⁺) 700 [M+H]⁺

[α]_D²² = +116 (c 0,24 ; AcOEt)

(((2S,5S)-1,4-bis((S)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)-3,6-dioxopipérazine-2,5-diyl)bis(propane-3,1-diyl))bis(benzyloxycarbamate) de bis(2,2,2-trichloroéthyle) (153-(1S,3S,4S,6S))

$C_{58}H_{78}Cl_6N_4O_{10}Si_2$

Masse molaire : 1260,15 g.mol⁻¹



A une solution de diol **152-(1S,3S,4S,6S)** (0.400 g, 0.57 mmol, 1.0 éq), d'hydroxylamine **35** (1.027g, 3.44 mmol, 6.0 éq) et de la triphénylphosphine (0.479 g, 1.72 mmol, 3 éq) dans du THF (10 mL) est ajouté du DIAD (0.348 g, 1.72 mmol, 3 éq). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 16 heures puis le mélange est extrait avec de l'AcOEt (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (5:5 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir la dioxopipérazine **153-(1S,3S,4S,6S)** sous la forme d'une huile jaune (0.453 g, 63 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.77 – 7.11 (m, 20H, H_{4-6,18-20}), 5.03 (dd, *J* = 7.4, 6.1 Hz, 2H, H₂), 4.91 (s, 4H, H₁₆), 4.90 (s, 4H, H₁₅), 4.36 (dd, *J* = 10.5, 7.5 Hz, 2H, H₁), 4.05 (dd, *J* = 10.5, 6.0 Hz, 2H, H₁), 3.97 (dd, *J* = 10.3, 3.8 Hz, 2H, H₁₀), 3.43 (ddd, *J* = 14.4, 7.7, 6.3 Hz, 2H, H₁₃), 3.32 (ddd, *J* = 14.2, 8.1, 5.5 Hz, 2H, H₁₃), 1.98 – 1.71 (m, 2H, H₁₂), 1.71 – 1.52 (m, 2H₁₂), 1.52 – 1.39 (m, 2H, H₁₁), 1.29 (dd, *J* = 7.1, 6.3 Hz, 2H, H₁₁), 0.85 (s, 18H, H₉), 0.02 (s, 12H, H₇).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168.9 (C₂₁), 157.3 (C₁₄), 137.2 (C₃), 135.0 (C₁₇), 129.3 (C_{Ar}), 128.5(C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 95.0 (C₂₂), 76.5 (C₁₆), 74.7 (C₁₅), 63.7 (C₁), 62.3 (C₂), 55.3 (C₁₀), 48.6 (C₁₃), 29.4 (C₁₁), 25.9 (C₉), 23.7 (C₁₂), 21.0 (C₈), -5.4 (C₇).

IR $\nu_{\max}$ = 2953, 1750, 1662, 1538, 1208 cm⁻¹

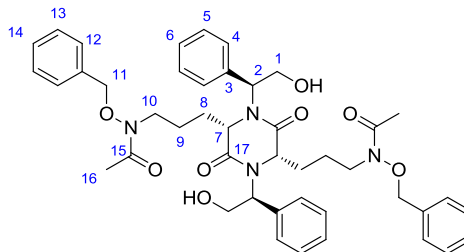
SM (ESI⁺) 1259, 1261, 1263 [M+H]⁺

[α]_D²² = +98 (c 0,35 ; AcOEt)

***N,N'*-(((2*S*,5*S*)-1,4-*bis*((*S*)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-1-phényléthyl)-3,6-dioxopipérazine-2,5-diyl)*bis*(propane-3,1-diyl))*bis*(*N*-(benzyloxy)acétamide) (154a-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*))**

C₄₄H₅₂N₄O₈

Masse molaire : 764,91 g.mol⁻¹



A une solution de dioxopipérazine **153-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*)** (0.200 g, 0.26 mmol, 1.0 éq) dans l'acide acétique (5 mL) est ajouté du zinc en poudre (0.255 g, 3.9 mmol, 15 éq) et de l'anhydride acétique (0.05 mL, 0.52 mmol, 2 éq). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures puis le mélange est extrait avec de l'AcOEt (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (5:5 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir la dioxopipérazine **154a-(1*S*,3*S*,4*S*,6*S*)** sous la forme d'une huile incolore (0.153 g, 77 %) avec un excès diastéréoisomérique supérieur à 95% (déterminé par RMN ¹H).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.64 – 7.16 (m, 20H, H_{4-6,12-14}), 5.38 (dd, *J* = 8.5, 5.6 Hz, 2H, H₂), 4.84 (s, *J* = 2.1 Hz, 4H, H₁₁), 4.26 (dd, *J* = 11.6, 8.4 Hz, 2H, H₁), 4.08 (m, 4H, H_{1,7}), 3.71 – 3.40 (m, 4H, H₁₀), 2.04 (s, 6H, H₁₆), 1.81 – 1.70 (m, 2H, H₉), 1.66 – 1.52 (m, 4H, H_{9,8}), 1.41 – 1.23 (m, 2H, H₈).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 179.3 (C₁₅), 168.5 (C₁₇), 136.6 (C_{Ar}), 134.7 (C_{Ar}), 128.90 (C_{Ar}), 128.74 (C_{Ar}), 128.54 (C_{Ar}), 127.97 (C_{Ar}), 127.67 (C_{Ar}), 127.57 (C_{Ar}), 75.0 (C₁₁), 60.6 (C₂), 59.0 (C₁), 43.3 (C₇), 31.7 (C₁₀), 23.9 (C₈), 22.6 (C₉), 21.9 (C₁₆).

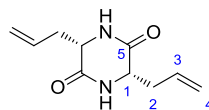
IR ν_{max} = 3178, 1762, 1648, cm⁻¹

SM (ESI⁺) 766 [M+H]⁺

[α]_D²² = +73 (c 0,16 ; AcOEt)

(3S,6S)-3,6-diallylpipérazine-2,5-dione (157-(3S,6S))

C₁₀H₁₄N₂O₂



Masse molaire : 194,23 g.mol⁻¹

A une solution dioxopipérazine **126-(1S,3S,4S,6S)** (0.060 g, 0.13 mmol, 1.0 éq) dans un mélange d'ammoniac (1 mL) et de THF (1 mL) est ajouté du lithium (0.015 g, 0.78 mmol, 6.0 éq). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 minutes puis le mélange est ramené à 20 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (95:5 DCM/MeOH puis 80:1:19 DCM/NH₄OH/MeOH) permettant d'obtenir la dioxopipérazine **157-(3S,6S)** sous la forme d'une pâte blanche (0.019 g, 75 %).

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 5.70 (dddd, *J* = 16.1, 10.3, 8.7, 5.8 Hz, 2H, H₃), 5.27 – 5.12 (m, 4H, H₄), 3.97 (dd, *J* = 9.0, 3.8 Hz, 2H, H₁), 2.83 – 2.72 (m, 2H, H₂), 2.37 (ddd, *J* = 14.2, 9.0, 8.7 Hz, 2H, H₂).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) δ 167.1 (C₅), 132.2 (C₃), 120.8 (C₄), 53.7 (C₁), 37.7 (C₂).

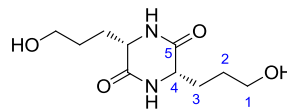
IR ν_{max} = 2973, 1643, 1422, 1213 cm⁻¹

[α]_D²² = +59 (c 0,13 ; H₂O)

SM (ESI⁺) 195 [M+H]⁺

(3S,6S)-3,6-bis(3-hydroxypropyl)pipérazine-2,5-dione (158-(3S,6S))

C₁₀H₁₈N₂O₄



Masse molaire : 230,26 g.mol⁻¹

A une solution de dioxopipérazine dialkylée **157-(3S,6S)** (0.100 g, 0.51 mmol, 1.0 éq) dans du THF distillé (2 mL) est ajouté une solution de 9-BBN (3.1 mL, 3.06 mmol, 6.0 éq) à 0.5 M dans du THF. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 20 °C pendant 3 heures puis ce milieu est refroidi à 0°C. A cette température, une solution aqueuse de soude 6.0 M (0.7 mL), de l'eau oxygénée (0.2 mL) et de l'éthanol (1.04 mL) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant 1h. Le milieu est extrait avec de l'AcOEt (3 x 5 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (5:5 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir le diol **158-(3S,6S)** sous la forme d'une huile jaune (0.068 g, 57 %).

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 4.69 – 4.34 (m, 2H, H₄), 3.79 – 3.33 (m, 4H, H₁), 2.53 – 2.29 (m, 2H, H₃), 2.17 (m, 2H, H₃), 1.98 (ddt, *J* = 12.9, 7.3, 3.6 Hz, 2H, H₂), 1.74 – 1.43 (m, 2H, H₂).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) 167.8 (C₅), 61.2 (C₁), 56.5 (C₄), 31.3 (C₂), 28.7(C₃).

IR ν_{max} = 3451, 1662, 1228 cm⁻¹

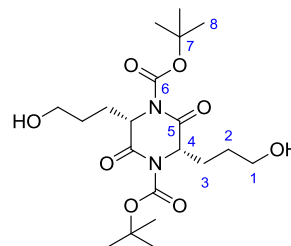
SM (ESI⁺) 231 [M+H]⁺

[α]_D²² = +51 (c 0,12 ; H₂O)

2,5-bis(3-hydroxypropyl)-3,6-dioxopipérazine-1,4-dicarboxylate de (2S,5S)-di-tert-butyle 163-(3S,6S)

C₂₀H₃₄N₂O₈

Masse molaire : 430,49 g.mol⁻¹



A une solution de diester **180-(3S,6S)** (0.245 g, 0.50 mmol, 1.0 éq) dans du MeOH (5 mL) à 0 °C est ajouté du NaBH₄ (0.042 g, 1.11 mmol, 2.2 éq). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 20 °C pendant 16 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (5:95 MeOH/DCM puis 10:90 MeOH/DCM) permettant d'obtenir le diol **163-(3S,6S)** sous la forme d'une huile jaune (0.146 g, 68%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5.07 – 4.82 (m, 2H, H₄), 3.77 – 3.68 (m, 2H, H₁), 3.65 – 3.59 (m, 2H, H₁), 2.33 (m, 2H, H₃), 2.28 – 2.19 (m, 2H, H₃), 1.89 – 1.81 (m, 2H, H₂), 1.81 – 1.64 (m, 2H, H₂), 1.43 (s, 18H, H₈).

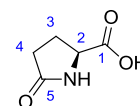
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 164.3 (C₅), 152.5 (C₆), 83.2 (C₇), 61.4 (C₁), 56.0 (C₄), 31.3(C₂), 30.5 (C₃), 27.6 (C₈).

IR √_{max} = 3327, 1758, 1667, 1518 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 431 [M+H]⁺

[α]_D²² = +91 (c 0,67 ; MeOH)

(S)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid (166-(S))



$C_5H_7NO_3$

Masse molaire : 129,11 g.mol⁻¹

Du glutamate commercial **133-(S)** (1.00 g, 6.80 mmol, 1.0 éq) est dissout dans de l'eau distillée. La solution obtenue est mise aux microondes à 170°C pendant 15min puis le mélange est ramené à 20 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite permettant d'obtenir la pyrrolidine **166-(S)** sous la forme d'une poudre blanche (0.88 g, quantitatif)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4.13 – 3.98 (m, 1H, H₂), 2.74 – 2.58 (m, 1H, H₃), 2.56 – 2.40 (m, 1H, H₃), 2.28 (m, 2H, H₄).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 174.3 (C₅), 171.5 (C₁), 58.3 (C₂), 29.6 (C₄), 25.3 (C₃).

IR $\nu_{\max}$ = 3268, 1738, 1652, 1358 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 130 [M+H]⁺

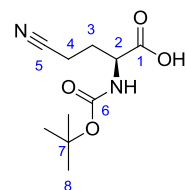
T_f (°C) : 182°C

[α]_D²² = +23 (c 0,84 ; MeOH)

Acide (S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-cyanobutanoïque (167-(S))

C₁₀H₁₆N₂O₄

Masse molaire : 228,25 g.mol⁻¹



A une solution de Boc-glutamine **169-(S)** (14.20 g, 57.7 mmol, 1.0 éq) dans de la pyridine (60 mL) est ajouté de l'anhydride acétique (6.50 g, 69.2 mmol, 1.2 éq). Le milieu réactionnel est agité pendant 18 heures. De l'AcOEt (100 mL) est ajouté puis la phase organique est lavée avec une solution d'acide chlorhydrique 6 M (3 x 100 mL). Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (90:10 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir le nitrile **167-(S)** sous la forme d'une huile incolore (11.98 g, 91%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4.77 (dd, *J* = 7.0, 5.8 Hz, 1H, H₂), 3.00 (ddd, *J* = 12.4, 7.8, 3.2 Hz, 1H, H₄), 2.85 – 2.62 (m, 1H, H₂), 2.39 (ddd, *J* = 12.5, 5.8, 2.0 Hz, 1H, H₃), 2.26 – 2.08 (m, 1H, H₃), 1.44 (s, 9H, H₈).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.3 (C₁), 156.0 (C₆), 118.9 (C₅), 79.6 (C₇), 52.8 (C₂), 28.5 (C₃), 27.4 (C₈), 23.0 (C₄).

IR ν_{max} = 3393, 3124, 2243, 1124 cm⁻¹

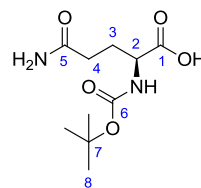
SM (ESI) 227 [M-H]⁻

[α]_D²² = +19 (c 0,12 ; AcOEt)

Acide (S)-5-amino-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoïque (169-(S))

$C_{10}H_{18}N_2O_5$

Masse molaire : 246,26 g.mol⁻¹



Le composé **169-(S)** est obtenu à partir de la (S)-glutamine commerciale **131-(S)** (1.00 g,) selon la méthode générale de protection des fonctions amines par un groupement Boc (Méthode 2.4) avec un rendement de 83% (huile incolore, 1.40 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.85 (dd, *J* = 9.1, 4.9 Hz, 1H, H₂), 2.12 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H₄), 1.98 – 1.82 (m, 1H, H₃), 1.71 (ddd, *J* = 13.6, 9.1, 7.6 Hz, 1H, H₃), 1.38 (s, 9H, H₈).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.4 (C₅), 173.3 (C₁), 154.7 (C₆), 79.7 (C₇), 53.1 (C₂), 31.5 (C₄), 28.3 (C₈), 26.7 (C₃).

IR $\nu_{\max}$ = 3321, 3152, 1642, 1583 cm⁻¹

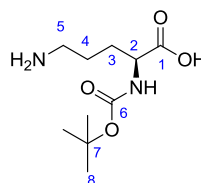
SM (ESI⁺) 247 [M+H]⁺

[α]_D²² = +13 (c 0,31 ; AcOEt)

Acide (S)-5-amino-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pentanoïque (172-(S))

$C_{10}H_{20}N_2O_4$

Masse molaire : 232,28 g.mol⁻¹



A une solution de nitrile **167-(S)** (8.30 g, 36.4 mmol, 1.0 éq) dans du méthanol (150 mL) est ajouté du Pd(OH)₂ (0.127 g, 0.18 mmol, 0.05 éq). Le milieu réactionnel est mis sous atmosphère de dihydrogène puis le mélange est agité à 20 °C pendant 5h. Le milieu est filtré sur célite puis le filtrat est évaporé sous pression réduite permettant d'obtenir la Boc-ornithine **172-(S)** sous la forme d'une huile incolore (6.51 g, 77%)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4.61 (dd, *J* = 6.7, 4.3 Hz, 1H, H₂), 3.16 (td, *J* = 12.4, 2.5 Hz, 1H, H₅), 2.95 (ddd, *J* = 13.8, 4.2, 1.9 Hz, 1H, H₅), 2.27 – 2.09 (m, 1H, H₃), 2.01 – 1.90 (m, 1H, H₃), 1.73 – 1.61 (m, 2H, H₄), 1.44 (s, 9H, H₈).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 174.3 (C₁), 155.7 (C₆), 79.1 (C₇), 53.3 (C₂), 39.6 (C₅), 29.0 (C₃), 27.9 (C₈), 25.6 (C₄).

IR $\nu_{\max}$ = 3328, 3175, 1033 cm⁻¹

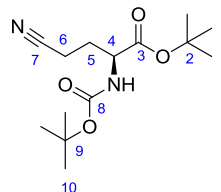
SM (ESI⁺) 231 [M-H]⁻

[α]_D²² = +16 (c 0,32 ; MeOH)

(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-cyanobutanoate de *tert*-butyle (177-(S))

C₁₄H₂₄N₂O₄

Masse molaire : 284,35 g.mol⁻¹



A une solution de nitrile **167-(S)** (0.100 g, 0.44 mmol, 1.0 éq) dans du DCM (2 mL) est ajouté du MgSO₄ (0.211 g, 1.76 mmol, 4.0 éq) et une solution d'acide sulfurique 1M dans du DCM (0.44mL, 0.44 mmol, 1eq). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes puis du *tert*-butanol (0.208 mL, 2.20 mmol, 5 éq) est ajouté. Après trois jours, le milieu est lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (8:2 Cyclohexane/EtOAc) permettant d'obtenir l'ester **177-(S)** sous la forme d'une huile incolore (0.015 g, 12%)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.30 – 4.20 (m, 1H, H₄), 2.43 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H₆), 2.30 – 2.20 (m, 1H, H₅), 1.97 (m, 1H, H₅), 1.47 (s, 18H, H_{1,10}).

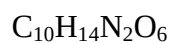
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.5 (C₃), 156.2 (C₈), 118.7 (C₇), 81.1 (C₂), 79.6 (C₉), 53.4 (C₄), 29.4 (C₅), 28.3(C₁₀), 27.1 (C₁), 24.9(C₆).

IR ν_{max} = 2240, 1623, 1218 cm⁻¹

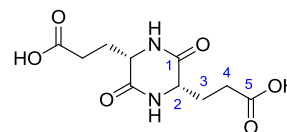
SM (ESI⁺) 285 [M+H]⁺

[α]_D²² = +16 (c 0,15 ; AcOEt)

Acide 3,3'-((2*S*,5*S*)-3,6-dioxopipérazine-2,5-diyl)dipropanoïque 179-(3*S*,6*S*)



Masse molaire : 258,23 g.mol⁻¹



De la dioxopipérazine **132-(3*S*,6*S*)** (4.53 g, 20.4 mmol, 1.0 éq) est dissoute dans de l'acide sulfurique, à 0 °C. Après quelques minutes, de l'eau distillée (100 mL) est ajoutée. Le précipité formé est alors filtré et séché pour donner le diacide **179-(3*S*,6*S*)** sous la forme d'une poudre blanche (4.00 g, 76%).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.85 (dd, *J* = 6.5, 5.1 Hz, 2H, H₂), 2.44-2.22 (m, 4H, H₄), 2.01-1.83 (m, 4H, H₃).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.9 (C₅), 167.9 (C₁), 53.3 (C₂), 29.4 (C₄), 28.2 (C₃).

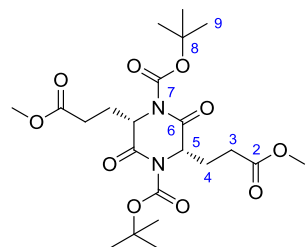
IR ν_{max} = 3358, 3129, 1737, 1658 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 257 [M-H]⁻

[α]_D²² = +87 (c 0,56 ; AcOEt)

(2*S*,5*S*)-2,5-bis(3-méthoxy-3-oxopropyl)-3,6-dioxopipérazine-1,4-dicarboxylate de di-*tert*-butyle (180-(3*S*,6*S*))

C₂₂H₃₄N₂O₁₀



Masse molaire : 486,51 g.mol⁻¹

A une solution de dioxopipérazine **185-(3*S*,6*S*)** (0.20 g, 0.69 mmol, 1.0 éq) dans du DMF (50 mL) est ajouté DMAP (0.084 g, 0.69 mmol, 1.0 éq) et du Boc₂O (0.331 g, 1.52 mmol, 2.2 éq). Le milieu réactionnel est laissé à 20 °C sous agitation pendant 18 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash (3:97 MeOH/DCM puis 7:93 MeOH/DCM) permettant d'obtenir la dioxopipérazine **180-(3*S*,6*S*)** protégée sous la forme d'une huile jaune vif (0.245 g, 73 %)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5.07 – 4.82 (m, 2H, H₅), 3.67 (m, 6H, H₁), 3.09 (m, 2H, H₄), 2.96 (m, 2H, H₄), 2.39 – 2.27 (m, 2H, H₃), 2.28 – 2.19 (m, 2H, H₃), 1.43 (s, 18H, H₉).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 164.1 (C₅), 152.6 (C₆), 83.8 (C₇), 61.2 (C₁), 56.1 (C₄), 31.5 (C₂), 30.2 (C₃), 27.9 (C₈).

IR ν_{max} = 1767, 1639, 1543, 1269 cm⁻¹

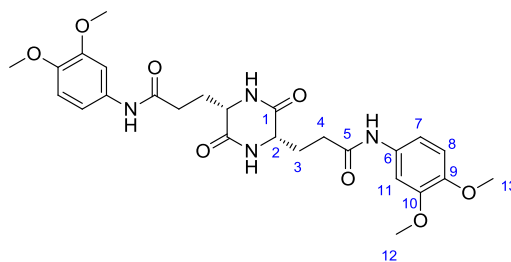
SM (ESI⁺) 487 [M+H]⁺

[α]_D²² = +63 (c 0,47 ; MeOH)

**3,3'-((2*S*,5*S*)-3,6-dioxopipérazine-2,5-diyl)bis(*N*-(3,4-diméthoxyphényl)propanamide)
181-(3*S*,6*S*).**

C₂₆H₃₂N₄O₈

Masse molaire : 528,55 g.mol⁻¹



A une solution de dioxopipérazine **132-(3*S*,6*S*)** (0.100 g, 0.45 mmol, 1.0 éq) dans du DMF (50 mL) est ajouté de l'acide sulfurique (5 gouttes) et du méthanol (5mL). Le milieu réactionnel est agité à 20 °C pendant 2 heures puis le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est recristallisé dans le méthanol permettant d'obtenir **181-(3*S*,6*S*)** sous la forme d'un solide blanc (0.081 g, 34%)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.77– 7.04 (m, 6H, H_{7,8,11}), 4.77 (dd, *J* = 5.8, 3.1 Hz, 2H, H₂), 3.88 (s, 12H, H_{12,13}), 3.10 – 2.87 (m, 4H, H₄), 2.67 (ddd, *J* = 12.3, 9.9, 6.1, Hz, 4H, H₄), 2.38 – 2.24 (m, 2H, H₃), 2.17 (m, 2H, H₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 172.8 (C₅), 167.3 (C₁), 147.2 (C_{Ar}), 141.9 (C_{Ar}), 136.5 (C_{Ar}), 117.9 (C_{Ar}), 115.3 (C_{Ar}), 107.2 (C_{Ar}), 56.7 (C₁₂), 56.0 (C₁₃), 53.4 (C₂), 36.5 (C₄), 29.6 (C₃).

IR ν_{max} = 2358, 1784, 1641, 1539, 1304 cm⁻¹

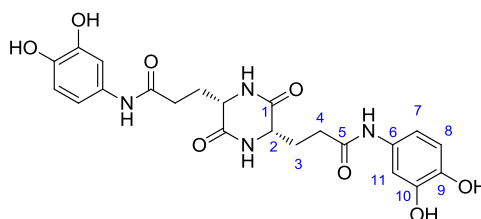
[α]_D²² = +18 (c 0,05 ; AcOEt)

SM (ESI⁺) 529 [M+H]⁺

**3,3'-((2*S*,5*S*)-3,6-dioxopipérazine-2,5-diyl)bis(*N*-(3,4-diméthoxyphényl)propanamide)
(**182**-(3*S*,6*S*))**

C₂₂H₂₄N₄O₈

Masse molaire : 472,45 g.mol⁻¹



A une solution de dioxopipérazine **181**-(3*S*,6*S*) (0.081 g, 0.15 mmol, 1.0 éq) dans du DMF (1 mL) est ajouté du AlCl₃ (0.91 g, 0.68 mmol, 4.5 éq) et du NaI (0.102 g, 0.68 mmol, 1.2 éq). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut obtenu est purifié par recristallisation dans un mélange Eau/Acétone permettant d'obtenir le dicatéchol **182**-(3*S*,6*S*) sous la forme d'une poudre blanche (0.060 g, 83%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.65– 6.59 (m, 6H, H_{7,8,11}), 4.74 – 4.61 (m, 2H, H₂), 3.05 – 2.92 (m, 2H, H₄), 2.38 (ddd, *J* = 12.4, 9.4, 6.8 Hz, 2H, H₄), 2.29 – 2.06 (m, 4H, H₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 172.6 (C₅), 167.6 (C₁), 146.0 (C_{Ar}), 135.1 (C_{Ar}), 116.2 (C_{Ar}), 115.5 (C_{Ar}), 104.9 (C_{Ar}), 53.4 (C₂), 36.1 (C₄), 29.1 (C₃).

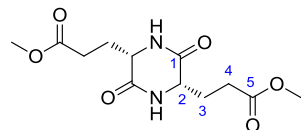
IR ν_{max} = 3257, 1769, 1678, 1511, 1034 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 473 [M+H]⁺

[α]_D²² = +43 (c 0,31 ; AcOEt)

3,3'-((2*S*,5*S*)-3,6-dioxopipérazine-2,5-diyl)dipropanoate de diméthyle (185-(3*S*,6*S*))

2. C₁₂H₁₈N₂O₆



Masse molaire : 286,28 g.mol⁻¹

A une solution de dioxopipérazine **132-(3*S*,6*S*)** (3.00 g, 13.5 mmol, 1.0 éq) dans du DMF (50 mL) est ajouté de l'acide sulfurique (5 gouttes) et du méthanol (5mL). Le milieu réactionnel est agité à 20 °C pendant 2 heures puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu brut obtenu est recristallisé dans le méthanol permettant d'obtenir le diester **185-(3*S*,6*S*)** sous la forme d'un solide blanc (1.31 g, 34%).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.89 (dd, *J* = 6.5, 5.9Hz, 2H, H₂), 3.59 (s, 6H, H₆), 2.44-2.37 (m, 4H, H₄), 2.05- 1.84 (m, 4H, H₃).

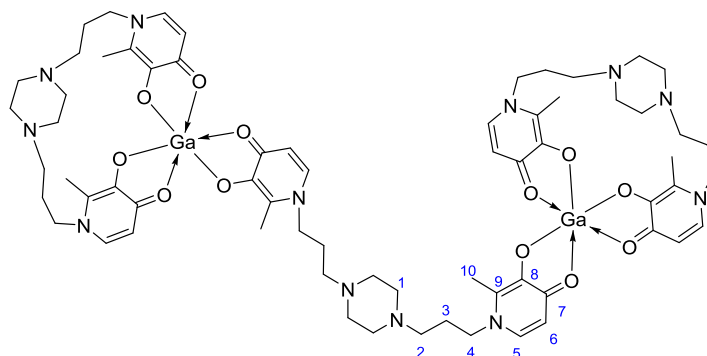
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.8 (C₅), 167.8 (C₁), 53.1(C₂), 51.4 (C₆), 29.1 (C₄), 28.0 (C₃).

IR ν_{max} = 1739, 1678, 1183 cm⁻¹

SM (ESI⁺) 287 [M+H]⁺

[α]_D²² = +68 (c 0,29 ; AcOEt)

Tri(1,1'-(pipérazine-1,4-diylbis(propane-3,1-diyl))bis(3-hydroxy-2-méthylpyridin-4(1H)-one) di-Ga(III) (190)



$C_{66}H_{90}Ga_2N_{12}O_{12}$

Masse molaire : 1382,96 g.mol⁻¹

A une solution de pipérazine **105a** (13.0 mg, 0.031 mmol, 1.5 éq) dans du méthanol (10 mL) a été ajouté une solution de Ga(NO₃)₃ (5.3 mg, 0.021 mmol, 1 éq) dans du méthanol (1 mL). La solution a été agitée 10 min à 20 °C puis le solvant a été évaporé sous pression réduite pour fournir une poudre marron (18 mg 93% basé sur le Ga(III))

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.39 (d, , 6H, H₅), 7.27 (d, *J* = 4.2 Hz, 6H, H₆), 4.54 (t, *J* = 4.5 Hz, 12H, H₄), 3.72 (se, 24H, H₁), 3.37 (t, *J* = 4.5 Hz, 12H, H₂), 2.69 (s, 18H, H₁₀), 2.39 (q, *J* = 4.7 Hz, 12H, H₁₀).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.9 (C₇), 145.3 (C₈), 143.5 (C₉), 139.3 (C₅), 112.0 (C₆), 54.6 (C₄), 54.2 (C₃), 50.2 (C₁), 25.9 (C₃), 12.9 (C₁₀).

Références Bibliographiques

- [1] Futura-sciences. <http://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-bacterie-101/>. 2017.
- [2] Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1193.
- [3] Amazonaws.<https://classconnection.s3.amazonaws.com/1799/flashcards/780987/png/grampositive.png>. 2017.
- [4] Center for biofilms engineering, Montana State University, P Dirckx.
- [5] Johnson DB, Kanao T, Hedrich S. Redox transformations of iron at extremely low pH: Fundamental and applied aspects. *Front. Microbiol.* **2012**;3:1–13.
- [6] Roosenberg J, Lin Y, Lu Y, *et al.* Studies and Syntheses of Siderophores, Microbial Iron Chelators, and Analogs as Potential Drug Delivery Agents. *Curr. Med. Chem.* **2000**;7:159–197.
- [7] Frederick RE, Mayfield JA, DuBois JL. Iron trafficking as an antimicrobial target. *BioMetals.* **2009**;22:583–593.
- [8] Ji C, Juárez-Hernández RE, Miller MJ. Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates. *Future Med. Chem.* **2012**;4:297–313.
- [9] Weaver EA, Wyckoff EE, Mey AR, *et al.* FeoA and FeoC are essential components of the vibrio cholerae ferrous iron uptake system, and FeoC interacts with FeoB. *J. Bacteriol.* **2013**;195:4826–4835.
- [10] Cartron L, Maddocks S, Gillingham P, *et al.* Feo – Transport of ferrous iron into bacteria. *BioMetals.* **2006**;19:143–157.
- [11] Schauer K, Rodionov DA, De Reuse H. New substrate for TonB-dependent transport : do we only see the “tip of the iceberg” ? *Trends Biochem. Sci.* **2008**;33:330–338.
- [12] Schirmer T. General and specific porins from bacterial outer membranes. *J. Struct. Biol.* **1998**;121:101–109.
- [13] Cope LD, Love RP, Guinn SE, *et al.* Involvement of HxuC Outer Membrane Protein in Utilization of Hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immu.* **2001**;69:2353–2363.
- [14] Krewulak KD, Vogel HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**;1778:1781–1804.

- [15] Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**;27:637.
- [16] Ferguson AD, Hofmann E, Coulton JW, *et al.* Siderophore-Mediated Iron Transport: Crystal Structure of FhuA with Bound Lipopolysaccharide. *Science.* **1998**;282:2215–2220.
- [17] Ferguson AD, Chakraborty R, Smith BS, *et al.* Structural Basis of Gating by the Outer Membrane Transporter FecA, *American Association for the Advancement of Science.* **2002**;295:1715–1719.
- [18] Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, *et al.* Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **1999**;6:56–63.
- [19] Cobessi D, Celia H, Folschweiller N, *et al.* The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **2005**;347:121–134.
- [20] Cobessi D, Celia H, Pattus F. Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **2005**;352:893–904.
- [21] Locher KP, Rees B, Koebnik R, *et al.* Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell.* **1998**;95:771–778.
- [22] Ferguson AD, Breed J, Diederichs K, *et al.* An internal affinity-tag for purification and crystallization of the siderophore receptor FhuA, integral outer membrane protein from *Escherichia coli* K-12. *Protein Sci.* **1998**;7:1636–1638.
- [23] Yue WW, Grizot S, Buchanan SK. Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *J. Mol. Biol.* **2003**;332:353–368.
- [24] Larsen RA, Thomas MG, Postle K. Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **1999**;31:1809–1824.
- [25] Evans JS, Levine BA, Trayer IP, *et al.* Sequence-imposed structural constraints in the TonB protein of *E. coli*. *FEBS Lett.* **1986**;208:211–216.

- [26] Shirley M, Lamont IL. Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2009**;191:5634–5640.
- [27] Cadieux N, Bradbeer C, Kadner RJ. Sequence changes in the Ton box region of BtuB affect its transport activities and interaction with TonB protein. *J. Bacteriol.* **2000**;182:5954–5961.
- [28] Clarke TE, Braun V, Winkelmann G, *et al.* X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. *J. Biol. Chem.* **2002**;277:13966–13972.
- [29] Carter DM, Miousse IR, Gagnon JN, *et al.* Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD. *J. Biol. Chem.* **2006**;281:35413–35424.
- [30] Braun V. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **2001**;291:67–79.
- [31] Jones HW. Report of a series of cases of syphilis treated by Ehrlich's arsenobenzol at the Walter Reed general hospital, district of columbia. *Bost. Med. Surg. J.* **1911**;164:381–383.
- [32] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**;10:226–236.
- [33] U.S. Department of Health and Human Services. *Antibiotic resistance threats in the United States*, **2013**
- [34] Horsburgh CR, Barry CE, Lange C. Treatment of *Tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* **2015**;373:2149–2160.
- [35] Cox E, Laessig K. *N. Eng. J. Med.* **2014**;689-691.
- [36] Pinho MG, Kjos M, Veening J. How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**;11:601–614.
- [37] Higgins NP. Under DNA stress, gyrase makes the sign of the cross. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**;14:256–258.
- [38] Howard BMA, Pinney RJ, Smith JT. Function of the SOS process in repair of DNA damage induced by modern 4-quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.* **1993**;45:658–662.

- [39] Chen C, Malik M, Snyder M, *et al.* DNA Gyrase and Topoisomerase IV on the Bacterial Chromosome: Quinolone-induced DNA Cleavage. *J. Mol. Biol.* **1996**;258:627–637.
- [40] Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**;57:1451–1470.
- [41] Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, *et al.* Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb. Pathog.* **2016**;95:32–42.
- [42] Webber MA, Piddock LJ V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**;51:9–11.
- [43] Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, *et al.* Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* : Novel Agents for Combination Therapy Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* . *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**;45:105–116.
- [44] Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, *et al.* Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: The inhibitor response strategy. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**;59:1223–1229.
- [45] Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli* . *Journal of Bacteriology.* **1997**;179:2512–2518.
- [46] Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**;12:215–223.
- [47] Jabes D. The antibiotic R&D pipeline: An update. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**;14:564–569.
- [48] Hagihara M, Crandon JL, Nicolau DP. The efficacy and safety of antibiotic combination therapy for infections caused by Gram-positive and Gram-negative organisms. *Expert Opin. Drug Saf.* **2012**;11:221–233.
- [49] Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP, *et al.* *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology.* **2011**.
- [50] Couvreur P. La vectorisation des médicaments ou comment moduler la distribution tissulaire et cellulaire de molécules biologiquement actives. *Ann. Pharm. Fr.*

2008;59:232–238.

- [51] Chitambar CR, Narasimhan J. Targeting Iron-Dependant DNA synthesis with Gallium and Transferrin-Gallium. *Pathobiology*. **1991**;59:3–10.
- [52] Stojiljkovic I, Kumar V, Srinivasan N. Non-iron metalloporphyrins: Potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **1999**;31:429–442.
- [53] Kaneko Y, Thoendel M, Olakanmi O, *et al.* The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J. Clin. Invest.* **2007**;117:877–888.
- [54] Braun V, Pramanik A, Gwinner T, *et al.* Sideromycins: Tools and antibiotics. *BioMetals*. **2009**;22:3–13.
- [55] Ganne G, Brillet K, Basta B, *et al.* Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chem. Biol.* **2017**;12:1056–1065.
- [56] McPherson CJ, Aschenbrenner LM, Lacey BM, *et al.* Clinically relevant Gram-negative resistance mechanisms have no effect on the efficacy of MC-1, a novel siderophore-conjugated monocarbam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**;56:6334–6342.
- [57] Basilea Pharmaceutica. *Basilea reports 2016 half-year results*. **2016**.
- [58] Hackel MA, Tsuji M, Yamano Y, *et al.* *In Vitro* activity of the siderophore Cephalosporin, Cefiderocol, against a recent collection of clinically relevant Gram-negative bacilli from North America and Europe, including Carbapenem non-susceptible isolates: The SIDERO-WT-2014 Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**. AAC-00093.
- [59] Paech F, Messner S, Spickermann J, *et al.* Mechanisms of hepatotoxicity associated with the monocyclic β -lactam antibiotic BAL30072. *Arch. Toxicol.* **2017**;
- [60] Banin E, Lozinski A, Brady KM, *et al.* The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**;105:16761–16766.
- [61] Banin E, Vasil ML, Greenberg EP. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

- formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**;102:11076–11081.
- [62] Llamas MA, Sparrius M, Kloet R, *et al.* The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2006**;188:1882–1891.
- [63] Antunes LCS, Imperi F, Minandri F, *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**;56:5961–5970.
- [64] Chevion M. Protection against free radical-induced and transition metal-mediated damage: the use of “pull” and “push” mechanisms. *Free Radic. Res. Commun.* **1991**;13:691–696.
- [65] Karck M, Tanaka S, Berenshtein E, *et al.* The push-and-pull mechanism to scavenge redox-active transition metals: A novel concept in myocardial protection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2001**;121:1169–1178.
- [66] Fardeau S, Dassonville-Klimpt A, Audic N, *et al.* Synthesis and antibacterial activity of catecholate-ciprofloxacin conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**;22:4049–4060.
- [67] Antonietti V, Boudesocque S, Dupont L, *et al.* Synthesis, iron(III) complexation properties, molecular dynamics simulations and *P. aeruginosa* siderophore-like activity of two pyoverdine analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**;137:338–350.
- [68] Spasojević I, Armstrong SK, Brickman TJ, *et al.* Electrochemical behavior of the fe(iii) complexes of the cyclic hydroxamate siderophores alcaligin and Desferrioxamine E. *Inorg. Chem.* **1999**;38:449–454.
- [69] Garnerin T, Sonnet P. Fungal hydroxamate siderophores: biosynthesis, chemical synthesis and potential medical applications, *Antimicrobial Research*, **2017**:477–488.
- [70] Isowa Y, Takashima T, Ohmori M, *et al.* Synthesis of rhodotorulic Acid. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1972**;45:1467–1471.
- [71] Fujii T, Hatanaka Y. A synthesis of rhodotorulic acid. *Tetrahedron.* **1973**;29:3825–3831.
- [72] Rothstein M, Claus CJ. A new synthesis of DL-lysine-6-C₁₄ and DL- α -aminoadipic acid-6-C₁₄. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**;73:2981–2982.
- [73] Widmer J, Keller-Schierlein W. Synthesen in der sideramin-reihe: rhodotorulasaure

- und dimerumsaure. *Helv. Chim. Acta.* **1974**;57:1904–1912.
- [74] Lee BH, Gerfen GJ, Miller MJ. Constituents of microbial iron chelators. Alternate syntheses of delta-*N*-hydroxy-L-ornithine derivatives and applications to the synthesis of rhodotorulic acid. *J. Org. Chem.* **1984**;49:2418–2423.
- [75] Nakao M, Fukayama S, Kitaike S, *et al.* Synthesis of rhodotorulic acid and its 1,4-dimethylated derivative. *Heterocycles.* **2015**;90:1309–1316.
- [76] Badran T, Chai C, Easton C, *et al.* No-directing bromination of piperazine-2,5-diones. *Aust. J. Chem.* **1995**;48:1379–1384.
- [77] Badran TW, Easton CJ, Horn E, *et al.* A new α -haloglycine template for the asymmetric synthesis of amino acid derivatives, *Tetrahedron Asymmetry.* **1993**;4:197–200.
- [78] Kardassis G, Brungs P, Stekhan E. Electrogenated chiral cationic glycine equivalents - part 1: the 6-methoxy derivative of cyclo(l-pro-gly). *Tetrahedron.* **1998**;54:3471–3478.
- [79] Bull SD, Davies SG, Garner C, *et al.* Chiral glycine cation equivalents: *N*-acyliminium species derived from diketopiperazines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* **2002**;2442–2448.
- [80] Bull SD, Davies SG, Garner C, *et al.* On the origins of diastereoselectivity in the alkylation of diketopiperazine enolates. *New J. Chem.* **2007**;31:486–495.
- [81] Bull SD, Davies SG, Garner AC, *et al.* 2-Halo-diketopiperazines as chiral glycine cation equivalents. *Tetrahedron Asymmetry.* **2004**;15:3989–4001.
- [82] Balducci D, Lazzari I, Monari M, *et al.* (S)- α -methyl, α -amino acids: A new stereocontrolled synthesis. *Amino Acids.* **2010**;38:829–837.
- [83] Orena M, Porzi G, Sandri S. Diastereoselective alkylation of (3*S*)- and (3*R*)-3-methylpiperazine-2,5-dione derivatives. A convenient approach to both (S)- and (R)-alanin. *J Org. Chem.* **1992**;65:32–6536.
- [84] Porzi G, Sandri S. Synthesis of (3*R*,6*R*)- and (3*S*,6*S*)-3,6-dialkylpiperazin-2,5-dione derivatives as useful intermediates to both (R) and (S) α -aminoacids. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1994**;5:453–464.
- [85] Aitken DJ, Royer J, Husson H. Asymmetric synthesis of 2, 3-methanohomoserine : a

- General Approach to Chiral 2-Substituted Cyclopropane Amino Acids^{1,2} Introduction developed in recent years on account of the diverse bio- bearing substituents at the cyclopropane C-2 are known. *J. Org. Chem.* **1990**;2814–2820.
- [86] Schanen V, Riche C, Chiaroni A, *et al.* Asymmetric synthesis. XXXI. Synthesis of 2-substituted piperazines from chiral non-racemic lactams. *Tetrahedron Lett.* **1994**;35:2533–2536.
- [87] Franceschini N, Sonnet P, Guillaume D. Simple, versatile and highly diastereoselective synthesis of 1,3,4-trisubstituted-2-oxopiperazine-containing peptidomimetic precursors. *Org. Biomol. Chem.* **2005**;3:787–793.
- [88] Lencina CL, Dassonville-Klimpt A, Sonnet P. New efficient enantioselective synthesis of 2-oxopiperazines: a practical access to chiral 3-substituted 2-oxopiperazines. *Tetrahedron Asymmetry.* **2008**;19:1689–1697.
- [89] Pillon M. Ligands des ions Fer(III) de structure pipérazinique : Synthèse, étude physico-chimique et évaluation de leurs propriétés antibactériennes, *Thèse de doctorat*, UPJV, **2014**.
- [90] Greene TW, Wuts PGM, Protective OF a, *et al.* *Prot. Groups Org. Synth.* **1999**.
- [91] Franceschini N. Synthèse énantiosélective de motifs rigidificateurs du squelette peptidique, *Thèse de doctorat*, UPJV **2004**.
- [92] Hansen MM, Harkness AR, Khau V V., *et al.* Synthesis of enantioenriched 4-thiazolidinone (-)-LY213829 by chemoselective benzylamide cleavage in the presence of a C-S bond. *Tetrahedron Asymmetry.* **1996**;7:2515–2518.
- [93] Bruckner R. *Organic Mechanisms.* **2010**.
- [94] Farvacques N. Synthèse et étude de nouveaux analogues de pyoverdine à visée antibactérien. *Thèse de doctorat*, UPJV. **2014**.
- [95] Herman AM, Johnson JS. Copper-catalyzed electrophilic amination of organozinc nucleophiles: Documentation of *O*-benzoyl hydroxylamines as broadly useful R²N(+) and RHN(+) synthons. *J. Org. Chem.* **2006**;71:219–224.
- [96] Parrish DA, Mathias LJ. Five- and six-membered ring opening of pyroglutamic diketopiperazine. *J. Org. Chem.* **2002**;67:1820–1826.
- [97] Steinhauser S, Heinz U, Bartholomä M, *et al.* Complex formation of ICL670 and

- related ligands with FeIII and FeII. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**;4177–4192.
- [98] Rouge P, Dassonville-Klimpt A, Cézard C, *et al.* Synthesis, physicochemical studies, molecular dynamics simulations, and metal-ion-dependent antiproliferative and antiangiogenic properties of cone ICL670-substituted calix[4]arenes. *Chempluschem.* **2012**;77:1001–1016.
- [99] Woolley EM, Hepler LG. Apparent ionization constants of water in aqueous organic mixtures and acid dissociation constants of protonated co-solvents in aqueous solution, *Analytical Chemistry* **1972**;44:1970–1973.
- [100] Gustafson RL, Martell AE. Hydrolytic tendencies of ferric chelates. *J. Phys. Chem.* **1963**;67:576–582.
- [101] McLendon G, Motekaitis RJ, Martell AE. Kinetics and mechanism of μ -oxo dimer formation by ethylenediaminetetraacetatoiron(III) [FeEDTA]. *Inorg. Chem.* **1976**;15:2306–2308.
- [102] Leite A, Silva AMG, Nunes A, *et al.* Novel tetradentate chelators derived from 3-hydroxy-4-pyridinone units: synthesis, characterization and aqueous solution properties. *Tetrahedron.* **2011**;67:4009–4016.
- [103] Harrington JM, Chittamuru S, Dhungana S, *et al.* Synthesis and iron sequestration equilibria of novel exocyclic 3-hydroxy-2-pyridinone donor group siderophore mimics. *Inorg. Chem.* **2010**;49:8208–8221.
- [104] Chaves S, Marques SM, Matos AMF, *et al.* New tris(hydroxypyridinones) as iron and aluminium sequestering agents: Synthesis, complexation and *in vivo* studies. *Chem. - A Eur. J.* **2010**;16:10535–10545.
- [105] Nurchi VM, Crisponi G, Pivetta T, *et al.* Potentiometric, spectrophotometric and calorimetric study on iron(III) and copper(II) complexes with 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone. *J. Inorg. Biochem.* **2008**;102:684–692.
- [106] Nurchi VM, Crisponi G, Lachowicz JI, *et al.* Iron(III) and aluminum(III) complexes with hydroxypyrrone ligands aimed to design kojic acid derivatives with new perspectives. *J. Inorg. Biochem.* **2010**;104:560–569.
- [107] Nurchi VM, Crisponi G, Arca M, *et al.* A new bis-3-hydroxy-4-pyrone as a potential therapeutic iron chelating agent. Effect of connecting and side chains on the complex structures and metal ion selectivity. *J. Inorg. Biochem.* **2014**;141:132–143.

- [108] Enyedy ÉA, Dömötör O, Varga E, *et al.* Comparative solution equilibrium studies of anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and hydroxy(thio)pyrone ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2012**;117:189–197.
- [109] Bazzicalupi C, Bencini A, Bianchi A, *et al.* Synthesis and characterisation of two new catechol-based iron(in) ion-sequestering agents. *J. Chem. Soc. - Dalt. Trans.* **1998**;359–367.
- [110] Tan L, Tao Y, Wang T, *et al.* Discovery of Novel Pyridone-Conjugated Monosulfactams as Potent and Broad-Spectrum Antibiotics for Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections. *J. Med. Chem.* **2017**;60:2669–2684.
- [111] Franklin RC, Wikler MA *et al.* Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. **2012**.

Annexes : Publications

Fungal Hydroxamate Siderophores: biosynthesis, chemical synthesis and potential medical applications

T. Garnerin¹, A. Dassonville-Klimpt¹, P. Sonnet¹

¹ LG2A, UMR-CNRS 7378, UFR de Pharmacie, 1 rue des Louvels, 80037 Amiens cedex 1, France

The potential medical application of hydroxamate siderophores and analogues has been investigated during the last years. Desferoxamine, a natural siderophore produced by *Streptomyces pilosus*, is used in iron overload therapy. However, several others potential siderophore-related therapeutics are being explored including ‘Trojan-horse’ compounds, gallium-containing complexes, and siderophore biosynthesis inhibitors. Iron is an essential nutrient for all living organism. However, in oxygen-rich conditions, the soluble ferrous iron is oxidized to insoluble ferric iron making its access very hard. To scavenge this element, fungi and bacteria have developed different strategies: i) the biosynthesis of endogenous siderophores, ii) the uptake of xenosiderophores, iii) others systems such as the extracellular reduction of Fe(III) to Fe(II). Siderophores are low-weight chelators that strongly bind extracellular ferric iron. Both endogenous and exogenous organo-metal complexes can be recognized by specific membrane receptors and transported into the microorganism. Many of the xenosiderophore receptors in *Pseudomonas aeruginosa* are highly conserved with those of the *Enterobacteriaceae* members such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*. The recognition can also be interspecies because fungal siderophores can be identified by some bacteria such as *Enterobacteriaceae*. Thus, the use of the siderophore machinery iron transport systems is one of the most promising strategies to synthesize new efficient antibacterial. Indeed, siderophore can be used to deliver therapeutic agents or toxic such as gallium into bacteria or fungi. To target the biosynthesis siderophore pathways is also a strategy to deny pathogens access to iron and combat them.

1. Introduction

Iron is a micronutrient essential for almost all living organisms [1]. Since the redox potential of the Fe(II)/Fe(III) couple lies within the range of biological processes this metal plays a major role as catalytic center or electron carrier in many metabolic processes. Although this metal is abundant in the earth’s crust, the bioavailability of iron is low. Under physiological conditions ferric iron, the most common state of iron, aggregates into insoluble ferric hydroxides [2]. Concentration of free Fe(III) is then about 10^{-17} mol.L⁻¹ while microorganisms need an iron concentration close to 10^{-6} mol.L⁻¹ for an optimal growth. To scavenge iron from the extracellular environment, fungi and other microorganisms have developed different strategies: i) unspecific metal ion transporters (Fe(II)) [3], ii) acquisition from heme and heme containing proteins [4], iii) acquisition from transferrin, lactoferrin and ferritin [5–7], iv) reductive systems of iron uptake, v) siderophore-mediated iron transport. Siderophores are low molecular weight (500-1500 Da) iron chelators which are synthesized and excreted by microorganisms to internalize iron after its extracellular complexation.

Furthermore, by sequestering iron, these compounds protect the cell against the toxic iron side effects such as the formation of highly reactive oxygen species *via* the Fenton [8] and Haber-Weiss [9] reactions. Depending on their chemical functional groups, siderophores can be divided into three main groups: i) catecholates or phenolates, ii) hydroxamates, and iii) α -hydroxycarboxylates. Most often, the same bidentate ligand is represented two or three-fold in a siderophore molecule but they can also be mixed. They are incorporated into linear or cyclic peptidic (or peptidomimetic) building blocks to form hexadentate ligands able to chelate Fe(III) in octahedral complexes. Generally, siderophores are oxygen-donors and form 1:1 siderophore-Fe(III) complexes characterized by a high thermodynamic stability [10–12]. Bidentate ligands can also be included into linear or cyclic tetradentate structures. In this case, Fe(III) coordination involves 3:2 siderophore-Fe(III) complexes.

In this review we want to focus on fungal siderophores and their potential medical applications. Fungi produce mainly hydroxamate siderophores, divided in three families, derived from the same basic structural unit N^δ-hydroxyornithine: fusarinines, coprogens and ferrichromes. A detailed attention will be given to their biosynthesis and total chemical syntheses of N^δ-hydroxyornithine-containing siderophores will be summarized. Finally, their potential medical applications (siderophore-drug conjugates, iron overload treatments, gallium complexes...) will be discussed.

2. Fungal siderophore

Under aerobic conditions, most fungi produce and excrete siderophores if iron is scarce. Few exceptions exist such as *Saccharomyces cerevisiae* but this yeast can use exogenous siderophores [13]. Fungal siderophores are mostly hydroxamates [14] and are classified in three families: fusarinines, coprogens and ferrichromes. The predominance of the hydroxamate function in fungal siderophore may be due to the stability of hydroxamic acid at low pH [15]. Indeed, fungi secrete different organic acids which can alter catecholate siderophores. Two notable exceptions have been related: rhizoferrin (1) [16] which is an α -hydroxycarboxylate-type and pistillarin (2) [17], a catecholate-type respectively produced by zygomycetes and some *Penicillium* species as well as many macro fungi (Fig. 1).

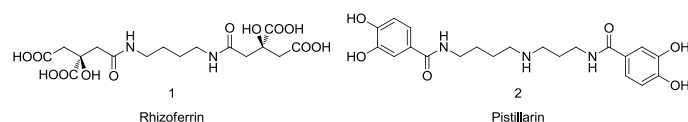


Fig. 1 Structure of Rhizoferrin and Pistillarin.

Fusarinines: fundamental building blocks called *trans*- and *cis*- N^{δ} -anhydromevalonyl- N^{δ} -hydroxy-L-ornithine [18] (or *trans*- and *cis*-fusarinines (**3**)) are found in many other fungal siderophores (Fig. 2). Fusarinines are composed of *cis*-fusarinines (**3**) subunits except for neurosporin (**4**) [19]. Thus, two *cis*-fusarinines linked by ester bonds give fusarinine A (**5**), three subunits allow the formation of fusarinine B (**6**). Three cyclic fusarinines have also been related, fusarinine C (**7**), triacetylfusarinine C (**8**) which are composed of three *cis*-fusarinines subunits and neurosporin (**4**). Among fusarinine-type, neurosporin (**4**) is a particular one. Indeed, this compound is derived from D-ornithine while all other fungal hydroxamate siderophores that have been characterized are composed of L-ornithine. Furthermore its unique structure consists of a cyclic triester of N^{α} -acetyl- N^{δ} -hydroxy- N^{δ} -[(*R*)-3hydroxybutyryl]-D-ornithine [19].

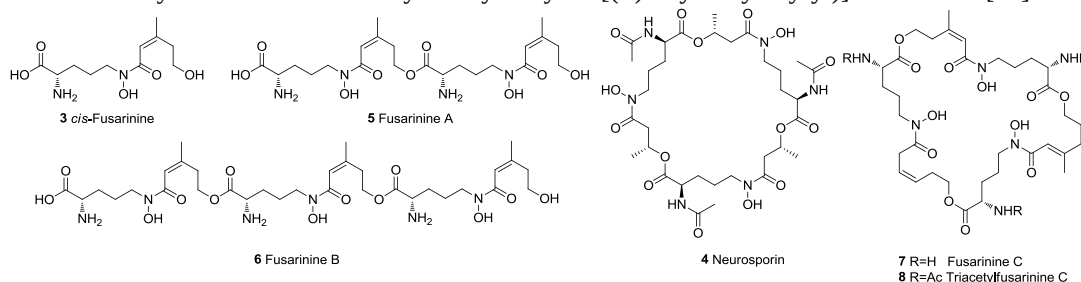
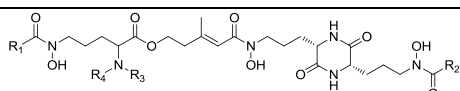
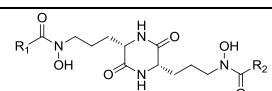


Fig. 2 Structure of fusarinines.

Coprogens: Coprogens are linear hydroxamate siderophores including a diketopiperazine ring (Table 1; Fig. 3). Both dihydroxamate and tetrahydroxamate siderophores have been laid out. Rhodotorulic acid (**RA 20**) and dimerumic acid (**DA 21**) are the only known dihydroxamate coprogen siderophores. Each are composed of two N^{δ} -acyl- N^{δ} -hydroxy-L-ornithines forming the diketopiperazine ring. In **RA (20)**, acyl groups are acetyl while in **DA (21)** acyl groups are *trans*-anhydromevalonyl [18]. Trihydroxamate coprogens are also composed of two N^{δ} -acyl- N^{δ} -hydroxy-L-ornithines forming a diketopiperazine ring but possess a third *trans*- N^{δ} -anhydromevalonyl- N^{δ} -hydroxy-L-ornithine subunit linked by an ether bond.

Table1 Coprogen siderophores **9-21**.^a

							
Coprogen siderophores		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Ref	
Coprogen	9	B	B	Ac	H	[20]	
Coprogen B	10	B	B	H	H	[21]	
Isonecoprogen I	11	B	CH ₃	Ac	H	[20]	
Neocoprogen I	12	CH ₃	B	Ac	H	[20]	
Neocoprogen II	13	CH ₃	CH ₃	Ac	H	[20]	
N^{α} -dimethyl coprogen	14	B	B	CH ₃	CH ₃	[21]	
N^{α} -dimethyl neocoprogen I	15	CH ₃	B	CH ₃	CH ₃	[21]	
N^{α} -dimethyl isoneocoprogen I	16	B	CH ₃	CH ₃	CH ₃	[21]	
Hydroxycoprogen	17	B	D	Ac	H	[20]	
Hydroxynecoprogen I	18	CH ₃	D	Ac	H	[20]	
Palmitoylcoprogen	19	B	B	H	E	[22]	
Rhodotorulic acid	20	CH ₃	CH ₃	-	-	[18]	
Dimerumic acid	21	B	B	-	-	[18]	

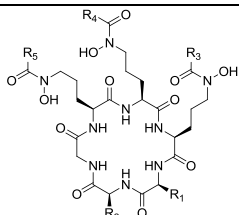
^aFor the acyl residues see Fig. 3.

- A. (Z)-CH=C(CH₃)-CH₂COOH. (Z)-CH=C(CH₃)-CHOH-CH₂OH. (Z)-CH=C(CH₃)-(CH₂)₂-O-COCH₃
 B. (Z)-CH=C(CH₃)-(CH₂)₂-OHE. CO-(CH₂)₁₄-CH₃. CH₂-CCH₃OH-(CH₂)₂OH
 C. (E)-CH=C(CH₃)-(CH₂)₂-OH

Fig. 3 Acyl residues encountered in fungal hydroxamate siderophores.

Ferrichromes: ferrichromes are cyclic hexapeptide siderophores composed of a glycine, two variable amino acids (glycine, alanine, serine), and three *N*^δ-acyl-*N*^δ-hydroxy-L-ornithines linked by peptidic bonds (Table 2; Fig. 3). Two exceptions have been discovered: des(diserylglycyl)ferrirhodin, a linear siderophore [23] and tetraglycylferrichrome, a cyclic heptapeptide composed of four glycines and three ornithine residues [24].

Table 2 Ferrichrome siderophores **22-42**.^a



Ferrichrome siderophores		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Ref
Ferrichrome	22	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	[25]
Ferrichrome A	23	CH ₂ OH	CH ₂ OH	A	A	A	[18,25]
Ferrichrome C	24	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	[18,26]
Ferrichrysin	25	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	[18,27]
Ferricrocin	26	H	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	[18,28]
Ferrirubin	27	CH ₂ OH	CH ₂ OH	B	B	B	[18,27]
Ferrirhodin	28	CH ₂ OH	CH ₂ OH	C	C	C	[18]
Malonichrome	29	H ^b	CH ₃ ^b	CH ₂ COOH	CH ₂ COOH	CH ₂ COOH	[29]
Sake colorant A	30	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	[26]
Asperchrome A	31	CH ₂ OH	CH ₃	B	B	B	[30]
Asperchrome B ₁	32	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₃	B	B	[27,30]
Asperchrome B ₂	33	CH ₂ OH	CH ₂ OH	B	CH ₃ ^b	B ^b	[27,30]
Asperchrome B ₃	34	CH ₂ OH	CH ₂ OH	B	B ^b	CH ₃ ^b	[27]
Asperchrome C	35	CH ₂ OH	CH ₂ OH	F	B	B	[30]
Asperchrome D ₁	36	CH ₂ OH	CH ₂ OH	B	CH ₃	CH ₃	[27,30]
Asperchrome D ₂	37	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₃	B	CH ₃	[27,30]
Asperchrome D ₃	38	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	B	[27,30]
Asperchrome E	39	CH ₂ OH	CH ₂ OH	C ^b	B ^b	B ^b	[31]
Asperchrome F ₁	40	CH ₂ OH	CH ₂ OH	G ^b	B ^b	B ^b	[31]
Asperchrome F ₂	41	CH ₂ OH	CH ₂ OH	B ^b	G ^b	B ^b	[31]
Asperchrome F ₃	42	CH ₂ OH	CH ₂ OH	B ^b	B ^b	G ^b	[31]

^aFor the acyl residues see Fig. 3; ^b Absolute configuration not determined.

3. Transport and storage of iron in fungi

3.1 Transport

Iron-siderophore complexes being highly stable, fungal cells use different mechanisms to extract iron: i) reductive iron assimilation – the ferrisiderophore is reduced before its assimilation, the Fe(II) alone is internalized while the iron chelator is released close to the external membrane, allowing its reutilization; ii) siderophore ‘shuttle’ mechanism [18,32] – highly specific transporters internalize the whole ferrisiderophore before release of iron by reduction or by ligand exchange with iron storage molecules; iii) ‘taxicab’ mechanism – the Fe(III) is transported across the cell membrane by an exchange between an extracellular siderophore, which remains outside, and an intracellular ligand; iv) hydrolytic or degradation mechanism [32] – the siderophore-ferric complex is transported into the cell and undergoes simultaneously reductive and degradative processes in order to release iron.

Reductive iron assimilation requires different cell surface-localized metalloredutases for the uptake of ferric siderophores. In *S. Cerevisiae*, these enzymes (Fre1, Fre2, Fre3) are specific to a wide range of hydroxamate siderophores (ferrichrome (**22**), triacetylfusarinine C (**7**)...) except for Fre4 which catalyzes iron uptake from RA (**20**).

This specificity may come from variations in the structure, the geometry and the reduction potentials of the different Fe(III)-siderophores complexes. The ‘shuttle’ mechanism involves siderophore-iron transporters (SITs), a family of proteins which are common and conserved in the fungal kingdom and are not present in prokaryotes or in other eukaryotes. Those secondary transporters take the energy for active transport from the proton motive force rather than from ATP. Each species possesses SITs which are specific for one or several siderophores. For example, in *S. cerevisiae*, the most studied eukaryotic model, four kinds of SITs are found that transport specific Fe(III) siderophore complexes: i) Sit1/Arn3 which transport desferrioxamine [33], a bacterial siderophore, ii) Arn1 for ferrichromes (22-42), iii) Taf1/Arn2 for triacetyl-fusarinine C (7) and iv) Enb1/Arn4 for ferrienterobactin.

In the taxicab mechanism, Fe(III) is transported across the membrane, from the extracellular Fe(III) siderophore complexes to intracellular ligands with an independent redox process. *Rhodotorula* species are known to use this process, scavenging iron from RA (20) [34]. This siderophore is a tetradentate ligand, meaning that the complex Fe(III) RA has a Fe₂L₃ stoichiometry and can release iron easier than hexadentate ligands. Thus, siderophores such as ferrichrome (22) or desferrioxamine are unable to deliver iron to *Rhodotorula* species due to the too high stability of the ferric complexes [35].

One example of the hydrolytic mechanism is the degradation of Fe(III) triacetyl-fusarinine C complex that occurs in *A. fumigatus*. In the cytosol, the ferrisiderophore undergoes degradation by esterase EstB that leads to the formation of Fe(III) fusarinines complexes which are hydrolysed by the esterase SidJ. The monomeric fusarinines obtained are excreted and free iron is chelated by ferrichrome (22) presents within the fungus or delivered to metabolic pathways.

Depending of the iron availability, fungi use one or several of the four mainly iron gathering mechanisms. These different modes of fungal iron transport provide a real advantage to grow in different environments. As bacteria, fungi have the ability to use endogenous as well as exogenous siderophores produce by others fungi or by bacteria (desferrioxamine). Some species, as *Saccharomyces cerevisiae*, use only xenosiderophores because they are not able to synthesize siderophore. Many other fungi produce and secrete more than one siderophore. *Ustilago sphaerogena* produces two major siderophores: ferrichrome (22) and ferrichrome A (23). When iron is scarce, ferrichrome A is mostly secreted as a result of its higher affinity for iron than ferrichrome (22) [36]. However, if the stress due to low iron levels is less important, ferrichrome (22) is more synthesized. Complete repression of ferrichrome A (23) production has been described at 10⁻⁵ mol.L⁻¹ iron. Moreover, ferrichrome is always required when iron levels are high as it can store iron in the fungal cell. As the binding groups are asymmetric, Δ and Λ geometric isomers can exist when iron is coordinated. Studies have related the importance of this geometry in the recognition and transport processes [37,38]. For example, in *Rhodotorula pilimanae*, the right-handed coordination Δ is preferred [34].

3.2 Storage

Although some fungi such as *Mucorales* produce iron storage proteins, called mycoferritin, the majority of fungi stores iron in vacuoles or siderophore-mediated intracellular deposits [39]. Instead, fungi have developed two mechanisms in order to accumulate iron: siderophore-mediated and vacuolar iron storage. In the vacuole, iron is probably stored under Fe(III) form [40]. Thus far, all siderophore-producing fungi studied are able to accumulate iron thanks to intracellular siderophores. In *Ustilago maydis* and *Ustilago sphaerogena*, the iron stored in ferrichrome complexes constitutes 50% of the cellular iron pool [41,42]. In *Aspergillus nidulans*, ferrichrome (22) accumulation is correlated to the intracellular iron concentration. Fe(III)-ferrichrome complexes constitute about 5% of the total cellular iron content but, in case of deficiency in the iron regulator SreA, this part can increase to 64% [43].

4. Biosynthesis

The δ-N-hydroxyornithine is the principal component of the most common hydroxamate siderophores such as fusarinine B (5) and C (6), coprogens 9-21, RA (20), ferrichrome (22), ferrichrome A (23) and C (24). L-N^δ-hydroxyornithine is biosynthesized by hydroxylation of the L-ornithine in presence of L-ornithine N^δ-oxygenase (Fig. 4) [44,45]. This enzyme has been identified in several fungal species known to produce hydroxamate siderophores [46–51]. A deletion of the gene encoding for this enzyme prevents biosynthesis of all siderophores in *Ustilago*, *Aspergillus* and *Fusarium* species investigated thus far. The second step of hydroxamate siderophore biosynthesis is characterized by the acyl group transfer from the AcylCoA on the L-N^δ-hydroxyornithine catalyzed by a transacetylase [52]. The acyl group is different depending on the siderophore, varying from the simplest acetyl (RA (20), ferrichrome (22)) to the more complex ones such as methylglutaconyl (ferrichrome A (23)) or anhydromevalonyl (fusarinine C (7), coprogen B (10)).

N^δ-hydroxyornithine-acetylCoA-N^δ-transacetylase has been identified in different species such as *Rhodotorula pilimanae* and *Ustilago sphaerogena* [53,54]. The third step includes amide linkages (RA (20), ferrichrome (22)) and ester linkages (fusarinine C (7), coprogen B (10)), coprogens between the L-N^δ-acyl-N^δ-hydroxyornithines catalyzed by nonribosomal peptide synthetases, a large multienzyme complex [55–57]. These synthetases, by activating the precursors, connect them via peptide or ester bonds and link additional amino acids if required.

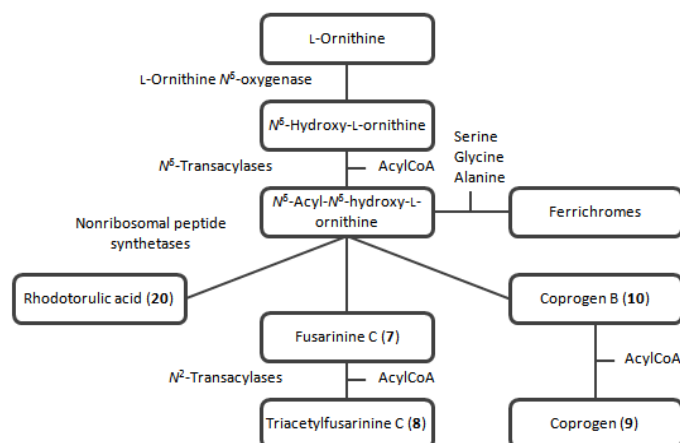


Fig. 4 Biosynthesis of fungal hydroxamate siderophores.

Fungal species mostly regulate iron acquisition via Iron Responsive GATA Factors (IRGFs) and the bZIP-transcription factor HapX. When iron is plentiful, IRGFs inhibit transcription of genes responsible of the siderophore system and reductive iron assimilation [58–61]. Iron starvation induces down-regulation of iron consuming pathways and upregulation of siderophore systems, for example, in *A. nidulans* via physical interaction between the (nucleotide sequence) CCAAT-binding complex and HapX [62,63]. This interaction is regulated by iron at both transcriptional and post-transcriptional levels: iron breaks the physical interaction of HapX with the CCAAT-binding complex and by activating SreA, it inhibits expression of *hapX*. HapX and SreA are interconnected in a negative feedback loop as HapX regulates also the expression of *sreA* in iron starvation conditions (Fig. 5).

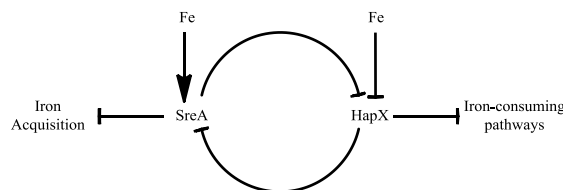


Fig. 5 Regulation of iron acquisition by HapX/SreA.

5. Chemical synthesis

Because of the prevalence of the *L*-*N*^δ-hydroxyornithine in the biosynthesis of fungal siderophores, chemical synthesis of this precursor has received a considerable attention. In 1969, Keller-Schierlein *et al.* proposed the first synthesis of the δ -nitro-*L*-norvaline (**43**), from diethyl oxalate and γ -butyrolactone [64]. This precursor of the *L*-*N*^δ-hydroxyornithine allowed them to synthesize two types of *L*-*N*^δ-hydroxyornithine-containing siderophores: ferrichrome (**22**), a cyclic hexapeptide, and RA (**20**), a diketopiperazine [65,66]. In 1969, they described the first synthesis of the ferrichrome (**22**).

They firstly prepared the linear hexapeptide (**44**), from three units of δ -nitro-*L*-norvaline (**43**) and three glycines, by classical peptide synthesis and then cyclized it with dicyclohexylcarbodiimide (DCC), a coupling agent. The nitro groups of the cyclopeptide were reduced into hydroxylamine with zinc and *N*-acetylation by acetic anhydride, affording ferrichrome (**22**) (Fig. 6).

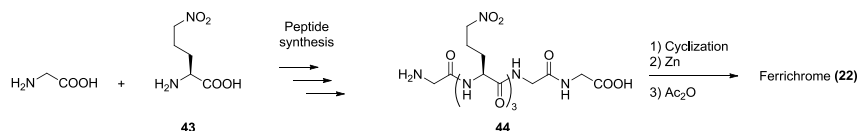


Fig. 6 Synthesis of Ferrichrome (**22**) by Keller-Schierlein's group.

In 1974, they also described the synthesis of RA (**20**). Two δ -nitro-*L*-norvaline (**43**) were linked together in order to form the diketopiperazine (**45**). Three more steps were needed to obtain RA (**20**): i) reduction of the nitro groups, ii) acetylations of the hydroxylamines, iii) solvolysis of the *O*-acetyl units by methanol (Fig. 7).

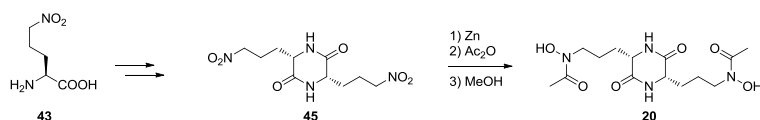


Fig. 7 Synthesis of RA by Keller-Schierlein's group.

In 1972, Isowa proposed a five-step synthesis to provide a protected L- N^{δ} -hydroxyornithine (**53a**) from the *O*-benzylhydroxylamine (**46**). First step consisted to protect the amine (**46**) by a tosyl group. The resulting product (**47**) was then alkylated with 1,3-dibromopropane (**48**) into (**50**) which then reacted with diethyl sodio-acetamidomalonate. The product formed (**51**) was then heated with concentrated hydrochloric acid-acetic acid to afford racemic N^{δ} -tosyl- N^{δ} -benzyloxyornithine (**52**) (Fig. 8). Finally, enzymatic resolution of the N^{δ} -acetyl- N^{δ} -tosyl- N^{δ} -benzyloxy-DL-ornithine was realized with aniline and papain. After acid hydrolysis of each enantiomer, N^{δ} -tosyl- N^{δ} -benzyloxy-L-ornithine (**53a**) and N^{δ} -tosyl- N^{δ} -benzyloxy-D-ornithine (**53b**) were obtained in the range of 25.8 g and with a 25.8% global yield [67](Fig. 8).

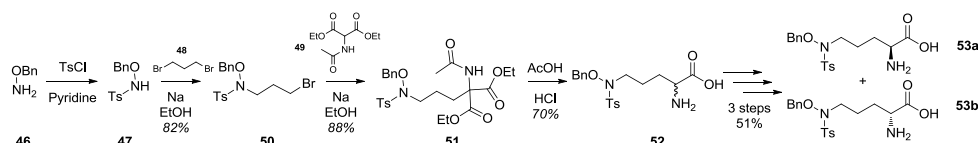


Fig. 8 Synthesis of N^{δ} -hydroxyornithine (**53**) by Isowa *et al.*

Using the modified L-amino acid (**53a**), Isowa's group was also able to synthesize ferrichrome (**22**) and RA (**20**). For the synthesis of ferrichrome (**22**), they prepared two different hexapeptides (**54**) and (**55**), from three units of N^{δ} -tosyl- N^{δ} -benzyloxy-L-ornithine (**53a**) and three glycines, by peptide synthesis. Then, both of these hexapeptides were cyclized with DCC. The resulting cyclo-triglycyl-tri-(N^{δ} -benzyloxy-L-ornithinyl) peptide was deprotected and *N*-acetylated by acetic anhydride. After removal of the benzyl protecting groups by catalytic hydrogenation, ferrichrome (**22**) was afforded in the range of 620 mg and with a 2.6% global yield [68] (Fig. 9).

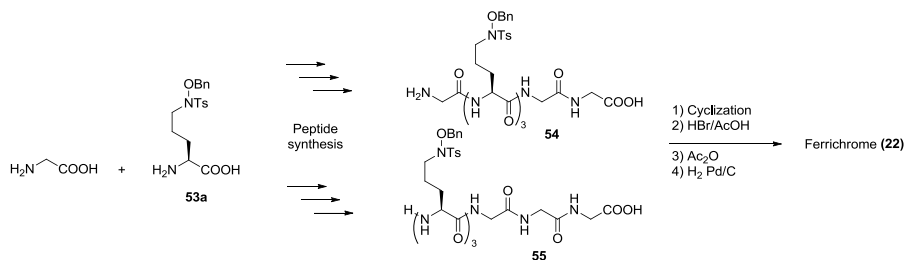


Fig. 9 Synthesis of Ferrichrome (**22**) by Isowa *et al.*

The first total synthesis of RA (**20**) has been published in 1972 by Isowa *et al.* [69]. Protected hydroxyornithines (**53a**) are linked together and the diketopiperazine ring (**56**) is formed with ammonia. Three more steps are needed to obtain RA (**20**): i) deprotection of the amine group, ii) *N*-acetylation, iii) debenzoylation. The siderophore (**20**) was obtained in the range of 0.2 g with a global yield of 6.3% (Fig. 10). The RA enantiomer was also synthesized by this way from N^{δ} -tosyl- N^{δ} -benzyloxy-D-ornithine (**53b**).

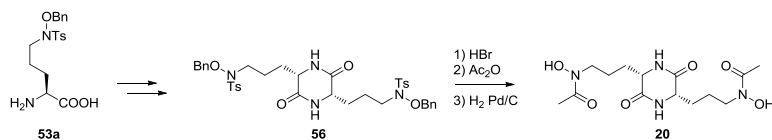


Fig. 10 Synthesis of RA (**20**) by Isowa's group.

In 1984, Miller's group proposed an alternate three-step synthesis of N^{δ} -hydroxy-L-ornithine derivatives [70]. Reaction of glutamic acid (**57**) with ethyl chloroformate followed by reduction with NaBH_4 afforded the alcohol (**58**). Then, under Mitsunobu conditions, this alcohol (**58**) was substituted by the protected hydroxylamine (**59**). Finally, the reaction of the product (**59**) formed, with zinc and acetic acid in presence of anhydride acetic, gave the expected N^{δ} -acetyl- N^{δ} -hydroxy-L-ornithine (**60**) (Fig. 11). The real improvement in this synthesis, compared with previous ones, was that the L-ornithine derivative was obtained without racemization. Furthermore, this synthesis, by its low cost and its easiness, is thus far the best way to obtain this synthon.

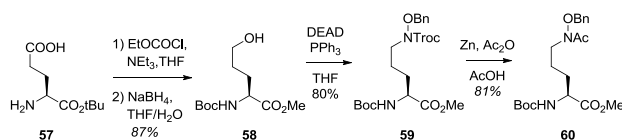


Fig. 11 Synthesis of N^δ -Acyl- N^δ -hydroxyornithine (**60**) by Miller's group.

Thus, Miller's group proposed a novel synthesis of RA (**20**) with their modified L-amino acid (**60**) [70]. Two units of (**60**) were converted to the diketopiperazine (**61**) by stepwise peptide chemistry. Finally, a catalytic hydrogenation gave RA (**20**) in the range of 16 mg with a global yield of 14.7% (Fig. 12).

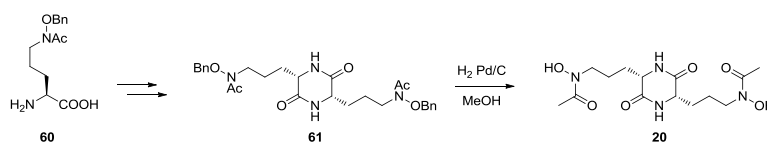


Fig. 12 Synthesis of RA by Miller's group.

In 2015, the Sano's team improved the formation of the diketopiperazine ring by realizing the first coupling step with (Benzotriazol-1-yloxy)-tris (dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate and the cyclization step under microwave conditions [71]. Thus, they increased the global yield of the synthesis of RA (**20**) from N^δ -acyl- N^δ -hydroxy-L-ornithine to 46.4%

6. Potential medical applications

By scavenging iron from the host, siderophores are key virulence factors. The exploitation of this iron transport pathway in a 'Trojan Horse' strategy may lead to the design of new drugs to fight bacteria and fungi. This strategy has been inspired by natural siderophore-drug conjugates called sideromycins and mostly effective against bacteria.

6.1. Siderophore-antibacterial conjugates

Sideromycins are natural product, produced by bacteria, composed by an antibiotic moiety attached covalently to siderophore. They include four main families such as albomycins, ferrimycins and salmycins and some microcins [72].

Albomycin δ_2 (**62**) possesses a ferrichrome-like siderophore as iron chelating part and a thioribosyl pyrimidine that plays the cytotoxic moiety. Interestingly, these two parts are connected *via* a serine spacer which is hydrolyzed *in vivo* by the peptidase N (Fig. 13) [73,74]. Thus, the albomycin (**62**) is recognized and actively transported by the action of two main receptors: FhuA and FhuD [75,76]. After internalization, the esterase action leads to the release of the seryl *t*-RNA synthetase inhibitor [77]. Albomycins have proved their efficiency both *in vitro* and in mouse models against a broad range of Gram-negative and Gram-positive bacteria with minimum inhibitory concentrations as low as 5 ng.mL⁻¹. Remarkably, the antibiotic moiety alone is 30 000 fold less efficient than albomycin (**62**) against *Staphylococcus aureus* and *E. coli* strains [73,78].

The 'Trojan Horse' strategy is particularly attractive to fight the Gram-negative bacteria as the bacterial envelope plays a key role in resistance of pathogens by limiting strongly the diffusion of the different drugs. The choice of the antibiotic must match the delivery site of the siderophore. For example, in *P. aeruginosa* iron is released in the periplasm *via* the ferric-pyoverdine (Fe-Pvd) pathway whereas in *E. coli* release of iron takes place in the cytoplasm after transport *via* the enterobactin and ferrichrome (**22**) pathways [79]. Thus far, it seems that conjugates which action site located in periplasm are more efficient than those focusing on cytoplasmic targets.

Inspired by this natural approach, hemisynthetic conjugates such as Pvd- β -lactams (PvdATC27853-ampicillin (**63**)) [80] (Fig. 13) and Pvd-fluoroquinolones [81] were synthesized and tested against several *P. aeruginosa* strains. Pvd-ampicillin (**63**) conjugates were often more active than ampicillin alone against some *P. aeruginosa* strains. However, depending on their intracellular target, Pvd-fluoroquinolones were less active than the corresponding fluoroquinolones.

This concept was also studied in connecting synthetic siderophore-like with antibiotic moiety. For example, the conjugate A (**64**) (Fig. 13) is a mixed synthetic hexadentate ligand connected to a succinic spacer with a carbacephalosporine moiety (lorabid) [82]. Conjugate A (**64**) was found to be about 2000 fold more active *in vitro* against a Gram-negative strain of *Acinetobacter baumannii* than lorabid alone. Interestingly, simplified conjugates with incorporation of a single bidentate ligand (catechol, hydroxypyridinone or hydroxamic acid) displayed excellent activity against multi-drug resistant (MDR) Gram-negative strains. Synthetic siderophore conjugates of several classes of monocyclic β -lactam were investigated exploiting the catechol isostere hydroxypyridinone. This iron-chelating moiety promotes their uptake through the corresponding catechol Outer Membrane Receptor (OMR) [83,84].

For example, BAL30072 (**65**) [85] (Basilea Pharmaceutica, 2010), a mixed dihydropyridone siderophore moiety connected to a monosulfactam, has shown its efficiency *in vitro* against a broad range of MDR Gram-negative bacilli.

MC-1 (**66**) (Pfizer, 2012) is a monobactam which has demonstrated good *in vitro* results. Unfortunately, its development was problematic due to a lack of correlation between *in vitro* activity and *in vivo* efficacy. It seems that even pre-clinical trials have been stopped. The most recent conjugate, developed by Glaxo Smith Kline in 2015 cefiderocol/S-649266 (**67**), has a promising future (Fig. 13). Thanks to a high stability against hydrolysis by β -lactamases, including carbapenemases and extended-spectrum-lactamases, this compound has demonstrated an antimicrobial activity especially against MDR *Enterobacteriaceae*. At the time of writing, this molecule is in phase III to compare its activity with meropenem in adults with hospital-acquired bacterial pneumonia, ventilator-associated bacterial pneumonia or healthcare-associated bacteria caused by Gram-negative pathogens.

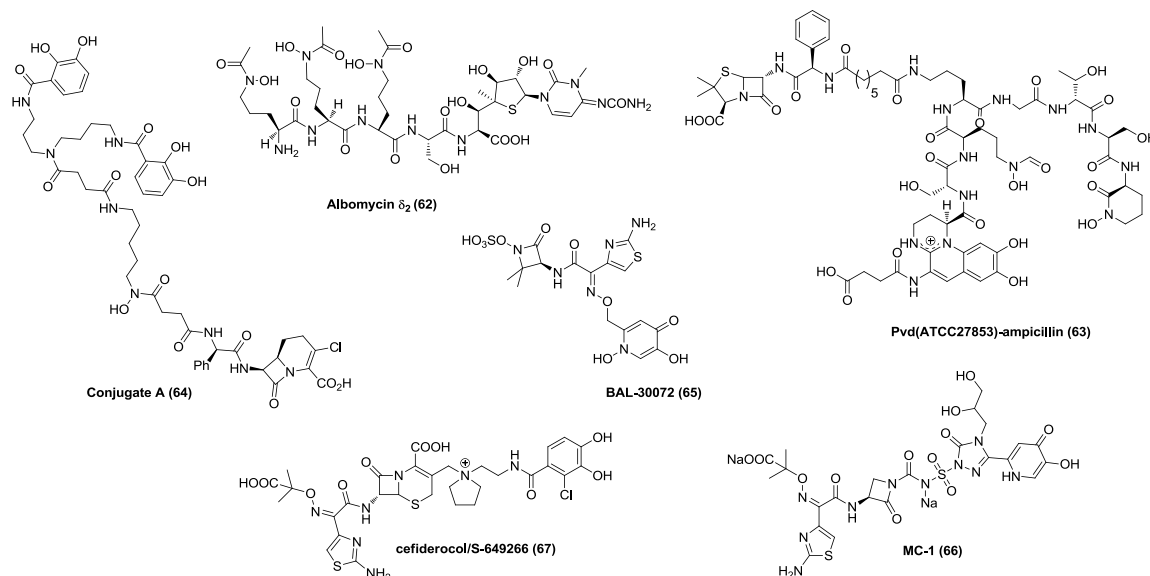


Fig. 13 Albomycine and Synthetic siderophore-like-antibiotic conjugated.

6.2. Siderophore-antifungal conjugates

The elaboration of siderophore-antifungal conjugates is much less studied than siderophore-antibacterial compounds. Some of them were prepared using ornithine or trihydroxamate-containing isocyanurate as siderophore-like and 5-fluorouridine, neoenactin or 13C-desketoneoenactin as antifungal agents. The 5-fluorouridine is an active metabolite of the 5-fluorocytosine, the most commonly used orally active antifungal agent. The ornithine-based siderophore-5-fluorouridine conjugate (**68**) (Fig. 14) with a phenylglycyl spacer revealed a good activity against *C. albicans* (minimum inhibitory concentration (MIC) of $0.312 \mu\text{g.mL}^{-1}$) in iron depleted growth media [86]. The isocyanurate-based siderophore (**72**), a RA analog, was less active against this fungal with a MIC of $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [87].

Neoenactin is involved in the inhibition of the serine palmitoyl transferase, an enzyme of sphingolipid biosynthesis. Its analog, the norneoenactin which showed a good antifungal activity against the human pathogens *C. albicans* was used to form conjugates with ornithine- and isocyanurate-based siderophores. The triornithine-based conjugates (**70**) demonstrated mild activity against *C. albicans* (MIC = $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$) [88] while the RA analog conjugated (**74**) exhibited a very good activity for this fungal (MIC = $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), unfortunately, without gain of activity compared to norneoenactin (MIC = $2.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Conjugation of 13C-desketoneoenactin to form conjugates (**71**) and (**75**) reduced equally the parent activity against *C. albicans*. The reduced activity of these siderophore-drug conjugates may be due to an inappropriate recognition of the siderophore or a weak interaction of the conjugate with the cellular targets.

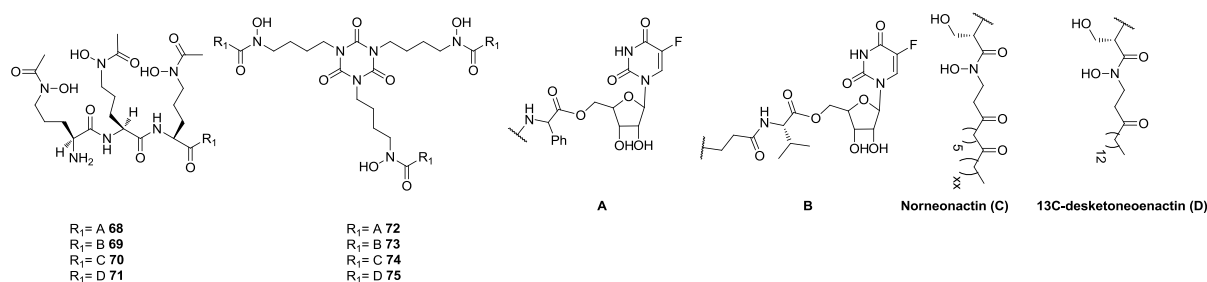


Fig. 14 Structures of antifungal-siderophore conjugates.

6.3. Siderophore-Gallium complexes

It has been demonstrated that siderophores are also able to chelate other metallic cations such as aluminum, gallium, scandium and also indium [89]. Ga(III) is metabolically very similar to Fe(III), acting as an iron substitute in several biological pathways. Thanks to its chemical similarity to Fe(III) in terms of: i) charge, ii) ionic radius, iii) ionization potential, iv) electronegativity, v) electron and ligand affinity and vi) coordination geometry, gallium can substitute iron in siderophores-dependent biological systems [90]. However, Ga(III) cannot be physiologically reduced and when it replaces Fe(III) in redox enzymes, a number of essential reactions are inhibited: gallium thus inhibits Fe(III) by a “Trojan horse” strategy [91].

The antibacterial activity of gallium salts such as $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ against *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *M. tuberculosis* and *S. aureus* has been reported in a lot of studies [91–95]. A synergic effect of association such as colistin/ $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ was also described [92]. Gallium nitrate is presently approved for use in the clinic as antitumoral compound; however, often for optimal efficacy, this drug needs to be administered by continuous intravenous infusion which is a cumbersome mode of treatment [96]. Also, it was reported as potentially nephrotoxic. Thus, further efforts to identify and develop gallium formulations that optimize the antimicrobial effect while limiting toxicity to the host should be realized. The formation of siderophore-gallium complexes could be a solution. Indeed, these complexes should be better recognized by the OMR of the target bacteria inducing a best specificity of action and *de facto* with a lesser toxicity. Studies suggest that siderophore-gallium complexes could be more effective than simple gallium salts [97].

Rzhepishevskaya *et al.* have reported the antibacterial properties of gallium citrate and desferrioxamine(Ga) complexes against Gram-positive and Gram-negative bacteria [98]. A synergic effect of the association gentamicin/desferrioxamine(Ga) was even described [99]. Another medical application of Gallium-siderophore complexes consists of use ⁶⁸gallium-siderophore as tools to image fungal infections [100,101].

6.4. Antitumoral activity of fungal siderophores

The medical application of siderophore is not limited to the vectorization of antimicrobial compounds. NBRI16716 compounds are siderophore produced by *Perisporiopsis melioloides* which and have shown an antitumoral activity (Fig. 15). The normal cells surrounding the tumor can control the growth of the tumor and the signal molecules responsible for regulating this phenomenon could be novel molecular targets. NBRI16716B (**77**) exhibited strong selectivity and activity *in vitro* while NBRI16716C (**78**) shown a weak activity. The hydroxyl group at the R^1 position appeared as crucial, the lack of which decreasing strongly the activity. The first *in vivo* tests have confirmed antitumor activity toward tumor model mice.

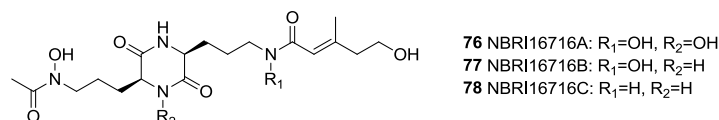


Fig. 15 Structure of NBRI16716 compounds.

7. Conclusion

Knowledge and understanding of fungal siderophores have led to promising medicinal advances, notably in antibiotherapy. As we have seen, fungi produce mainly hydroxamate siderophores that are able to chelate iron. Several chemical syntheses of fungal siderophores were recently realized showing their potential therapeutic applications. In this paper, we were essentially interested by the antimicrobial fungal siderophore properties. Iron plays a major role in biological systems. Thus, ‘Trojan Horse’ strategy appears to be an interesting way to fight MDR Gram negative bacteria. This strategy could be applied against antifungal pathogens in the future. Interestingly, some fungal siderophores have also shown an antitumoral. Development of these new therapies is an interesting challenge and further researches are still needed to improve the actual potential therapeutic compounds.

Acknowledgments T.G. was supported by a PhD grant from European Union and the Hauts-de-France region.

References

- [1] G. Winkelmann. Importance of siderophores in fungal growth, sporulation and spore germination. *Front. Mycol.* 1991;49–65.
- [2] Lesuisse E, Labbe P. Reductive iron assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Met. ions fungi.* 1994. p. 149–178.
- [3] Howard DH. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999;12:394–404.
- [4] Lawen A, Lane DJR. Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid. Redox Signal.* 2013;18:2473–2507.
- [5] Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE *et al.* The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog.* 2008;4:1–17.
- [6] Crawford A, Wilson D. Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res.* 2015;15:1–11.
- [7] Mech F, Wilson D, Lehnert T, Hube B, Figge MT. Epithelial invasion outcompetes hypha development during *Candida albicans* infection as revealed by an image-based systems biology approach. *Cytom.* 2014;85:126–139.
- [8] Halliwell B, Gutteridge JMC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Lett.* 1992;307:108–112.
- [9] Haber F, Weiss J. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften.* 1932;20:948–950.
- [10] Pollack JR, Neilands JB. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970;38:989–992.
- [11] Cochis A, Azzimonti B, Della Valle C, De Giglio E, Bloise N, Visai L *et al.* The effect of silver or gallium doped titanium against the multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Biomaterials.* 2016;80:80–95.
- [12] Narayanasamy P, Switzer BL, Britigan BE. Prolonged-acting, multi-targeting gallium nanoparticles potently inhibit growth of both HIV and mycobacteria in co-infected human macrophages. *Sci. Rep.* 2015;5:8824.
- [13] Lesuisse E, Simon-casteras M, Labbe P. Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology.* 1998;144:3455–3462.
- [14] Leong J. Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1986;187–209.
- [15] Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* 2002;30:691–696.
- [16] Thieken A, Winkelmann G. Rhizoferrin: a complexone type siderophore of the *Mucorales* and *Entomophthorales* (Zygomycetes). *FEMS Microbiol. Lett.* 1992;94:37–41.
- [17] Capon RJ, Stewart M, Ratnayake R, Lacey E, and Gill JH. Citromycetins and bilains A-C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. *J. Nat. Prod.* 2007; 1746–1752.
- [18] Winkelmann G. Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi. *Biotechnol. Adv.* 1990;8:207–231.
- [19] Eng-Wilmot D. Molecular structure of ferric neurosporin, a minor siderophore-like compound containing N^δ-hydroxy-D-ornithine. *J. Am. Chem. Soc.* 1984;106:1285–1290.
- [20] Jalal MAF, Helm D Van Der. Siderophores of highly phytopathogenic *Alternaria longipes*. *Biol. Met.* 1989;2:11–17.
- [21] Jalal MAF, Love SK, Helm D Van Der. N^α-Dimethylcoprogens. *Biol. Met.* 1988;1:4–8.
- [22] Anke H, Kinn J, Bergquist K, *et al.* Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. *Biol. Met.* 1991;4:176–180.
- [23] Jalal M a. F, Galles JL, Van der Helm D. Structure of des(diserylglycyl)ferrirhodin, DDF, a novel siderophore from *Aspergillus ochraceous*. *J. Org. Chem.* 1985;50:5642–5645.
- [24] Deml G, Voges K, Jung G, and Winkelmann G. Tetraglycylferrichrome - the first heptapeptide ferrichrome. *FEBS Lett.* 1984;173:53–57.
- [25] Neilands JB, Emery T. Structure of the Ferrichrome Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 1961;53:1960–1962.
- [26] Llinás M, Neilands JB. The structure of two alanine containing ferrichromes: sequence determination by proton magnetic resonance. *Biophys. Struct. Mech.* 1976;2:105–117.
- [27] Jalal MAF, Hossain MB, van der Helm D, and Barnes CL. Structure of ferrichrome-type siderophores with dissimilar N^α-acyl groups: asperchrome B₁, B₂, B₃, D₁, D₂ and D₃. *Biol. Met.* 1988;1:77–89.
- [28] Keller-Schierlein W, Deér A. Zur Konstitution von Ferrichrysin und Ferricrocin. *Helv. Chim. Acta.* 1963;46:1907–1920.
- [29] Emery T. Malonichrome, a new iron chelate from *Fusarium roseum*. *BBA - Gen. Subj.* 1980;629:382–390.
- [30] Jalal MAF, Mocharla R, Barnes CL, Hossain MB, Powel DR, Eng-Wilmot DL *et al.* Extracellular Siderophores from *Aspergillus ochraceous*. *J. Bacteriol.* 1984;158:683–688.
- [31] Winkelmann G. Handbook of Microbial Iron Chelates. 1991.
- [32] Van der Helm D, Winkelmann G. Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. *Met. ions fungi.* 1994. p. 39.
- [33] Dhungana S, White PS, Crumbliss AL. Crystal structure of ferrioxamine B: a comparative analysis and implications for molecular recognition. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2001;6:810–818.
- [34] Müller G, Isowa Y, Raymond KN. Stereospecificity of siderophore-mediated iron uptake in *Rhodotorula pilimanae* as probed by enantiorhodotorulic acid and isomers of chromic rhodotorulate. *J. Biol. Chem.* 1985;260:13921–13926.
- [35] Ekanunkul S, Lukat-Rodgers GS, Sumithran S, Ghosh A, Rogers KR, Dawson JH *et al.* Characterization of the periplasmic heme-binding protein ShuT from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae*. *Biochemistry.* 2005;44:13179–13191.
- [36] Ecker DJ, Passavant CW, Emery T. Role of two siderophores in *Ustilago sphaerogena*: biosynthesis assay of deferriferrichromes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982;720:242–249.
- [37] Muller G, Matzanke BF, Raymond KN. Iron transport in *Streptomyces pilosus* mediated by ferrichrome siderophores, rhodotorulic acid, and enantio-rhodotorulic acid. *J. Bacteriol.* 1984;160:313–318.

- [38] Muller G, Raymond KN. Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. J. Bacteriol. 1984;160:304–312.
- [39] Matzanke BF. Iron storage in fungi. Met. ions Fungi. 1994. p. 179–214.
- [40] Van Ho A, Ward DM, Kaplan J. Transition metal transport in yeast. Annu. Rev. Microbiol. 2002;56:237–261.
- [41] Leong SA, Winkelmann G. Molecular biology of iron transport in fungi. Met. Ions Biol. Syst. 1998. p. 147–186.
- [42] Matzanke BF, Bill E, Trautwein AX, Winkelmann G. Role of siderophores in iron storage in spores of *Neurospora crassa* and *Aspergillus ochraceus*. J. Bacteriol. 1987;169:5873–5876.
- [43] Eisendle M, Schrettl M, Kragl C, Müller D, Illmer P, and Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot. Cell. 2006;5:1596–1603.
- [44] De Luca NG, Wood PM. Iron uptake by fungi: contrasted mechanisms with internal or external reduction. Adv. Microb. Physiol. 2000;43:39–74.
- [45] Winkelmann G. Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands. Mycol. Res. 1992;96:529–534.
- [46] Eisendle M, Oberegger H, Buttinger R, Illmer P, and Haas H. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot. Cell. 2004;3:561–563.
- [47] Greenshields DL, Liu G, Feng J, Selvaraj G, and Wei Y. The siderophore biosynthetic gene *SID1*, but not the ferroxidase gene *FET3*, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. Mol. Plant Pathol. 2007;8:411–421.
- [48] Mei B, Budde AD, Leong SA. *SID1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. Proc Natl Acad Sci. 1993;90:903–907.
- [49] Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Joechl C, Rogers T, Arst Jr HN *et al.* Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. J. Exp. Med. 2004;200:1213–1219.
- [50] Gillian Turgeon B, Oide S, Bushley K. Creating and screening *Cochliobolus heterostrophus* non-ribosomal peptide synthetase mutants. Mycol. Res. 2008;112:200–206.
- [51] Yamada O, Nan SN, Akao T, Tominaga M, Watanabe H, Satoh T *et al.* *dffA* gene from *Aspergillus oryzae* encodes L-ornithine N⁵-oxygenase and is indispensable for deferri-ferrichrysin biosynthesis. J. Biosci. Bioeng. 2003;95:82–88.
- [52] Plattner HJ, Dieckmann H. Enzymology of siderophore biosynthesis in fungi. Met. ions fungi. 1994. p. 99–117.
- [53] Liu A, Neilands JB. Mutational analysis of rhodotorulic acid synthesis in *Rhodotorula pilimanae*. Siderophores from Microorg. Plants. 1984. p. 97–106.
- [54] Ong DE, Emery TF. Ferrichrome biosynthesis: enzyme catalyzed formation of the hydroxamic group. Arch. Biochem. Biophys. 1972;148:77–83.
- [55] Hummel W, Diekmann H. Preliminary characterization of ferrichrome synthetase from *Aspergillus quadricinctus*. 1981;657:313–320.
- [56] Yuan WM, Gentil GD, Budde AD. Characterization of the *Ustilago maydis* *SID2* gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. J. Bacteriol. 2001;183:4040–4051.
- [57] Wilhite SE, Lumsden RD, Straney DC. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. 2001;67:5055–5062.
- [58] Lan CY, Rodarte G, Murillo LA, Jones T, Davis RW, Dungan J *et al.* Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 2004;53:1451–1469.
- [59] Oberegger H, Zadra I, Schoeser M, Abt B and Haas H. Identification of members of the *Aspergillus nidulans* SREA regulon: genes involved in siderophore biosynthesis and utilization. Biochem. Soc. Trans. 2002;30:781 LP-783.
- [60] Pelletier B, Beaudoin J, Philpott CC and Labbé S. Fep1 represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. Nucleic Acids Res. 2003;31:4332–4344.
- [61] Oberegger H, Schoeser M, Zadra I, Abt B and Haas H. SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. 2001;41:1077–1089.
- [62] Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, Thön M *et al.* Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex: a novel mechanism of gene regulation by iron. EMBO J. 2007;26:3157–3168.
- [63] Oberegger H, Schoeser M, Zadra I, Schrettl M, Parson W and Haas H. Regulation of *freA*, *acoA*, *lysF*, and *cycA* expression by iron availability in *Aspergillus nidulans*. Appl. Environ. Microbiol. 2002;68:5769–5772.
- [64] Maurer B, Keller-Schierlein W. Synthese des Ferrichroms, 1. Teil: (*S*)- α -Amino-D-nitro- valeriansaure (δ -Nitro-L-norvalin). Helv. Chim. Acta. 1969;52:388–396.
- [65] Keller-Schierlein W, Maurer B. Synthese des Ferrichroms; 2. Teil. Helv. Chim. Acta. 1969;52:603–610.
- [66] Widmer J, Keller-Schierlein W. Synthesen in der sideramin-reihe: rhodotorulasäure und dimerumsäure. Helv. Chim. Acta. 1974;57:1904–1912.
- [67] Isowa Y, Takashima T, Ohmori M, Kurita H, Sato M and Mori K. Synthesis of N⁶-Hydroxyornithine. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1972;45:1461–1465.
- [68] Isowa Y, Ohmori M, Kurita H. Total synthesis of ferrichrome. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1974;47:215–220.
- [69] Isowa Y, Takashima T, Ohmori M, Kurita H, Sato M and Mori K. Synthesis of rhodotorulic acid. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1972;45:1467–1471.
- [70] Lee BH, Gerfen GJ, Miller MJ. Constituents of microbial iron chelators. alternate syntheses of. N⁶-hydroxy-L-ornithine derivatives and applications to the synthesis of rhodotorulic acid. J. Org. Chem. 1984;49:2418–2423.
- [71] Nakao M, Fukayama S, Kitaike S and Sano S. Synthesis of rhodotorulic acid and its 1,4-dimethylated derivative. Heterocycles. 2015;90:1309–1316.
- [72] Knüsel F, Nüesch J. Mechanism of action of sideromycins. Nature. 1965;206:674–676.
- [73] Braun V, Pramanik A, Gwinner T, Köberle M and Bohn E. Sideromycins: tools and antibiotics. BioMetals. 2009;22:3–13.
- [74] Pramanik A, Stroehrer UH, Krejci J, Standish AJ, Bohn E, Paton JC *et al.* Albomycin is an effective antibiotic, as exemplified with *Yersinia enterocolitica* and *Streptococcus pneumoniae*. Int. J. Med. Microbiol. 2007;297:459–469.

- [75] Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, and Dancis A. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science*. 1996;270:1552.
- [76] Stoj CS, Augustine AJ, Solomon EI, and Kosman DJ. Structure-function analysis of the cuprous oxidase activity in Fet3p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2007;282:7862–7868.
- [77] Tangen KL, Jung WH, Sham AP, Lian T and Kronstad JW. The iron- and cAMP-regulated gene *SIT1* influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 2007;153:29–41.
- [78] Smith JL. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 2004;30:173–185.
- [79] Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002;32:70–78.
- [80] Budzikiewicz H. Siderophore-antibiotic conjugates used as trojan horses against *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Top Med Chem.* 2001;1:73–82.
- [81] Hennard C, Que Chi Truong, Desnottes JF, Paris JM, Moreau NJ and Abdallah MA. Synthesis and activities of pyoverdinin quinolone adducts: a prospective approach to a specific therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Chem.* 2001;44:2139–2151.
- [82] Wenciewicz TA, Miller MJ. Biscatecholate-monohydroxamate mixed ligand siderophore-carbacephalosporin conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Chem.* 2013;56:4044–4052.
- [83] Nikaido H, Rosenberg EY. Cir and Fiu proteins in the outer membranes of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: Study with β -lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *J. Bacteriol.* 1990;172:1361–1367.
- [84] Critchley IA. Catecholic β -lactams: facilitated transport. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990;26:733–735.
- [85] Page MGP, Dantier C, Desarbre E. *In vitro* properties of BAL30072, a novel siderophore sulfactam with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54:2291–2302.
- [86] Miller MJ, Darwish M, Ghosh M, Hansel JG, Hu J, Niu C *et al.* Anti-infectives: Recent advances in chemistry and structure-activity relationships (special publication). Royal Society of Chemistry 1997.
- [87] Ghosh M, Miller MJ. Design, synthesis, and biological evaluation of isocyanurate-based antifungal and macrolide antibiotic conjugates: iron transport-mediated drug delivery. *Bioorganic Med. Chem.* 1995;3:1519–1525.
- [88] Roosenberg J, Lin Y, Lu Y and Miller MJ. Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents. *Curr. Med. Chem.* 2000;7:159–197.
- [89] Rogers HJ, Synge C, Woods VE. Antibacterial effect of scandium and indium complexes of enterochelin on *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980;18:63–68.
- [90] Chitambar CR, Narasimhan J. Targeting iron-dependant DNA synthesis with gallium and transferrin-gallium. *Pathobiology*. 1991;59:3–10.
- [91] Kaneko Y, Thoendel M, Olakanmi O, Britigan BE and Singh PK. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J. Clin. Invest.* 2007;117:877–888.
- [92] Antunes LCS, Imperi F, Minandri F and Visca P. *In Vitro* and *In Vivo* antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56:5961–5970.
- [93] De Léséleuc L, Harris G, KuoLee R and Chen W. *In Vitro* and *in Vivo* biological activities of iron chelators and gallium nitrate against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56:5397–5400.
- [94] Olakanmi O, Britigan BE, Larry S. Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages. *Infect. Immun.* 2000;68:5619–5627.
- [95] Olakanmi O, Kesavalu B, Pasula R, Abdalla, MY, Schlesinger LS and Britigan BE. Gallium nitrate is efficacious in murine models of tuberculosis and inhibits key bacterial Fe-dependent enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57:6074–6080.
- [96] Krakoff IH, Newman RA, Goldberg RS. Clinical toxicologic and pharmacologic studies of gallium nitrate. *Cancer*. 1979;44:1722–1727.
- [97] Frangipani E, Bonchi C, Minandri F, Imperi F and Visca P. Pyochelin potentiates the inhibitory activity of gallium on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58:5572–5575.
- [98] Rzhapishevska O, Ekstrand-Hammarström B, Popp M, Björn E, Bucht A, Sjöstedt A, Antti H *et al.* The antibacterial activity of Ga^{3+} is influenced by ligand complexation as well as the bacterial carbon source. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55:5568–5580.
- [99] Banin E, Lozinski A, Brady KM, Berenshtein E, Butterfield PW Moshe M *et al.* The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105:16761–16766.
- [100] Petrik M, Haas H, Schrettl M, Helbok A, Blatzer M and Decristoforo C. *In vitro* and *in vivo* evaluation of selected ^{68}Ga -siderophores for infection imaging. *Nucl. Med. Biol.* 2012;39:361–369.
- [101] Haas H, Petrik M, Decristoforo C. An iron-mimicking, Trojan horse-entering fungi-has the time come for molecular imaging of fungal infections? *PLoS Pathog.* 2015;11:1–7.



Design, synthesis and antimalarial activity of novel bis{N-[(pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amine derivatives

Jean Guillon, Anita Cohen, Nassima Meriem Gueddouda, Rabindra Nath Das, Stéphane Moreau, Luisa Ronga, Solène Savrimoutou, Louise Basmaciyan, Alix Monnier, Myriam Monget, Sandra Rubio, Timothée Garnerin, Nadine Azas, Jean-Louis Mergny, Catherine Mullié & Pascal Sonnet

To cite this article: Jean Guillon, Anita Cohen, Nassima Meriem Gueddouda, Rabindra Nath Das, Stéphane Moreau, Luisa Ronga, Solène Savrimoutou, Louise Basmaciyan, Alix Monnier, Myriam Monget, Sandra Rubio, Timothée Garnerin, Nadine Azas, Jean-Louis Mergny, Catherine Mullié & Pascal Sonnet (2017) Design, synthesis and antimalarial activity of novel bis{N-[(pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amine derivatives, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32:1, 547-563, DOI: [10.1080/14756366.2016.1268608](https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1268608)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2016.1268608>



© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 23 Jan 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 450



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

RESEARCH ARTICLE

 OPEN ACCESS

Design, synthesis and antimalarial activity of novel bis{*N*-[(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl}amine derivatives

Jean Guillon^{a,b}, Anita Cohen^c, Nassima Meriem Gueddouda^{a,b}, Rabindra Nath Das^{a,b}, Stéphane Moreau^{a,b}, Luisa Ronga^{a,b}, Solène Savrimoutou^{a,b}, Louise Basmacyan^c, Alix Monnier^{a,b}, Myriam Monget^{a,b}, Sandra Rubio^{a,b}, Timothée Garnerin^d, Nadine Azas^c, Jean-Louis Mergny^{a,b}, Catherine Mullié^d and Pascal Sonnet^d

^aARNA Laboratory, University Bordeaux, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Bordeaux, France; ^bINSERM U1212, UMR CNRS 5320, ARNA Laboratory, Bordeaux, France; ^cUMR-MD3, Faculty of Pharmacy, Aix-Marseille University, Laboratory of Parasitology, Marseille, France; ^dUniversité de Picardie Jules Verne, Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, UFR de Pharmacie, Amiens, France

ABSTRACT

Novel series of bis- and tris-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives **1** were synthesized and tested for *in vitro* activity upon the intraerythrocytic stage of W2 and 3D7 *Plasmodium falciparum* strains. Biological results showed good antimalarial activity with IC₅₀ in the μM range. In attempting to investigate the large broad-spectrum antiprotozoal activities of these new derivatives, their properties toward *Leishmania donovani* were also investigated and revealed their selective antiplasmodial profile. In parallel, the *in vitro* cytotoxicity of these molecules was assessed on the human HepG2 cell line. Structure–activity relationships of these new synthetic compounds are discussed here. The bis-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1n** and **1p** were identified as the most potent antimalarial candidates with selectivity index (SI) of 40.6 on W2 strain, and 39.25 on 3D7 strain, respectively. As the telomeres of the parasite could constitute an attractive target, we investigated the possibility of targeting *Plasmodium* telomeres by stabilizing the *Plasmodium* telomeric G-quadruplexes through a FRET melting assay by our new compounds.

ARTICLE HISTORY

Received 14 October 2016
Revised 29 November 2016
Accepted 1 December 2016

KEYWORDS

Antimalarial activity; bis-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline; *Plasmodium falciparum*; G-quadruplex; antileishmanial activity

Introduction

Malaria remains as one of the most devastating infectious diseases of the developing world. Malaria remains a major cause of public health problem in about 95 countries mainly located in the tropical zone of the globe (notably Africa, South-East Asia and also Eastern Mediterranean region)¹; while approximately 3.2 billion people are at risk of being infected with malaria and developing disease. The latest figures on the incidence and mortality of malaria show that, despite progress in the implementation of preventive measures such as insecticide-treated mosquito nets and intermittent preventive treatments, this parasitic disease is still estimated to affect over 214 million people and to account for 438,000 deaths in 2015, of which approximately 80% are concentrated in just fifteen countries, mainly in Africa. The death toll is particularly high in children under five and pregnant women of the World Health Organization (WHO) African region¹. Five species of protozoan parasites belonging to the *Plasmodium* genus, namely, *falciparum*, *malariae*, *vivax*, *ovale* and *knowlesi* cause malaria in human beings; from which, *P. falciparum* is the most dangerous of these species^{2–4}.

The increasing prevalence of multiple drug resistant strains of *P. falciparum* in most malaria endemic areas has significantly reduced the efficacy of the current antimalarial drugs. Nowadays, the only fully effective antimalarial drugs utilize artemisinin and its derivatives, notably parenteral artesunate now recommended as the first line of treatment of severe malaria for at least 24 h and

until oral medication could be tolerated⁵. Artemisinin and its derivatives are also used in combination with several different partner drugs (including lumefantrine, mefloquine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine and piperazine) in artemisinin-based combination therapies (ACTs), now recommended as the first line of treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and as the second part of treatment for 3 days of severe malaria in endemic areas⁵. However, over the last decade evidence has grown that artemisinin resistance has emerged and spread within Southeast Asia, first on the Cambodia-Thailand border in 2009^{6,7}, but now across a widening area of the Greater Mekong Subregion. Rapid scientific advances in understanding of this problem have taken place within the last five years^{8–10} and defined mutations in “K13” gene of *P. falciparum* associated to reduced ring-stage susceptibility to artemisinins¹¹. Therefore, new antimalarial agents with new mechanisms of action are required to overcome the emergence of resistance and to control an ever-increasing number of epidemics caused by the malaria parasite¹². Although current efforts in antimalarial drug discovery are focused on identification of new biological targets, continued research on new 4-aminoquinoline derivatives is still warranted. This is because the hemoglobin degradation pathway in *P. falciparum* has a proven history as an excellent therapeutic target to which the parasite has difficulty in evolving resistance. In spite of resistance to chloroquine, previous work has shown that modification of the lateral side chain of chloroquine results in aminoquinoline derivatives that avoid the chloroquine resistance mechanism^{13,14}.

CONTACT Jean Guillon ✉ jean.guillon@u-bordeaux.fr Univ. Bordeaux, UFR des Sciences Pharmaceutiques, INSERM U1212/UMR CNRS 5320, ARNA Laboratory, F-33076 Bordeaux cedex, France

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A possibility to overcome this multidrug-resistant mechanism is to design new quinoline-based drugs which will not be recognized by the protein system involved in drug efflux. In this regard, two series of compounds that show promise in this regard are the bisquinoline and bisacridine antimalarial drugs A and B (Figure 1)^{15–18}. These drugs show much lower resistance indices than chloroquine, indicating that the bisquinoline or bisacridine structures are less efficiently excluded by drug-resistant parasites.

The pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline heterocyclic framework constitutes the basis of an important class of compounds possessing interesting biological activities. These compounds have been reported as key intermediates for the assembly of several heterocycles including antipsychotic agents, anti-HIV agents, adenosine A₃ receptor modulators¹⁹, antiparasitic agents^{20–25} and antitumor agents^{26–30}. In the course of our work devoted to discover new compounds employed in the antiparasitic chemotherapy, we previously identified some series of substituted pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives designed as interesting bioactive isosteres of quinoline derivatives^{20–24}. Thus, taking into account our experience in the field of the synthesis of new antimalarial heterocyclic compounds based on our pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline heterocyclic core^{20–24,27–30}, we decided to incorporate a benzyl group in position 4 of the heterocyclic skeleton of our previously described bispyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines C²⁰ to broaden the structural diversity of these derivatives, and mainly to increase the aromatic surface of these designed compounds (Figure 1).

Hence, we described here the synthesis of new bis- or trispyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives **1a–t** (Figure 1) and reported on their *in vitro* antiplasmodial activity against the chloroquine-sensitive (3D7) and the chloroquine-resistant (W2) strains of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. As these new compounds were designed as quinoline-like bio-isosteres, and as the quinoline skeleton is the fundamental unit of many antiprotozoan drugs, these pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives were also investigated on another medically important protozoan, *Leishmania donovani*, in order to evaluate the specificity of their antiparasitic activity. Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. *Leishmania* parasites exist in two major morphological stages: extracellular flagellated promastigotes in the digestive tract of their sandfly vector, which is the infective stage and immobile intracellular amastigotes in the cells of their host's mononuclear phagocytic system. Leishmaniasis presents various clinical aspects including cutaneous leishmaniasis, the most common form, muco-cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis, the most severe form, lethal in untreated patients. *Leishmania donovani* is one of the major causative agents of human visceral leishmaniasis which represents a public health problem: 0.2 to 0.4 million visceral leishmaniasis cases occur each year and more than 90% of global visceral leishmaniasis cases occur in just five countries: India, Bangladesh, Sudan, Brazil and Ethiopia³¹. The current treatment of the disease is based on a limited number of chemotherapeutic agents (meglumine antimoniate, sodium stibogluconate, pentamidine, amphotericin B and miltefosine) which present many limits, notably characterized by a high toxicity and cost^{32,33}. In addition, the *in vitro* cytotoxicity of these new molecules was assessed on the human HepG2 cell line, in order to determine their selectivity index. Moreover, as the telomeres of the parasite could constitute an attractive target, we also investigated the possibility of targeting *Plasmodium* telomeres by stabilizing the *Plasmodium* telomeric G-quadruplexes through a FRET melting assay by our new synthesized compounds. Indeed, telomerase activity has been identified in gametocytes and during the transition to erythrocytic stage of *P. falciparum*³⁴. The telomeric 3' G-overhang region of *P. falciparum* is comprised of repeated degenerate unit 5'-GGGTTTA-3' (where Y may be T or C)³⁵ which can fold into intramolecular G-quadruplex³⁶.

Materials and methods

Chemistry

Commercial reagents were used as received without additional purification. Melting points were determined with an SM-LUX-POL Leitz hot-stage microscope (Leitz GMBH, Midland, ON) and are uncorrected. IR spectra were recorded on a NICOLET 380FT-IR spectrophotometer (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI). NMR spectra were recorded with tetramethylsilane as an internal standard using a BRUKER AVANCE 300 spectrometer (Bruker BioSpin, Wissembourg, France). Splitting patterns have been designated as follows: s = singlet; bs = broad singlet; d = doublet; t = triplet; q = quartet; qt = quintet; dd = double doublet; ddd = double double doublet; dt = double triplet; m = multiplet. Analytical TLC were carried out on 0.25 precoated silica gel plates (POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄) and visualization of compounds after UV light irradiation. Silica gel 60 (70–230 mesh) was used for column chromatography. Microwave experiments were carried out using a focused microwave reactor (CEM Discover, Saclay, France). High resolution mass spectra (electrospray in positive mode, ESI+) were recorded on a Waters Q-TOF Ultima apparatus. Mass spectra were recorded on an Ultraflex III TOF/TOF system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), equipped with 200 Hz smartbeam laser (355 nm) and operating in reflectron positive ion mode. Mass spectra were acquired over the *m/z* range 300–5000 by accumulating data from 1000 laser shots for each spectrum. The instrumental conditions employed to analyze molecular species were the following: ion source 1: 25.08 kV; ion source 2: 21.98 kV, lens: 11.03 kV, pulsed ion extraction: 30 ns, reflector: 26.39 kV, reflector 2: 13.79 kV. Matrix suppression was activated by deflection mode: suppression up to 450 Da. Mass calibration was performed for each sample with a peptide calibration mixture (8206195, Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics). The instrument was controlled using Bruker's flexControl 3.4 software and mass spectra were analyzed in Bruker's FlexAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonics, Billerica, MA).

General procedure for the synthesis of 4-(pyrrolo [1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzaldehydes and 3-(pyrrolo [1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzaldehydes

To suspension of 4-chloropyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline **7** (3.3 mmol), and Pd(PPh₃)₄ (0.164 mmol) in a mixture of toluene/EtOH (50/3 mL) under nitrogen were added K₂CO₃ (3.6 mmol) and phenylboronic acid (3.6 mmol). The reaction mixture was refluxed for 24 h, and the cooled suspension was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 70 mL). The organic layer was washed with a saturated solution of NaCl (90 mL), and the combined organic extracts were dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude residue was triturated in ethanol. The resulting precipitate was filtered, washed with ethanol, and purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane as eluent gave the pure product **8**.

4-(9-Methoxypyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzaldehyde (**8d**)

Yellow crystals, Yield: 85%, mp = 162–164 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr)/cm^{−1} 1705 (CHO); ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 10.15 (s, 1H, CHO), 8.90 (dd, 1H, *J* = 2.70 and 1.20 Hz, H-1), 8.17 (d, 2H, *J* = 8.40 Hz, H-2' and H-6'), 8.08 (d, 2H, *J* = 8.40 Hz, H-3' and H-5'), 7.70 (dd, 1H, *J* = 8.10 and 1.20 Hz, H-6), 7.42 (t, 1H, *J* = 8.10 Hz, H-7), 7.13 (dd, 1H, *J* = 8.10 and 1.20 Hz, H-8), 7.00 (dd, 1H, *J* = 3.90 and 1.20 Hz, H-3), 6.90 (dd, 1H, *J* = 3.90 and 2.70 Hz, H-2), 4.13 (s, 3H, OCH₃). MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₁₉H₁₅N₂O₂: 303.113, Found: 303.127.

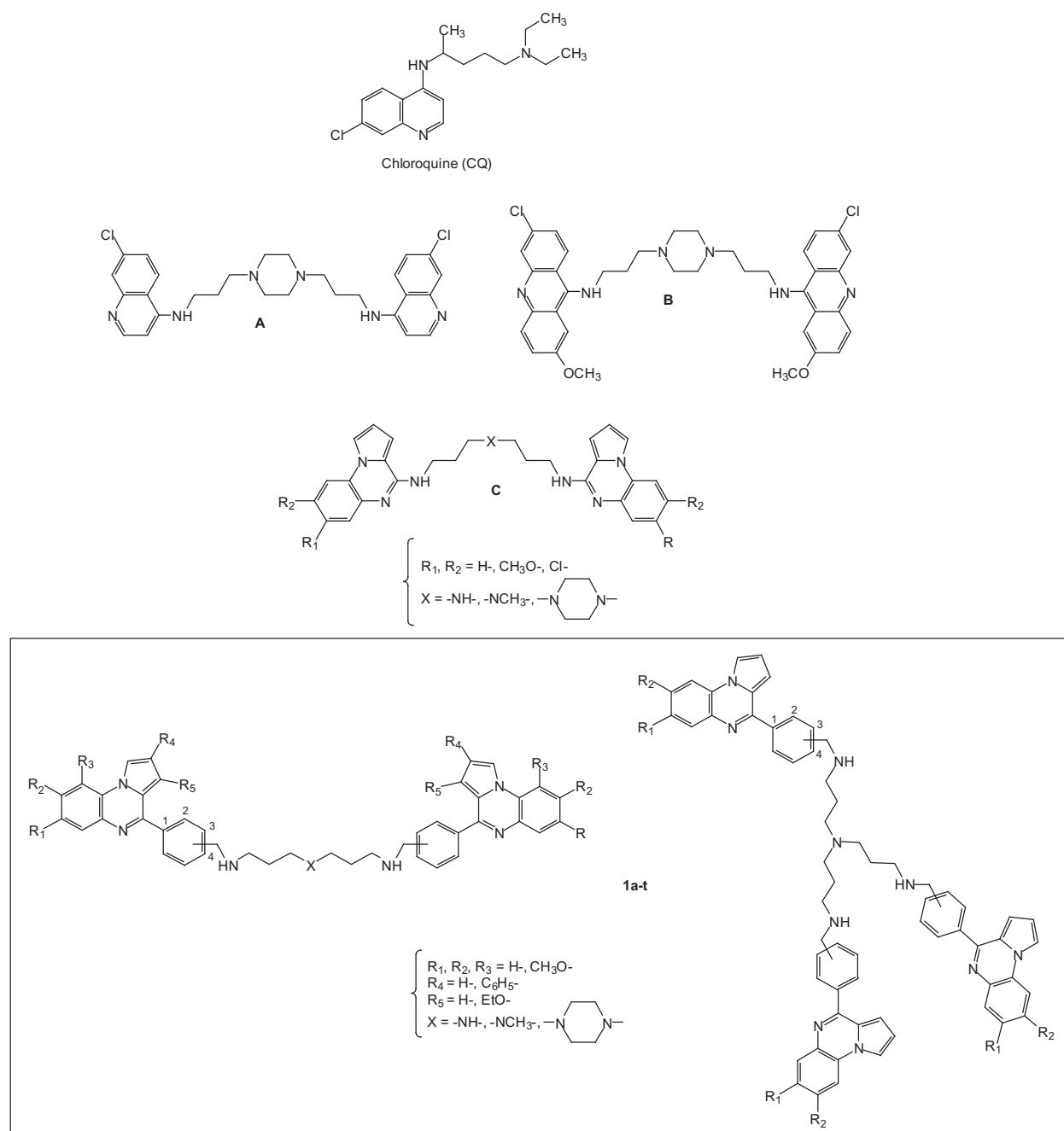


Figure 1. Structure of chloroquine, bisquinolines A, bisacridines B, bispyrrolo[1,2-a]quinoxalines C, and new synthesized substituted bis- and trispyrrolo[1,2-a]quinoxaline derivatives 1a-t.

4-(3-Ethoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzaldehyde (8e)

Yellow crystals, Yield: 68%, mp = 170–172 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 1700 (CHO); ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 10.14 (s, 1H, CHO), 8.00–7.98 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' and H-6'), 7.94 (dd, 1H, *J* = 8.10 and 1.40 Hz, H-6), 7.84 (d, 1H, *J* = 3.15 Hz, H-1), 7.81 (dd, 1H, *J* = 8.10 and 1.40 Hz, H-9), 7.50 (ddd, 1H, *J* = 8.10, 8.10 and 1.40 Hz, H-7), 7.43 (ddd, 1H, *J* = 8.10, 8.10 and 1.40 Hz, H-8), 6.54 (d, 1H, *J* = 3.15 Hz, H-2), 3.97 (q, 2H, *J* = 6.90 Hz, OCH₂), 1.17 (t, 3H, *J* = 6.90 Hz, CH₃). MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₂₀H₁₇N₂O₂: 317.129, Found: 317.135.

3-(Pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzaldehyde (8g)

Yellow crystals, Yield: 68%, mp = 147–150 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 1700 (CHO); ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 10.18 (s, 1H, CHO), 8.56

(s, 1H, H-2'), 8.32 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz, H-6), 8.09 (dd, 1H, *J* = 2.85 and 1.30 Hz, H-1), 8.08–8.05 (m, 2H, H-4' and H-6'), 7.93 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz, H-9), 7.75 (t, 1H, *J* = 7.65 Hz, H-5'), 7.56 (t, 1H, *J* = 7.80 Hz, H-7), 7.53 (t, 1H, *J* = 7.80 Hz, H-8), 7.02 (dd, 1H, *J* = 3.90 and 1.30 Hz, H-3), 6.96 (dd, 1H, *J* = 3.90 and 2.85 Hz, H-2). MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₁₈H₁₃N₂O: 273.103, Found: 273.127.

3-(8-Methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzaldehyde (8h)

Beige crystals, Yield: 87%, mp = 135–138 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹ 1705 (CHO); ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 10.16 (s, 1H, CHO), 8.54 (dd, 1H, *J* = 1.50 and 1.50 Hz, H-2'), 8.30 (ddd, 1H, *J* = 7.65, 1.50 and 1.50 Hz, H-4'), 8.05 (ddd, 1H, *J* = 7.65, 1.50 and 1.50 Hz, H-6'), 8.02 (d, 1H, *J* = 9.15 Hz, H-6), 7.95 (dd, 1H, *J* = 2.70 and 1.50 Hz, H-1),

7.73 (t, 1H, $J=7.65$ Hz, H-5'), 7.32 (d, 1H, $J=2.70$ Hz, H-9), 7.10 (dd, 1H, $J=9.15$ and 2.70 Hz, H-7), 6.99 (dd, 1H, $J=3.90$ and 1.50 Hz, H-3), 6.95 (dd, 1H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, H-2), 4.01 (s, 3H, CH₃O). MALDI-TOF MS m/z [M+H]⁺ Calcd for C₁₉H₁₅N₂O₂: 303.113, Found: 303.135.

General procedure for bis[N-[(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]methylamine and bis[N-[(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]piperazine 9a-p, bis[N-[4-(indolo[1,2-*a*]quinoxalin-6-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]methylamine 9q and bis[N-[4-(4-phenylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-2-yl)methylidene]-3-aminopropyl]piperazine 9r

To a solution of diamine (2.7 mmol) in ethanol (15 mL) was added (pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzaldehyde **8a-h** or (indolo[1,2-*a*]quinoxalin-6-yl)benzaldehyde **8i** or 4-phenylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-2-carboxaldehyde **8j** (5.4 mmol). The reaction mixture was then heated under reflux for 5 h and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was extracted with dichloromethane (40 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The products were then used without further purification.

Bis[N-[4-(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]amine (9a)

Yellow crystals, Yield: 93%, mp =107–109 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.31 (s, 2H, 2 HC=N), 8.03–7.80 (m, 8H, 2 H-2', 2 H-6', 2 H-6 and 2 H-1), 7.63 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.54–7.34 (m, 4H, 2 H-7 and 2 H-8), 6.96 (dd, 2H, $J=4.05$ and 1.30 Hz, 2 H-3), 6.86 (dd, 2H, $J=4.05$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 4.09 (s, 1H, NH), 3.73–3.20 (m, 4H, 2 CH₂), 2.88–2.31 (m, 4H, 2 CH₂), 2.11–1.85 (m, 4H, 2 CH₂).

Bis[N-[4-(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]methylamine (9b)

Yellow oil, Yield: 89%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.05 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 8.02 (dd, 2H, $J=8.25$ and 1.40 Hz, 2 H-6), 7.97 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.30 Hz, 2 H-1), 7.90 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.85 (dd, 2H, $J=8.25$ and 1.40 Hz, 2 H-9), 7.52 (ddd, 2H, $J=8.25$, 8.25 and 1.40 Hz, 2 H-7), 7.44 (ddd, 2H, $J=8.25$, 8.25 and 1.40 Hz, 2 H-8), 6.96 (dd, 2H, $J=4.05$ and 1.30 Hz, 2 H-3), 6.87 (dd, 2H, $J=4.05$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 3.74 (t, 4H, $J=7.10$ Hz, 2 CH₂), 2.53 (t, 4H, $J=7.10$ Hz, 2 CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.96 (qt, 4H, $J=7.10$ Hz, 2 CH₂).

Bis[N-[4-(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]piperazine (9c)

Pale-yellow crystals, Yield: 78%, mp =177–180 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.07 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 8.04 (dd, 2H, $J=8.10$ and 1.20 Hz, 2 H-6), 7.97 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.25 Hz, 2 H-1), 7.91 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.90 (dd, 2H, $J=8.10$ and 1.20 Hz, 2 H-9), 7.55 (ddd, 2H, $J=8.10$, 8.10 and 1.20 Hz, 2 H-7), 7.49 (ddd, 2H, $J=8.10$, 8.10 and 1.20 Hz, 2 H-8), 7.01 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.25 Hz, 2 H-3), 6.93 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 3.73 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.78–2.50 (m, 8H, 4 CH₂ pip.), 2.54 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 1.99 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂).

Bis[N-[4-(7-methoxypyrrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]methylamine (9d)

Yellow crystals, Yield: 96%, mp =67–69 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.03 (d, 4H, $J=8.10$ Hz, 2 H-2' and

2 H-6'), 7.91 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2 H-1), 7.89 (d, 4H, $J=8.10$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.78 (d, 2H, $J=9.00$ Hz, 2 H-9), 7.49 (d, 2H, $J=2.90$ Hz, 2 H-6), 7.14 (dd, 2H, $J=9.00$ and 2.90 Hz, 2 H-8), 6.94 (dd, 2H, $J=4.20$ and 1.20 Hz, 2 H-3), 6.85 (dd, 2H, $J=4.20$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 3.93 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.74 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.52 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 1.96 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂).

Bis[N-[4-(7-methoxypyrrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]piperazine (9e)

Yellow crystals, Yield: 96%, mp =78–80 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.07 (d, 4H, $J=8.20$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 7.97 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2 H-1), 7.91 (d, 4H, $J=8.20$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.83 (d, 2H, $J=9.00$ Hz, 2 H-9), 7.53 (d, 2H, $J=3.00$ Hz, 2 H-6), 7.17 (dd, 2H, $J=9.00$ and 3.00 Hz, 2 H-8), 6.99 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.20 Hz, 2 H-3), 6.90 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 3.95 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.73 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.71–2.45 (m, 8H, 4 CH₂ pip.), 2.50 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 1.97 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂).

Bis[N-[4-(8-methoxypyrrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]methylamine (9f)

Yellow crystals, Yield: 96%, mp =61–63 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.40 (s, 2H, 2 HC=N), 8.02 (d, 4H, $J=8.20$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 7.94 (d, 2H, $J=9.00$ Hz, 2 H-6), 7.88 (d, 4H, $J=8.20$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.87 (dd, 2H, $J=2.75$ and 1.20 Hz, 2 H-1), 7.26 (d, 2H, $J=2.70$ Hz, 2 H-9), 7.05 (dd, 2H, $J=9.00$ and 2.70 Hz, 2 H-7), 6.95 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.20 Hz, 2 H-3), 6.86 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.75 Hz, 2 H-2), 3.99 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.73 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.51 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 1.96 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂).

Bis[N-[4-(8-methoxypyrrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]piperazine (9g)

Pale-yellow crystals, Yield: 97%, mp =218–221 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.40 (s, 2H, 2 HC=N), 8.06 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 7.99 (d, 2H, $J=9.00$ Hz, 2 H-6), 7.93 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2 H-1), 7.90 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.31 (d, 2H, $J=2.70$ Hz, 2 H-9), 7.09 (dd, 2H, $J=9.00$ and 2.70 Hz, 2 H-7), 6.98 (dd, 2H, $J=4.05$ and 1.20 Hz, 2 H-3), 6.93 (dd, 2H, $J=4.05$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 4.00 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.73 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.72–2.43 (m, 8H, 4 CH₂ pip.), 2.53 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 1.98 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂).

Bis[N-[4-(9-methoxypyrrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]methylamine (9h)

Yellow crystals, Yield: 96%, mp =62–64 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.82 (dd, 2H, $J=2.75$ and 1.45 Hz, 2 H-1), 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.03 (d, 4H, $J=8.25$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 7.90 (d, 4H, $J=8.25$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.66 (dd, 2H, $J=8.15$ and 1.20 Hz, 2 H-8), 7.36 (t, 2H, $J=8.15$ Hz, 2 H-7), 7.05 (dd, 2H, $J=8.15$ and 1.20 Hz, 2 H-6), 6.98 (dd, 2H, $J=4.10$ and 1.45 Hz, 2 H-3), 6.83 (dd, 2H, $J=4.10$ and 2.75 Hz, 2 H-2), 4.09 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.73 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.51 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 1.96 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH₂).

Bis[N-[4-(9-methoxypyrrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]piperazine (9i)

Pale-yellow crystals, Yield: 94%, mp =79–82 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.87 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.35 Hz, 2 H-1), 8.40

(s, 2H, 2 HC=N), 8.05 (d, 4H, J =8.25 Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.90 (d, 4H, J =8.25 Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.69 (dd, 2H, J =8.10 and 1.20 Hz, 2H-8), 7.40 (t, 2H, J =8.10 Hz, 2H-7), 7.09 (dd, 2H, J =8.10 and 1.20 Hz, 2H-6), 7.00 (dd, 2H, J =4.20 and 1.35 Hz, 2H-3), 6.87 (dd, 2H, J =4.20 and 2.70 Hz, 2H-2), 4.12 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.72 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 2.68–2.44 (m, 8H, 4 CH₂ pip.), 2.52 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 1.98 (qt, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂).

Bis[N-4-(3-ethoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl)methylamine (9j)

Yellow crystals, Yield: 97%, mp =37–39 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.39 (s, 2H, 2 HC=N), 7.91 (dd, 2H, J =7.80 and 1.50 Hz, 2H-6), 7.86 (d, 4H, J =8.40 Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.82 (d, 4H, J =8.40 Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.76 (d, 2H, J =3.00 Hz, 2H-1), 7.73 (dd, 2H, J =7.80 and 1.50 Hz, 2H-9), 7.43 (ddd, 2H, J =7.80, 7.80 and 1.50 Hz, 2H-7), 7.35 (ddd, 2H, J =7.80, 7.80 and 1.50 Hz, 2H-8), 6.48 (d, 2H, J =3.00 Hz, 2H-2), 3.92 (q, 4H, J =6.90 Hz, 2 OCH₂), 3.72 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 2.50 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.95 (qt, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 1.17 (t, 6H, J =6.90 Hz, 2 CH₃).

Bis[N-4-(3-ethoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl)piperazine (9k)

Yellow oil, Yield: 97%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.38 (s, 2H, 2 HC=N), 7.93 (dd, 2H, J =7.80 and 1.50 Hz, 2H-6), 7.88 (d, 4H, J =8.40 Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.83 (d, 4H, J =8.40 Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.80 (d, 2H, J =3.00 Hz, 2H-1), 7.78 (dd, 2H, J =7.80 and 1.50 Hz, 2H-9), 7.47 (ddd, 2H, J =7.80, 7.80 and 1.50 Hz, 2H-7), 7.41 (ddd, 2H, J =7.80, 7.80 and 1.50 Hz, 2H-8), 6.53 (d, 2H, J =3.00 Hz, 2H-2), 3.96 (q, 4H, J =6.90 Hz, 2 OCH₂), 3.71 (t, 4H, J =7.05 Hz, 2 CH₂), 2.68–2.37 (m, 8H, 4 CH₂ pip.), 2.48 (t, 4H, J =7.05 Hz, 2 CH₂), 1.96 (qt, 4H, J =7.05 Hz, 2 CH₂), 1.19 (t, 6H, J =6.90 Hz, 2 CH₃).

Bis[N-4-(2-phenylpyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl)piperazine (9l)

Orange crystals, Yield: 95%, mp =116–119 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.43 (s, 2H, 2 HC=N), 8.29 (d, 2H, J =1.50 Hz, 2H-1), 8.11 (d, 4H, J =8.40 Hz, 2H-2' and 2H-6'), 8.07 (dd, 2H, J =7.80 and 1.50 Hz, 2H-6), 7.94 (dd, 2H, J =7.80 and 1.50 Hz, 2H-9), 7.92 (d, 4H, J =8.40 Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.74–7.70 (m, 4H, 2H-2" and 2H-6"), 7.58 (ddd, 2H, J =7.80, 7.80 and 1.50 Hz, 2H-7), 7.51 (ddd, 2H, J =7.80, 7.80 and 1.50 Hz, 2H-8), 7.43 (t, 4H, J =7.20 Hz, 2H-3" and 2H-5"), 7.36–7.30 (m, 2H, 2H-4"), 7.25 (d, 2H, J =1.50 Hz, 2H-3), 3.74 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 2.67–2.40 (m, 8H, 4 CH₂ pip.), 2.52 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 1.99 (qt, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂).

Bis[N-3-(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl)methylamine (9m)

Yellow oil, Yield: 97%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.43 (s, 2H, 2 HC=N), 8.30 (t, 2H, J =1.50 Hz, 2H-2'), 8.09–8.03 (m, 4H, 2H-6 and 2H-4'), 8.02 (dd, 2H, J =2.70 and 1.35 Hz, 2H-1), 7.93–7.86 (m, 4H, 2H-6' and 2H-9), 7.63–7.44 (m, 4H, 2H-5', 2H-7 and 2H-8), 7.03 (dd, 2H, J =3.90 and 1.35 Hz, 2H-3), 6.90 (dd, 2H, J =3.90 and 2.70 Hz, 2H-2), 3.71 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 2.47 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.93 (qt, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂).

Bis[N-3-(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl)piperazine (9n)

Yellow oil, Yield: 98%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.42 (s, 2H, 2 HC=N), 8.32 (s, 2H, 2H-2'), 8.09–8.03 (m, 6H, 2H-6, 2H-4' and

2H-1), 7.98–7.90 (m, 4H, 2H-6' and 2H-9), 7.63–7.46 (m, 4H, 2H-5', 2H-7 and 2H-8), 7.03–7.01 (m, 2H, 2H-3), 6.93–6.91 (m, 2H, 2H-2), 3.71 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 2.65–2.42 (m, 8H, 4 CH₂ pip.), 2.48 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂), 1.95 (qt, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂).

Bis[N-3-(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl)methylamine (9o)

Yellow oil, Yield: 98%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.29 (dd, 2H, J =1.50 and 1.50 Hz, 2H-2'), 8.03 (ddd, 2H, J =7.35, 1.50 and 1.50 Hz, 2H-4'), 7.97 (d, 2H, J =9.00 Hz, 2H-6), 7.93 (ddd, 2H, J =7.35, 1.50 and 1.50 Hz, 2H-6'), 7.89 (dd, 2H, J =2.85 and 1.35 Hz, 2H-1), 7.56 (t, 2H, J =7.65 Hz, 2H-5'), 7.30 (d, 2H, J =2.70 Hz, 2H-9), 7.07 (dd, 2H, J =9.00 and 2.70 Hz, 2H-7), 6.97 (dd, 2H, J =3.90 and 1.35 Hz, 2H-3), 6.89 (dd, 2H, J =3.90 and 2.85 Hz, 2H-2), 3.99 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.71 (t, 4H, J =7.05 Hz, 2 NCH₂), 2.50 (t, 4H, J =7.05 Hz, 2 NCH₂), 2.30 (s, 3H, NCH₃), 1.93 (qt, 4H, J =7.05 Hz, 2 CH₂).

Bis[N-3-(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl)piperazine (9p)

Orange oil, Yield: 55%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.41 (s, 2H, 2 HC=N), 8.30 (dd, 2H, J =1.50 and 1.50 Hz, 2H-2'), 8.05 (ddd, 2H, J =7.40, 1.50 and 1.50 Hz, 2H-4'), 8.01 (d, 2H, J =9.00 Hz, 2H-6), 7.94 (ddd, 2H, J =7.40, 1.50 and 1.50 Hz, 2H-6'), 7.91 (dd, 2H, J =2.70 and 1.35 Hz, 2H-1), 7.59 (t, 2H, J =7.40 Hz, 2H-5'), 7.29 (d, 2H, J =2.70 Hz, 2H-9), 7.08 (dd, 2H, J =9.00 and 2.70 Hz, 2H-7), 6.98 (dd, 2H, J =3.90 and 1.35 Hz, 2H-3), 6.92 (dd, 2H, J =3.90 and 2.70 Hz, 2H-2), 4.00 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.70 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 NCH₂), 2.62–2.42 (m, 8H, 4 NCH₂ pip.), 2.48 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 NCH₂), 1.95 (qt, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂).

Bis[N-4-(indolo[1,2-a]quinoxalin-6-yl)benzylidene]-3-aminopropyl)methylamine (9q)

Yellow crystals, Yield: 84%, mp =226–229 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.57 (d, 2H, J =8.00 Hz, 2H-11), 8.53 (d, 2H, J =8.10 Hz, 2H-1), 8.44 (s, 2H, 2 HC=N), 8.15–8.08 (m, 6H, 2H-2', 2H-6' and 2H-4), 7.97–7.92 (m, 6H, 2H-3', 2H-5' and 2H-8), 7.70–7.57 (m, 4H, 2H-2 and 2H-3), 7.51–7.45 (m, 4H, 2H-9 and 2H-10), 7.26 (s, 2H, 2H-7), 3.76 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 NCH₂), 2.87–2.55 (m, 12H, 4 NCH₂ pip. and 2 NCH₂), 2.09 (qt, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂).

Bis[N-4-(phenylpyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-2-yl)methylidene]-3-aminopropyl)piperazine (9r)

Beige crystals, Yield: 60%, mp >250 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.44 (s, 2H, 2 HC=N), 8.32 (d, 2H, J =1.10 Hz, 2H-1), 8.06 (dd, 2H, J =7.80 and 1.60 Hz, 2H-6), 8.02–7.99 (m, 4H, 2H-2' and 2H-6'), 7.90 (dd, 2H, J =7.80 and 1.60 Hz, 2H-9), 7.59–7.53 (m, 8H, 2H-3', 2H-4', 2H-5' and 2H-7), 7.50 (ddd, 2H, J =7.80, 7.80, 1.60 Hz, 2H-8), 7.29 (d, 2H, J =1.10 Hz, 2H-3), 3.67 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 NCH₂), 2.69–2.43 (m, 8H, 4 NCH₂ pip.), 2.47 (t, 4H, J =6.90 Hz, 2 NCH₂), 1.94 (qt, 4H, J =6.90 Hz, 2 CH₂).

General procedure for tris[N-3-(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropylamines 9s–t

To a solution of triamine (1.8 mmol) in ethanol (15 mL) was added (pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzaldehyde **8i–j** (5.4 mmol). The reaction mixture was then heated under reflux for 5 h and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the

residue was extracted with dichloromethane (40 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. Products were then used without further purification.

Tris[N-[4-(7-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]amine (9s)

Orange oil, Yield: 82%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.42 (s, 2H, 3 HC=N), 7.99 (d, 6H, $J=8.40$ Hz, 3 H-2' and 3 H-6'), 7.88 (d, 6H, $J=8.40$ Hz, 3 H-3' and 3 H-5'), 7.86 (dd, 3H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 3 H-1), 7.73 (d, 3H, $J=9.00$ Hz, 3 H-9), 7.45 (d, 3H, $J=2.80$ Hz, 3 H-6), 7.11 (dd, 3H, $J=9.00$ and 2.80 Hz, 3 H-8), 6.90 (dd, 3H, $J=4.05$ and 1.20 Hz, 3 H-3), 6.80 (dd, 3H, $J=4.05$ and 2.70 Hz, 3 H-2), 3.91 (s, 9H, 3 CH_3O), 3.76 (t, 6H, $J=6.90$ Hz, 3 CH_2), 2.64 (t, 6H, $J=6.90$ Hz, 3 NCH_2), 1.96 (qt, 6H, $J=6.90$ Hz, 3 CH_2).

Tris[N-[3-(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylidene]-3-aminopropyl]amine (9t)

Orange oil, Yield: 71%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.40 (s, 3H, 3 HC=N), 8.27 (dd, 3H, $J=1.50$ and 1.50 Hz, 3 H-2'), 7.99 (ddd, 3H, $J=7.80$, 1.50 and 1.50 Hz, 3 H-4'), 7.98 (d, 3H, $J=9.00$ Hz, 3 H-6), 7.92 (ddd, 3H, $J=7.80$, 1.50 and 1.50 Hz, 3 H-6'), 7.86 (dd, 3H, $J=2.85$ and 1.35 Hz, 3 H-1), 7.52 (t, 3H, $J=7.80$ Hz, 3 H-5'), 7.25 (d, 3H, $J=2.70$ Hz, 3 H-9), 7.04 (dd, 3H, $J=9.00$ and 2.70 Hz, 3 H-7), 6.94 (dd, 3H, $J=4.05$ and 1.35 Hz, 3 H-3), 6.87 (dd, 3H, $J=4.05$ and 2.85 Hz, 3 H-2), 3.98 (s, 9H, 3 CH_3O), 3.71 (t, 6H, $J=6.90$ Hz, 3 NCH_2), 2.61 (t, 6H, $J=6.90$ Hz, 3 NCH_2), 1.92 (qt, 6H, $J=6.90$ Hz, 3 CH_2).

N, N' - [oxybis(2, 1-ethanediyl)oxy-2, 1-ethanediyl]] bis-3-(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylimine 9u

To a solution of 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecane (0.56 mmol) in ethanol (12 mL) was added 3-(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzaldehyde **8j** (1.12 mmol). The reaction mixture was then heated under reflux for 5 h and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was extracted with dichloromethane (35 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. Product **9u** was then used without further purification. Yellow oil, Yield: 97%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.39 (s, 2H, 2 HC=N), 8.29 (dd, 2H, $J=1.50$ and 1.50 Hz, 2 H-2'), 8.05–7.87 (m, H, 2 H-4', 2 H-6, 2 H-6' and 2 H-1), 7.59–7.55 (m, 2H, 2 H-5'), 7.27 (d, 2H, $J=2.70$ Hz, 2 H-9), 7.06 (dd, 2H, $J=9.00$ and 2.70 Hz, 2 H-7), 6.96 (m, 2H, 2 H-3), 6.88 (m, 2H, 2 H-2), 3.95 (s, 6H, 2 CH_3O), 3.81–3.79 (m, 8H, 4 OCH_2), 3.64–3.62 (m, 8H, 4 OCH_2).

General procedure for bis[N-[(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]methylaniline and bis[N-[(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]piperazine 1a-p, bis[N-[4-(indolo[1,2-a]quinoxalin-6-yl)benzyl]-3-aminopropyl]piperazine 1q and bis[N-[(4-phenylpyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-2-yl)methyl]-3-aminopropyl]piperazine 1r and tris[N-[(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]amine 1s-t and N,N'-[oxybis(2,1-ethanediyl)oxy-2,1-ethanediyl]]bis-3-(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylamine 1u

To a solution of compound **9** (1.26 mmol) in methanol (40 mL) was added portion-wise at 0 °C sodium borohydride (10.1 mmol; 8 equiv.). The reaction mixture was then heated under reflux for 4 h and then evaporated to dryness under reduced pressure. After cooling, the residue was triturated in water and extracted with dichloromethane (85 mL). The organic layer was separated, dried

over sodium sulfate and evaporated to dryness. The residue were then purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane/methanol (90/10, v/v) as eluent to give the pure product **1**.

Bis[N-[4-(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]-amine (1a)

Yellow oil, Yield: 91%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.02 (dd, 2H, $J=7.80$ and 1.50 Hz, 2 H-6), 7.96 (d, 4H, $J=8.20$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 7.93 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2 H-1), 7.82 (dd, 2H, $J=7.80$ and 1.50 Hz, 2 H-9), 7.48 (d, 4H, $J=8.20$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.47–7.39 (m, 4H, 2 H-7 and 2 H-8), 6.98 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.20 Hz, 2 H-3), 6.86 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 3.89 (s, 4H, 2 NCH_2), 3.73 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.71 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 1.84 (bs, 3H, 3 NH), 1.77 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2) ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 155.3 (C-4), 141.8 (C-3a), 139.0 (C-5a), 138.7 (C-4'), 137.6 (C-1'), 131.5 (C-8), 130.3 (C-2' and C-6'), 130.1 (C-3' and C-5'), 128.8 (C-7), 128.5 (C-9a), 126.6 (C-6), 116.0 (C-1), 115.4 (C-2), 115.0 (C-9), 110.0 (C-3), 54.5 (NCH_2), 50.0 (NCH_2), 48.9 (NCH_2), 27.7 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_7$: 644.350, Found: 644.342.

Bis[N-[4-(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]methylaniline (1b)

Orange oil, Yield: 94%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.00 (dd, 2H, $J=8.00$ and 1.35 Hz, 2 H-6), 7.96 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 7.95 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.30 Hz, 2 H-1), 7.83 (dd, 2H, $J=8.00$ and 1.35 Hz, 2 H-9), 7.49 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.47–7.39 (m, 4H, 2 H-7 and 2 H-8), 6.97 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.30 Hz, 2 H-3), 6.86 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 3.88 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.71 (t, 4H, $J=7.10$ Hz, 2 NCH_2), 2.43 (t, 4H, $J=7.10$ Hz, 2 NCH_2), 2.24 (s, 3H, NCH_3), 1.73 (qt, 4H, $J=7.10$ Hz, 2 CH_2) ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 155.2 (C-4), 140.2 (C-3a), 139.3 (C-5a), 139.2 (C-4'), 137.5 (C-1'), 131.5 (C-8), 130.4 (C-2' and C-6'), 130.3 (C-3' and C-5'), 128.8 (C-7), 128.4 (C-9a), 126.6 (C-6), 116.0 (C-1), 115.4 (C-2), 115.0 (C-9), 110.0 (C-3), 57.3 (NCH_2), 54.1 (NCH_2), 48.6 (NCH_2), 43.4 (NCH_3), 27.0 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{44}\text{N}_7$: 658.366, Found: 658.362.

Bis[N-[4-(pyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]piperazine (1c)

Colorless oil, Yield: 61%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.04 (dd, 2H, $J=8.25$ and 1.35 Hz, 2 H-6), 8.00 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2 H-1), 7.98 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 7.89 (dd, 2H, $J=8.25$ and 1.35 Hz, 2 H-9), 7.53 (ddd, 2H, $J=8.25$, 8.25 and 1.35 Hz, 2 H-7), 7.50 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2 H-3' and 2 H-5'), 7.45 (ddd, 2H, $J=8.25$, 8.25 and 1.35 Hz, 2 H-8), 7.01 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.20 Hz, 2 H-3), 6.91 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, 2 H-2), 3.91 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.74 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.58–2.39 (m, 8H, 4 NCH_2 pip.), 2.44 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 1.76 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2) ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 155.2 (C-4), 140.8 (C-3a), 139.3 (C-5a), 139.2 (C-4'), 137.6 (C-1'), 131.6 (C-8), 130.3 (C-2' and C-6'), 130.2 (C-3' and C-5'), 128.9 (C-7), 128.5 (C-9a), 126.7 (C-6), 116.1 (C-1), 115.4 (C-2), 115.0 (C-9), 110.0 (C-3), 58.5 (NCH_2), 54.4 (NCH_2), 54.2 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 26.5 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_8$: 713.408, Found: 713.412.

Bis[N-[4-(7-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]methylaniline (1d)

Pale-yellow crystals, Yield: 88%, mp =65–67 °C; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 7.95 (d, 4H, $J=8.10$ Hz, 2 H-2' and 2 H-6'), 7.90

(dd, 2H, $J = 2.70$ and 1.20 Hz, 2H-1), 7.76 (d, 2H, $J = 9.00$ Hz, 2H-9), 7.49 (d, 2H, $J = 2.70$ Hz, 2H-6), 7.48 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.11 (dd, 2H, $J = 9.00$ and 2.70 Hz, 2H-8), 6.96 (dd, 2H, $J = 4.05$ and 1.20 Hz, 2H-3), 6.84 (dd, 2H, $J = 4.05$ and 2.70 Hz, 2H-2), 3.91 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.89 (s, 4H, 2 NCH₂), 2.72 (t, 4H, $J = 7.05$ Hz, 2 NCH₂), 2.43 (t, 4H, $J = 7.05$ Hz, 2 NCH₂), 1.73 (qt, 4H, $J = 7.05$ Hz, 2 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 158.5 (C-7), 155.9 (C-4), 143.7 (C-5a), 138.7 (C-3a), 138.5 (C-4'), 130.1 (C-2' and C-6'), 129.6 (C-3' and C-5'), 126.4 (C-1'), 122.8 (C-9a), 117.9 (C-9), 115.9 (C-8), 115.6 (C-1), 115.0 (C-2), 112.6 (C-3), 109.7 (C-6), 57.6 (NCH₂), 57.1 (OCH₃), 55.2 (NCH₂), 49.5 (NCH₂), 43.7 (NCH₃), 29.0 (CH₂). MALDI-TOF MS m/z [M + H]⁺ Calcd for C₄₅H₄₈N₇O₂: 718.387, Found: 718.399.

Bis[N-[4-(7-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]piperazine (1e)

Pale-yellow crystals, Yield: 93%, mp = 51–53 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 7.97 (d, 4H, $J = 8.20$ Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.93 (dd, 2H, $J = 2.75$ and 1.25 Hz, 2H-1), 7.79 (d, 2H, $J = 9.00$ Hz, 2H-9), 7.52 (d, 2H, $J = 2.70$ Hz, 2H-6), 7.49 (d, 4H, $J = 8.20$ Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.13 (dd, 2H, $J = 9.00$ and 2.70 Hz, 2H-8), 6.98 (dd, 2H, $J = 3.90$ and 1.25 Hz, 2H-3), 6.87 (dd, 2H, $J = 3.90$ and 2.75 Hz, 2H-2), 3.93 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.89 (s, 4H, 2 NCH₂), 2.71 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.60–2.35 (m, 8H, 4 NCH₂ pip.), 2.44 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 1.76 (qt, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 158.5 (C-7), 155.8 (C-4), 142.8 (C-5a), 138.8 (C-3a), 138.7 (C-4'), 130.1 (C-2' and C-6'), 129.8 (C-3' and C-5'), 126.4 (C-1'), 122.8 (C-9a), 118.0 (C-9), 116.0 (C-8), 115.7 (C-1), 115.1 (C-2), 112.7 (C-3), 109.7 (C-6), 58.5 (NCH₂), 57.1 (OCH₃), 54.8 (NCH₂), 54.6 (NCH₂), 49.5 (NCH₂), 27.7 (CH₂). MALDI-TOF MS m/z [M + H]⁺ Calcd for C₄₈H₅₃N₈O₂: 773.429, Found: 773.428.

Bis[N-[4-(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]methylamine (1f)

Yellow crystals, Yield: 71%, mp = 71–73 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 7.95 (d, 2H, $J = 9.00$ Hz, 2H-6), 7.93 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.86 (dd, 2H, $J = 2.70$ and 1.20 Hz, 2H-1), 7.47 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.26 (d, 2H, $J = 2.70$ Hz, 2H-9), 7.04 (dd, 2H, $J = 9.00$ and 2.70 Hz, 2H-7), 6.95 (dd, 2H, $J = 3.90$ and 1.20 Hz, 2H-3), 6.87 (dd, 2H, $J = 3.90$ and 2.70 Hz, 2H-2), 3.96 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.88 (s, 4H, 2 NCH₂), 2.71 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.43 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.25 (s, 3H, NCH₃), 1.73 (qt, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 160.4 (C-8), 153.0 (C-4), 143.3 (C-3a), 138.6 (C-5a), 132.7 (C-6), 132.0 (C-4'), 130.0 (C-2' and C-6'), 129.6 (C-3' and C-5'), 126.2 (C-1'), 126.6 (C-9a), 115.4 (C-7), 115.3 (C-1), 114.1 (C-2), 109.5 (C-3), 98.8 (C-9), 57.6 (NCH₂), 57.1 (OCH₃), 55.2 (NCH₂), 49.3 (NCH₂), 43.7 (NCH₃), 29.0 (CH₂). MALDI-TOF MS m/z [M + H]⁺ Calcd for C₄₅H₄₈N₇O₂: 718.387, Found: 718.399.

Bis[N-[4-(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]piperazine (1g)

Yellow oil, Yield: 97%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 7.96 (d, 2H, $J = 9.00$ Hz, 2H-6), 7.94 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.89 (dd, 2H, $J = 2.75$ and 1.20 Hz, 2H-1), 7.47 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.29 (d, 2H, $J = 2.70$ Hz, 2H-9), 7.06 (dd, 2H, $J = 9.00$ and 2.70 Hz, 2H-7), 6.97 (dd, 2H, $J = 3.90$ and 1.20 Hz, 2H-3), 6.89 (dd, 2H, $J = 3.90$ and 2.75 Hz, 2H-2), 3.97 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.88 (s, 4H, 2 NCH₂), 2.71 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.57–2.34 (m, 8H, 4 NCH₂ pip.), 2.43 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 1.74 (qt, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 160.4 (C-8), 153.0

(C-4), 143.3 (C-3a), 138.6 (C-5a), 132.7 (C-6), 132.0 (C-4'), 130.0 (C-2' and C-6'), 129.6 (C-3' and C-5'), 126.2 (C-1'), 126.7 (C-9a), 115.5 (C-7), 115.4 (C-1), 114.2 (C-2), 109.5 (C-3), 98.9 (C-9), 58.4 (NCH₂), 57.2 (OCH₃), 55.1 (NCH₂), 54.7 (NCH₂), 49.4 (NCH₂), 28.3 (CH₂). MALDI-TOF MS m/z [M + H]⁺ Calcd for C₄₈H₅₃N₈O₂: 773.429, Found: 773.446.

Bis[N-[4-(9-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]methylamine (1h)

Orange-pale oil, Yield: 92%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.83 (dd, 2H, $J = 2.70$ and 1.35 Hz, 2H-1), 7.95 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.66 (dd, 2H, $J = 8.10$ and 1.20 Hz, 2H-8), 7.48 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.37 (t, 2H, $J = 8.10$ Hz, 2H-7), 7.04 (dd, 2H, $J = 8.10$ and 1.20 Hz, 2H-6), 7.00 (dd, 2H, $J = 4.10$ and 1.35 Hz, 2H-3), 6.82 (dd, 2H, $J = 4.10$ and 2.70 Hz, 2H-2), 4.08 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.89 (s, 4H, 2 NCH₂), 2.71 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.43 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.25 (s, 3H, NCH₃), 1.73 (qt, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 155.9 (C-9), 151.1 (C-4), 143.5 (C-3a), 139.8 (C-5a), 138.5 (C-4'), 130.1 (C-2' and C-6'), 129.6 (C-3' and C-5'), 127.3 (C-9a), 125.7 (C-7), 123.9 (C-6), 123.7 (C-1), 119.8 (C-1'), 114.3 (C-2), 110.2 (C-8), 109.4 (C-3), 57.6 (OCH₃), 57.5 (NCH₂), 55.2 (NCH₂), 49.3 (NCH₂), 43.7 (NCH₃), 28.9 (CH₂). MALDI-TOF MS m/z [M + H]⁺ Calcd for C₄₅H₄₈N₇O₂: 718.387, Found: 718.416.

Bis[N-[4-(9-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]piperazine (1i)

Pale-yellow crystals, Yield: 94%, mp = 66–68 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.84 (dd, 2H, $J = 2.70$ and 1.20 Hz, 2H-1), 7.96 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.67 (dd, 2H, $J = 8.10$ and 1.20 Hz, 2H-8), 7.48 (d, 4H, $J = 8.10$ Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.37 (t, 2H, $J = 8.10$ Hz, 2H-7), 7.05 (dd, 2H, $J = 8.10$ and 1.20 Hz, 2H-6), 7.00 (dd, 2H, $J = 4.00$ and 1.20 Hz, 2H-3), 6.85 (dd, 2H, $J = 4.00$ and 2.70 Hz, 2H-2), 4.09 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.89 (s, 4H, 2 NCH₂), 2.71 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.57–2.31 (m, 8H, 4 NCH₂ pip.), 2.43 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 1.74 (qt, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 155.9 (C-9), 151.1 (C-4), 143.5 (C-3a), 139.8 (C-5a), 138.5 (C-4'), 130.1 (C-2' and C-6'), 129.6 (C-3' and C-5'), 127.3 (C-9a), 125.7 (C-7), 123.7 (C-6), 123.5 (C-1), 119.8 (C-1'), 114.3 (C-2), 110.2 (C-8), 109.4 (C-3), 58.4 (NCH₂), 57.6 (OCH₃), 55.1 (NCH₂), 54.7 (NCH₂), 49.4 (NCH₂), 28.3 (CH₂). MALDI-TOF MS m/z [M + H]⁺ Calcd for C₄₈H₅₃N₈O₂: 773.429, Found: 773.446.

Bis[N-[4-(3-ethoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]methylamine (1j)

Yellow oil, Yield: 85%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 7.91 (dd, 2H, $J = 7.80$ and 1.50 Hz, 2H-6), 7.79–7.74 (m, 8H, 2H-2', 2H-6', 2H-1 and 2H-9), 7.43–7.34 (m, 4H, 2H-3', 2H-5', 2H-7 and 2H-8), 6.48 (d, 2H, $J = 3.00$ Hz, 2H-2), 3.92 (q, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 OCH₂), 3.89 (s, 4H, 2 NCH₂), 2.68 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.43 (t, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 NCH₂), 2.24 (s, 3H, NCH₃), 1.72 (qt, 4H, $J = 6.90$ Hz, 2 CH₂), 1.16 (t, 6H, $J = 6.90$ Hz, 2 CH₃). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 156.2 (C-4), 145.7 (C-3a), 143.6 (C-5a), 138.2 (C-4'), 137.5 (C-1'), 131.1 (C-6), 130.9 (C-2' and C-6'), 128.5 (C-3' and C-5'), 128.3 (C-8), 128.0 (C-9a), 126.4 (C-7), 114.0 (C-1), 113.4 (C-3), 113.1 (C-9), 102.2 (C-2), 68.7 (OCH₂), 57.6 (NCH₂), 55.2 (NCH₂), 49.0 (NCH₂), 43.6 (NCH₃), 28.8 (CH₂), 16.1 (CH₃). MALDI-TOF MS m/z [M + H]⁺ Calcd for C₄₇H₅₂N₇O₂: 746.418, Found: 746.472.

Bis[N-[4-(3-ethoxypyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]piperazine (1k)

Yellow oil, Yield: 76%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 7.93 (dd, 2H, $J=7.80$ and 1.50 Hz, 2H-6), 7.80–7.75 (m, 8H, 2H-2', 2H-6', 2H-1 and 2H-9), 7.47 (ddd, 2H, $J=7.80$, 7.80 and 1.50 Hz, 2H-7), 7.42 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.36 (ddd, 2H, $J=7.80$, 7.80 and 1.50 Hz, 2H-8), 6.51 (d, 2H, $J=3.00$ Hz, 2H-2), 3.94 (q, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 OCH_2), 3.88 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.68 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.56–2.31 (m, 8H, 4 NCH_2 pip.), 2.42 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 1.73 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2), 1.17 (t, 6H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_3). ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 156.2 (C-4), 145.7 (C-3a), 142.6 (C-5a), 138.2 (C-4'), 137.5 (C-1'), 131.2 (C-6), 130.9 (C-2' and C-6'), 128.5 (C-3' and C-5'), 128.4 (C-8), 128.0 (C-9a), 126.4 (C-7), 114.0 (C-1), 113.5 (C-3), 113.2 (C-9), 102.3 (C-2), 68.8 (OCH_2), 58.4 (NCH_2), 55.1 (NCH_2), 54.7 (NCH_2), 49.1 (NCH_2), 28.3 (CH_2), 16.1 (CH_3). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{57}\text{N}_8\text{O}_2$: 801.460, Found: 801.505.

Bis[N-[4-(2-phenylpyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]piperazine (1l)

Pale-yellow crystals, Yield: 79%, mp =81–83 °C; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.27 (d, 2H, $J=1.20$ Hz, 2H-1), 8.07 (dd, 2H, $J=7.80$ and 1.30 Hz, 2H-6), 8.03 (d, 4H, $J=8.10$ Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.94 (dd, 2H, $J=7.80$ and 1.30 Hz, 2H-9), 7.71 (d, 4H, $J=7.50$ Hz, 2H-2'' and 2H-6''), 7.58–7.41 (m, 8H, 2H-3', 2H-5', 2H-7 and 2H-8), 7.45 (t, 4H, $J=7.80$ Hz, 2H-3'' and 2H-5''), 7.35–7.30 (m, 2H, 2H-4''), 7.26 (d, 2H, $J=1.20$ Hz, 2H-3), 2.73 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.65–2.38 (m, 8H, 4 NCH_2 pip.), 2.45 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 1.76 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2). ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 154.6 (C-4), 146.6 (C-3a), 140.0 (C-5a), 137.6 (C-4'), 135.4 (C-1'), 131.7 (C-8), 131.2 (C-1'), 130.6 (C-3'' and C-5''), 130.4 (C-2' and C-6'), 129.7 (C-7), 129.2 (C-4''), 128.6 (C-3'' and C-5''), 128.1 (C-9a), 127.6 (C-3' and C-5'), 126.9 (C-6), 118.7 (C-2), 115.0 (C-9), 112.8 (C-1), 107.2 (C-3), 58.5 (NCH_2), 54.0 (NCH_2), 53.2 (NCH_2), 49.5 (NCH_3), 31.1 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{57}\text{N}_8$: 865.470, Found: 865.454.

Bis[N-[3-(pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]methylamine (1m)

Pale-yellow oil, Yield: 83%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.04 (dd, $J=7.80$ and 1.80 Hz, 2H-6), 7.99 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2H-1), 7.94 (t, 2H, $J=1.50$ Hz, 2H-2'), 7.89–7.85 (m, 4H, 2H-6' and 2H-9), 7.55–7.42 (m, 8H, 2H-4', 2H-5', 2H-7 and 2H-8), 6.99 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.20 Hz, 2H-3), 6.88 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, 2H-2), 3.88 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.70 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.40 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.22 (s, 3H, NCH_3), 1.72 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2). ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 155.8 (C-4), 142.2 (C-3a), 139.8 (C-5a), 137.6 (C-3'), 131.5 (C-8), 131.0 (C-7), 130.0 (C-2'), 129.7 (C-5'), 128.8 (C-4'), 128.6 (C-6'), 128.5 (C-1'), 126.7 (C-9a), 126.6 (C-6), 116.0 (C-1), 115.4 (C-2), 115.0 (C-9), 110.1 (C-3), 57.4 (NCH_2), 55.3 (NCH_2), 49.4 (NCH_2), 43.6 (NCH_3), 28.8 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{44}\text{N}_7$: 658.366, Found: 658.395.

Bis[N-[3-(pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]piperazine (1n)

Pale-yellow oil, Yield: 96%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.05 (dd, $J=7.80$ and 1.80 Hz, 2H-6), 8.01 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2H-1), 7.96 (t, 2H, $J=1.50$ Hz, 2H-2'), 7.92–7.86 (m, 4H, 2H-6' and 2H-9), 7.56–7.43 (m, 8H, 2H-4', 2H-5', 2H-7 and 2H-8), 7.00 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.20 Hz, 2H-3), 6.90 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, 2H-2), 3.91 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.69 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2),

2.58–2.34 (m, 8H, 4 NCH_2 pip.), 2.34 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 1.95 (bs, 2H, 2 NH), 1.68 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2). ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 155.8 (C-4), 142.2 (C-3a), 139.9 (C-5a), 137.6 (C-3'), 131.5 (C-8), 131.0 (C-7), 130.0 (C-2'), 129.7 (C-5'), 128.9 (C-4'), 128.6 (C-6'), 128.5 (C-1'), 126.8 (C-9a), 126.7 (C-6), 116.0 (C-1), 115.4 (C-2), 115.0 (C-9), 110.1 (C-3), 58.4 (NCH_2), 55.2 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 28.2 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_8$: 713.408, Found: 713.447.

Bis[N-[3-(8-methoxypyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]methylamine (1o)

Yellow oil, Yield: 97%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 7.95 (d, 2H, $J=8.70$ Hz, 2H-6), 7.90 (dd, 2H, $J=1.50$ and 1.50 Hz, 2H-2'), 7.87–7.83 (m, 2H, 2H-4'), 7.85 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2H-1), 7.47–7.43 (m, 4H, 2H-5' and 2H-5''), 7.25 (d, 2H, $J=2.70$ Hz, 2H-9), 7.03 (dd, 2H, $J=8.85$ and 2.70 Hz, 2H-7), 6.94 (dd, 2H, $J=3.90$ and 1.20 Hz, 2H-3), 6.86 (dd, 2H, $J=3.90$ and 2.70 Hz, 2H-2), 3.94 (s, 6H, 2 CH_3O), 3.86 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.68 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.39 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.20 (s, 3H, NCH_3), 1.69 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2). ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 160.4 (C-8), 153.1 (C-4), 141.8 (C-3a), 140.0 (C-5a), 132.7 (C-6), 131.9 (C-3'), 130.8 (C-2'), 129.9 (C-5'), 129.7 (C-4'), 129.2 (C-1'), 128.6 (C-6'), 126.6 (C-9a), 115.5 (C-7), 115.4 (C-1), 114.2 (C-2), 109.5 (C-3), 98.8 (C-9), 57.5 (NCH_2), 57.1 (OCH_3), 55.2 (NCH_2), 49.3 (NCH_2), 43.6 (NCH_3), 28.6 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_2$: 718.387, Found: 718.433.

Bis[N-[3-(8-methoxypyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-amino-propyl]piperazine (1p)

Yellow oil, Yield: 75%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 7.97 (d, 2H, $J=9.00$ Hz, 2H-6), 7.93 (dd, 2H, $J=1.50$ and 1.50 Hz, 2H-2'), 7.88 (dd, 2H, $J=2.70$ and 1.20 Hz, 2H-1), 7.88–7.84 (m, 2H, 2H-4'), 7.50–7.46 (m, 4H, 2H-5' and 2H-5''), 7.28 (d, 2H, $J=2.70$ Hz, 2H-9), 7.06 (dd, 2H, $J=9.00$ and 2.70 Hz, 2H-7), 6.96 (dd, 2H, $J=4.00$ and 1.20 Hz, 2H-3), 6.88 (dd, 2H, $J=4.00$ and 2.70 Hz, 2H-2), 3.96 (s, 6H, 2 CH_3O), 3.90 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.69 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.53–2.34 (m, 8H, 4 NCH_2 pip.), 2.33 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.20 (bs, 2H, 2 NH), 1.68 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2). ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 160.5 (C-8), 153.2 (C-4), 142.0 (C-3a), 140.0 (C-5a), 132.7 (C-6), 132.0 (C-3'), 130.7 (C-2'), 130.0 (C-5'), 129.6 (C-4'), 129.2 (C-1'), 128.6 (C-6'), 126.7 (C-9a), 115.5 (C-7), 115.4 (C-1), 114.2 (C-2), 109.5 (C-3), 98.9 (C-9), 58.4 (NCH_2), 57.2 (OCH_3), 55.2 (NCH_2), 54.6 (NCH_2), 49.5 (NCH_2), 28.1 (CH_2). MALDI-TOF MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{N}_8\text{O}_2$: 773.429, Found: 773.464.

Bis[N-[4-(indolo[1,2-a]quinoxalin-6-yl)benzyl]-3-aminopropyl]piperazine (1q)

Yellow oil, Yield: 86%; ^1H NMR δ (300 MHz, CDCl_3) 8.55 (dd, 2H, $J=8.10$ and 1.20 Hz, 2H-11), 8.51 (dd, 2H, $J=8.70$ and 0.90 Hz, 2H-1), 8.09 (dd, 2H, $J=8.00$ and 1.65 Hz, 2H-4), 8.00 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2H-2' and 2H-6'), 7.95 (d, 2H, $J=7.80$ Hz, 2H-8), 7.67–7.60 (m, 4H, 2H-2 and 2H-3), 7.53 (d, 4H, $J=8.40$ Hz, 2H-3' and 2H-5'), 7.48–7.43 (m, 4H, 2H-9 and 2H-10), 7.27 (s, 2H, 2H-7), 3.92 (s, 4H, 2 NCH_2), 2.75 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 2.63–2.41 (m, 8H, 4 NCH_2 pip.), 2.46 (t, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 NCH_2), 1.96 (bs, 2H, 2 NH), 1.77 (qt, 4H, $J=6.90$ Hz, 2 CH_2). ^{13}C NMR δ (100 MHz, CDCl_3) 157.3 (C-6), 142.8 (C-6a), 138.6 (C-11a), 137.7 (C-4a), 134.4 (C-4'), 131.9 (C-3), 131.6 (C-1'), 130.5 (C-8a), 130.2 (C-2' and C-6'), 129.9 (C-3' and C-5'), 129.7 (C-2), 125.8 (C-4), 125.6 (C-1), 124.1 (C-9), 124.0 (C-10), 116.0 (C-8 and C-11), 103.8 (C-7), 58.5 (NCH_2), 54.6

(NCH₂), 49.5 (NCH₂), 27.6 (CH₂). MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₅₄H₅₃N₈: 813.439, Found: 813.432.

Bis[N-[(4-phenylpyrrolo[1,2-a]quinoxalin-2-yl)methyl]-3-aminopropyl]piperazine (1r)

Pale-yellow crystals, Yield: 70%, mp =62–64 °C; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 8.04 (dd, 2H, *J*=7.80 and 1.50 Hz, 2 H-6), 8.03–7.97 (m, 4H, 2 2 H-2' and 2 H-6'), 7.98 (d, 2H, *J*=1.10 Hz, 2 H-1), 7.85 (dd, 2H, *J*=7.80 and 1.50 Hz, 2 H-9), 7.57–7.53 (m, 8H, 2 H-3', 2 H-4', 2 H-5' and 2 H-7), 7.47 (ddd, 2H, *J*=7.80, 7.80, 1.50 Hz, 2 H-8), 6.94 (d, 2H, *J*=1.10 Hz, 2 H-3), 3.95 (s, 4H, 2 NCH₂), 2.75 (t, 4H, *J*=6.90 Hz, 2 NCH₂), 2.61–2.35 (m, 8H, 4 NCH₂ pip.), 2.40 (t, 4H, *J*=6.90 Hz, 2 NCH₂), 1.93 (bs, 2H, 2 NH), 1.72 (qt, 4H, *J*=6.90 Hz, 2 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 155.2 (C-4), 139.5 (C-3a), 137.5 (C-5a), 131.6 (C-7), 131.4 (C-8), 130.1 (C-3' and C-5'), 130.0 (C-2' and C-6'), 129.2 (C-6), 128.0 (C-1'), 127.0 (C-9a), 126.7 (C-4'), 115.3 (C-9), 114.2 (C-2), 109.9 (C-1), 109.8 (C-3), 58.2 (NCH₂), 54.3 (NCH₂), 54.1 (NCH₂), 49.3 (NCH₂), 46.4 (NCH₂), 24.8 (CH₂). MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₄₆H₄₉N₈: 713.408, Found: 713.412.

Tris[N-4-[(7-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]amine (1s)

Yellow oil, Yield: 94%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 7.94 (d, 6H, *J*=8.40 Hz, 3 H-2' and 3 H-6'), 7.87 (dd, 3H, *J*=2.70 and 1.35 Hz, 3 H-1), 7.74 (d, 3H, *J*=9.00 Hz, 3 H-9), 7.48 (d, 6H, *J*=8.40 Hz, 3 H-3' and 3 H-5'), 7.47 (d, 3H, *J*=2.70 Hz, 3 H-6), 7.09 (dd, 3H, *J*=9.00 and 2.70 Hz, 3 H-8), 6.93 (dd, 3H, *J*=4.05 and 1.35 Hz, 3 H-3), 6.81 (dd, 3H, *J*=4.05 and 2.70 Hz, 3 H-2), 3.90 (s, 9H, 3 CH₃O), 3.88 (s, 6H, 3 NCH₂), 2.70 (t, 6H, *J*=6.90 Hz, 3 CH₂), 2.52 (t, 6H, *J*=6.90 Hz, 3 CH₂), 1.71 (qt, 6H, *J*=6.90 Hz, 6 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 158.5 (C-7), 155.8 (C-4), 143.1 (C-5a), 138.76 (C-3a and C-4'), 130.1 (C-2' and C-6'), 129.8 (C-3' and C-5'), 126.4 (C-1'), 122.8 (C-9a), 117.9 (C-9), 115.9 (C-8), 115.6 (C-1), 115.0 (C-2), 112.6 (C-3), 109.7 (C-6), 57.1 (OCH₃), 55.1 (NCH₂), 53.7 (NCH₂), 49.2 (NCH₂), 28.4 (CH₂). MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₆₆H₆₇N₁₀O₃: 1047.540, Found: 1047.613.

Tris[N-3-[(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]amine (1t)

Orange oil, Yield: 79%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 7.94 (d, 3H, *J*=9.00 Hz, 3 H-6), 7.89 (dd, 3H, *J*=1.50 and 1.50 Hz, 3 H-2'), 7.86–7.80 (m, 6H, 3 H-4' and 3 H-1), 7.45–7.42 (m, 6H, 3 H-6' and 3 H-5'), 7.23 (d, 3H, *J*=2.70 Hz, 3 H-9), 7.03 (dd, 3H, *J*=9.00 and 2.70 Hz, 3 H-7), 6.93 (dd, 3H, *J*=3.90 and 1.20 Hz, 3 H-3), 6.85 (dd, 3H, *J*=3.90 and 2.70 Hz, 3 H-2), 3.96 (s, 9H, 3 CH₃O), 3.83 (s, 6H, 3 NCH₂), 2.65 (t, 6H, *J*=6.90 Hz, 3 NCH₂), 2.47 (t, 6H, *J*=6.90 Hz, 3 NCH₂), 1.63 (qt, 6H, *J*=6.90 Hz, 3 CH₂). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 160.4 (C-8), 153.1 (C-4), 141.9 (C-3a), 140.0 (C-5a), 132.7 (C-6), 132.0 (C-3'), 130.8 (C-2'), 129.9 (C-5'), 129.7 (C-4'), 129.2 (C-1'), 128.6 (C-6'), 126.6 (C-9a), 115.4 (C-7), 115.3 (C-1), 114.1 (C-2), 109.5 (C-3), 98.7 (C-9), 57.1 (OCH₃), 55.3 (NCH₂), 53.7 (NCH₂), 49.3 (NCH₂), 28.4 (CH₂). MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₆₆H₆₇N₁₀O₃: 1047.540, Found: 1047.598.

N,N'-[oxybis(2,1-ethanedioxy-2,1-ethanedioyl)]bis-3-[(8-methoxypyrrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)benzylamine (1u)

Yellow oil, Yield: 92%; ¹H NMR δ (300 MHz, CDCl₃) 7.95 (d, 3H, *J*=9.00 Hz, 2 H-6), 7.93 (dd, 3H, *J*=1.50 and 1.50 Hz, 2 H-2'), 7.88–7.83 (m, 4H, 2 H-4' and 2 H-1), 7.50–7.45 (m, 4H, 2 H-6' and

2 H-5'), 7.26 (d, 2H, *J*=2.70 Hz, 2 H-9), 7.05 (dd, 2H, *J*=9.00 and 2.70 Hz, 2 H-7), 6.95 (dd, 2H, *J*=3.90 and 1.20 Hz, 2 H-3), 6.87 (dd, 2H, *J*=3.90 and 2.70 Hz, 2 H-2), 3.95 (s, 6H, 2 CH₃O), 3.91 (s, 4H, 2 NCH₂), 3.64–3.58 (m, 12H, 6 OCH₂), 2.83 (t, 4H, *J*=5.40 Hz, 2 NCH₂), 2.18 (bs, 2H, 2 NH). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 160.5 (C-8), 153.1 (C-4), 141.3 (C-3a), 140.0 (C-5a), 132.7 (C-6), 132.0 (C-3'), 131.0 (C-2'), 129.9 (C-5' and C-4'), 129.2 (C-1'), 128.7 (C-6'), 126.7 (C-9a), 115.4 (C-7), 115.3 (C-1), 114.2 (C-2), 109.6 (C-3), 98.9 (C-9), 71.8 (OCH₂), 71.6 (OCH₂), 71.5 (OCH₂), 56.7 (OCH₃), 54.8 (NCH₂), 49.8 (NCH₂). MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd for C₄₆H₄₉N₆O₅: 765.376, Found: 765.457.

In vitro antiplasmodial activity

The *in vitro* antiplasmodial activities were tested over concentrations ranging from 39 nM to 40 μM against culture-adapted *Plasmodium falciparum* reference strains 3D7 and W2. The former strain is susceptible to chloroquine (CQ) but displays a decreased susceptibility to mefloquine (MQ) while the latter is considered as resistant to chloroquine. The parasites were cultivated in RPMI medium (Sigma-Aldrich, Lyon, France) supplemented with 0.5% Albumax I (Life Technologies corporation, Paisley, United Kingdom), hypoxanthine (Sigma-Aldrich), gentamicin (Sigma-Aldrich), and human erythrocytes and were incubated at 37 °C in a candle jar, as described previously³⁷. The *P. falciparum* drug susceptibility test was carried out in 96-well flat bottom sterile plates under a final volume of 250 μL. After a 48 h incubation with the drugs, quantities of DNA in treated and control cultures of parasites in human erythrocytes were compared according to the SYBR Green I (Sigma-Aldrich) fluorescence-based method^{38,39}. Briefly, after incubation, plates were frozen at -20 °C until use. They were then left to thaw for 2 h at room temperature and 100 μL of the homogenized culture were transferred to 96-well flat bottom sterile black plates (Nunc Inc) already containing 100 μL of the SYBR Green I lysis buffer (2xSYBR Green, 20 mM Tris base pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.008% w/v saponin, 0.08% w/v Triton X-100). A negative control, controls treated by solvents (DMSO and H₂O, typically) and positive controls (chloroquine and mefloquine) were added to each set of experiments. Plates were incubated for 1 h at room temperature and then read on a fluorescence plate reader (Tecan, Austria) using excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively. Concentrations inhibiting 50% of the parasite's growth (half maximal inhibitory concentration or IC₅₀ values) were then calculated from the obtained experimental results using a regression program available on line⁴⁰.

In vitro antileishmanial activity

L. donovani (MHOM/IN/00/DEVI) used in this study was provided by the CNR *Leishmania* (Montpellier, France). The effects of the tested compounds on the growth of *L. donovani* (MHOM/IN/00/DEVI) promastigotes were assessed by MTT assay⁴¹. Briefly, promastigotes in log-phase in Schneider's medium supplemented with 20% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin), were incubated at an average density of 10⁶ parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls treated by DMSO and pentamidine or amphotericin B (reference drugs purchased from Sigma-Aldrich) were added to each set of experiments. After a 72 h incubation period at 27 °C, parasite metabolic activity was determined. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation.

20 μL of MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (5 mg/mL) were added to each well followed by incubation for another 4 h. The enzyme reaction was then stopped by addition of 100 μL of 50% isopropanol – 10% sodium dodecyl sulfate⁴². Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 10 minutes and the absorbance measured in a plate reader at 570 nm in a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. Inhibitory concentration 50% (IC_{50}) was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. donovani* promastigotes compared to the control. IC_{50} were calculated by non-linear regression analysis processed on dose-response curves, using TableCurve 2D V5.0 software. IC_{50} values represent the mean value calculated from three independent experiments.

Cytotoxicity evaluation

A cytotoxicity evaluation was realized according to the method of Mosmann⁴¹ with slight modifications to determine the cytotoxic concentrations 50% (CC_{50}) and using doxorubicin as a cytotoxic reference-compound. These assays were performed toward the human HepG2 cell line (HepG2 CC_{50}). HepG2 (hepatocarcinoma cell line purchased from ATCC, ref HB-8065) is a commonly used human-derived hepatocarcinoma cell line that has shown characteristics similar to those of primary hepatocytes. These cells express many of the hepatocyte-specific metabolic enzymes, thus enabling the cytotoxicity of tested product metabolites to be evaluated. Briefly, cells in 100 μL of complete RPMI medium, [RPMI supplemented with 10% FCS, 1% L-glutamine (200 mM) and penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 μg /mL)] were inoculated into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C in a humidified 6% CO_2 . After 24 h incubation, 100 μL of medium with various product concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Duplicate assays were performed for each sample. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 μL of MTT solution (0.5 mg/mL in medium without FCS) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μL) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 minutes. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength spectrophotometer using a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. DMSO was used as blank and doxorubicin (Sigma Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as percentage of control (cells incubated without compound). The 50% cytotoxic concentration was determined from the dose-response curve by using the TableCurve 2D V5.0 software (Systat Software, San Jose, CA).

FRET melting experiments

FRET melting experiments were performed with dual-labeled oligonucleotides mimicking the *Plasmodium* telomeric sequences FPF1T [FAM-^{5'}(GGGTTTA)₃-GGG^{3'}-TAMRA] and FPF8T [FAM-^{5'}(GGGTTC A)₃-GGG^{3'}-TAMRA] and the human telomeric sequence F21T [FAM-(GGGTTA)₃-GGG^{3'}-TAMRA]^{36,43}. The oligonucleotides were prefolded in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2), with 10 mM KCl and 90 mM LiCl (K^+ condition). The FAM emissions were recorded at 516 nm using a 492-nm excitation wavelength in the absence and presence of a single compound as a function of temperature (25 to 95 °C) in 96-well microplates by using a Stratagene MX3000P real-time PCR device at a rate of

1 °C.min⁻¹. The data obtained were normalized between 0 and 1, and the temperature required for half-denaturation of oligonucleotides corresponded to the emission value of 0.5 was calculated as ΔT_m . Each experiment was performed in duplicate with 200 nM of labeled oligonucleotide and 0, 1, 2, or 5 μM of compound under K^+ condition. For each compound, two independent experiments were carried out. The data were plotted using OriginPro 9.1 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

Results and discussion

Chemistry

The reported bis[*N*-[(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]amine or piperazine derivatives **1a–p** were synthesized in seven steps from 2-nitroaniline (Scheme 1). Preparation of 1-(2-nitrophenyl)pyrroles **3a–d** was performed according to the Clauson-Kaas reaction run under micro-wave irradiation starting from 2-nitroaniline and 2,5-dimethoxytetrahydrofuran in acetic acid. This pathway partially involved synthetic methodologies already described by our group^{20–23,27}. The resulting 1-(2-nitrophenyl)pyrrole intermediates **3a–d** was subsequently reduced into the attempted 1-(2-aminophenyl)pyrroles **4a–d** using a sodium borohydride-copper (II) sulfate in ethanol at room temperature. This $\text{NaBH}_4\text{-CuSO}_4$ system was found to be quite powerful in reducing our aromatic nitro group with excellent yield (73–85%). The reaction of **4a–d** with triphosgene in toluene gave the lactams **5a–d**²². Reduction of the nitro moiety of **6a–b** with iron in hot glacial acetic acid produced the spontaneous ring closure onto the ester to afford the desired the lactams **5e–f** through a one-pot reduction-cyclization step^{27,25}.

The lactams **5a–f** were subsequently chlorodehydroxylated with phosphorous oxychloride, leading to the 4-chloropyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **7a–f**.

Coupling chloro derivatives **7a–f** with 3- or 4-formylphenylboronic acid in the presence of $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ as a catalyst under Suzuki-Miyaura cross-coupling conditions proceeded to afford the substituted benzaldehydes **8a–h**^{22,27,28,30}. Reaction of primary amines, such as 3,3'-diamino-*N*-methyldipropylamine or *N*-(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine or 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine, with the latter **7a–f** gave the di-imines **9a–p**, reduced into the bis[*N*-[(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]amines **1a–p** using sodium borohydride in methanol. The same pathway was used for the synthesis of bisindoloquinoxaline **1q** and bis(4-phenyl)pyrroloquinoxaline **1r** from aldehydes **8i** and **8j**, respectively (Schemes 2 and 3).

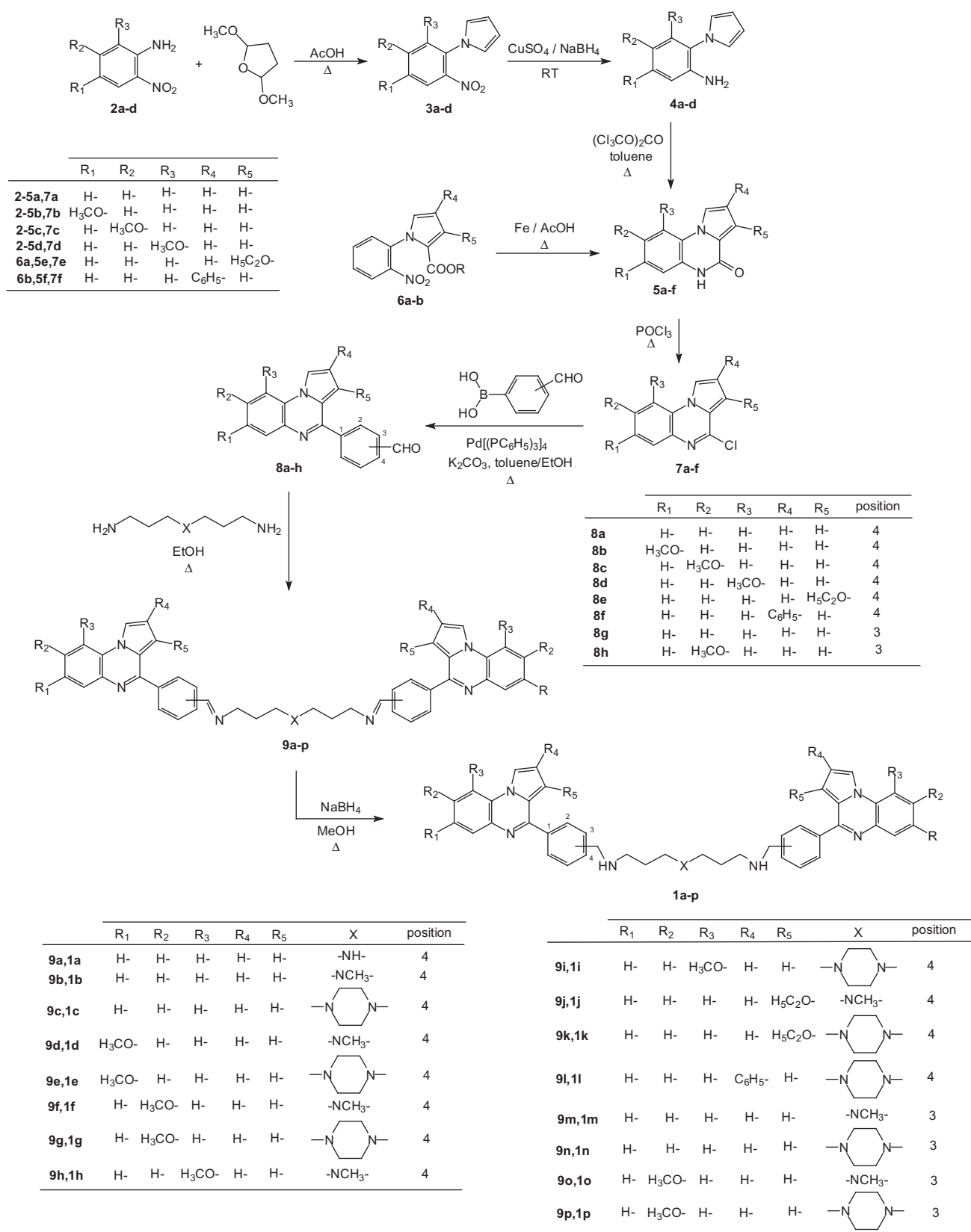
This strategy was also used to prepare the tris[*N*-[(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]amines **1s–t** (Scheme 4) and *N,N'*-[oxybis(2,1-ethanedioxy-2,1-ethanedioyl)]bis-(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzylamine **1u** (Scheme 5).

All these quinoxaline compounds **1a–u** were then converted into their ammonium oxalate salts by treatment with oxalic acid in refluxing isopropanol (Table 1).

Biological activity

In vitro antimalarial activity

All new substituted bis- and trispyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives **1a–u** were evaluated for their antimalarial activity *in vitro* on *P. falciparum* CQ-resistant strain W2 (IC_{50} CQ = 0.20 μM) and the CQ-sensitive and MQ decrease susceptibility strain 3D7 (IC_{50} CQ = 0.08 μM). As shown in Table 2, they were found to have IC_{50}

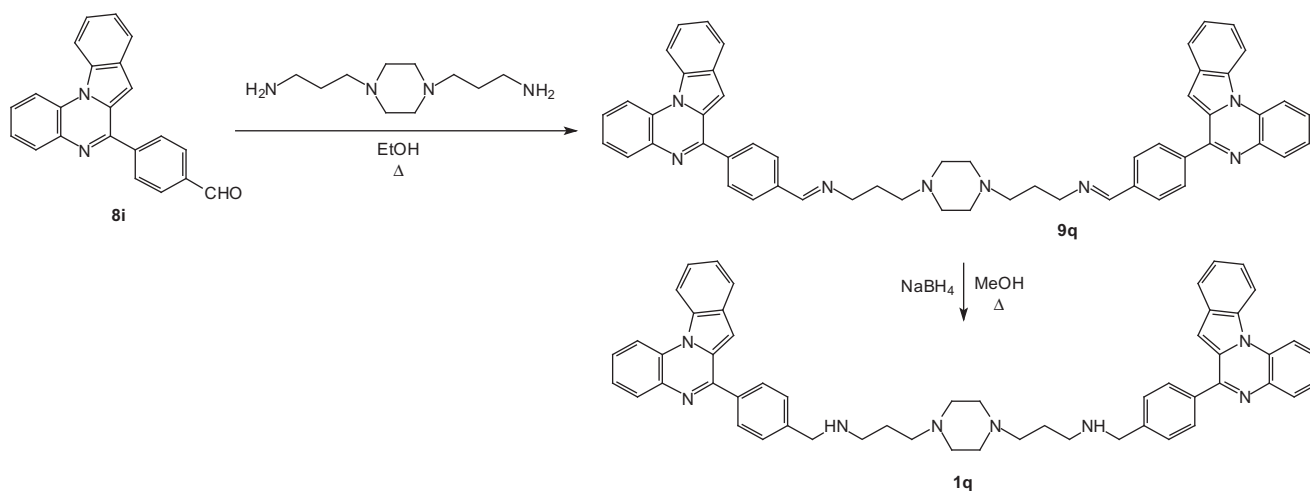
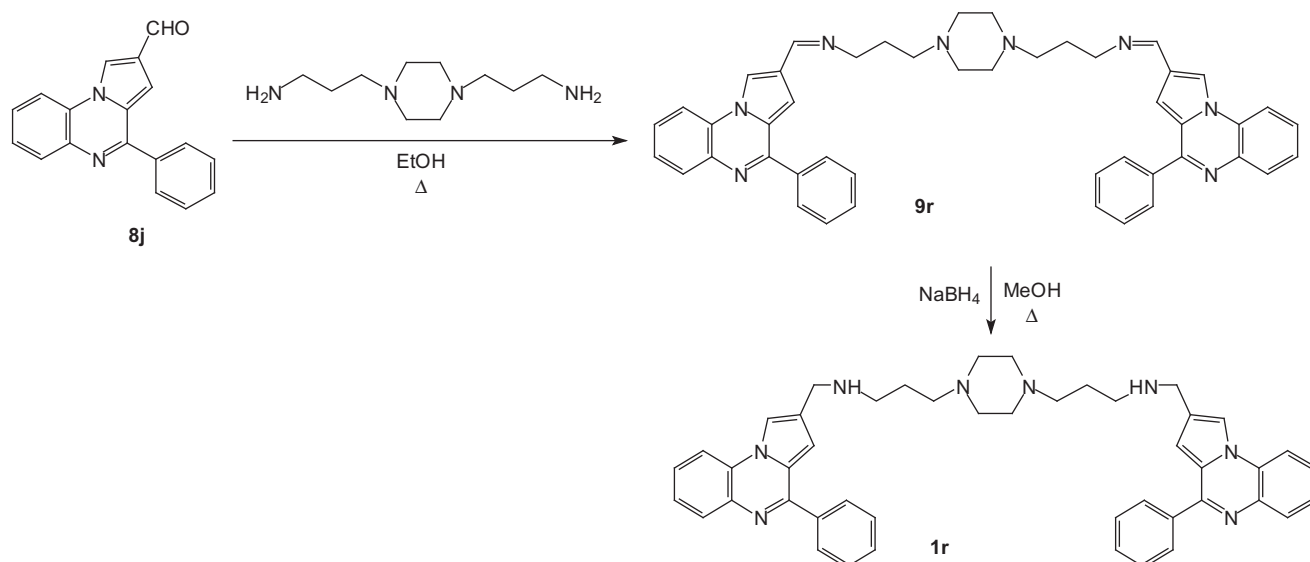


Scheme 1. Synthesis of bispyrrolo[1,2-a]quinoxalines **1a-p**.

between 0.05–4.20 μ M on W2, and 0.04–8.96 μ M on 3D7 *P. falciparum* strains, respectively.

For the pyrroloquinoxalines unsubstituted on their heterocyclic moiety (compounds **1a-c**), compound **1a** joined by a

bis-(3-aminopropyl)amine linker was found more active (up to 4 to 5 times) on the W2 strain than its counterparts with bis-(3-aminopropyl)methylamine (compounds **1b**) or bis-(3-aminopropyl)piperazine linkages (compounds **1c**): i.e. IC₅₀ = 0.85 μ M for **1a** versus 4.20

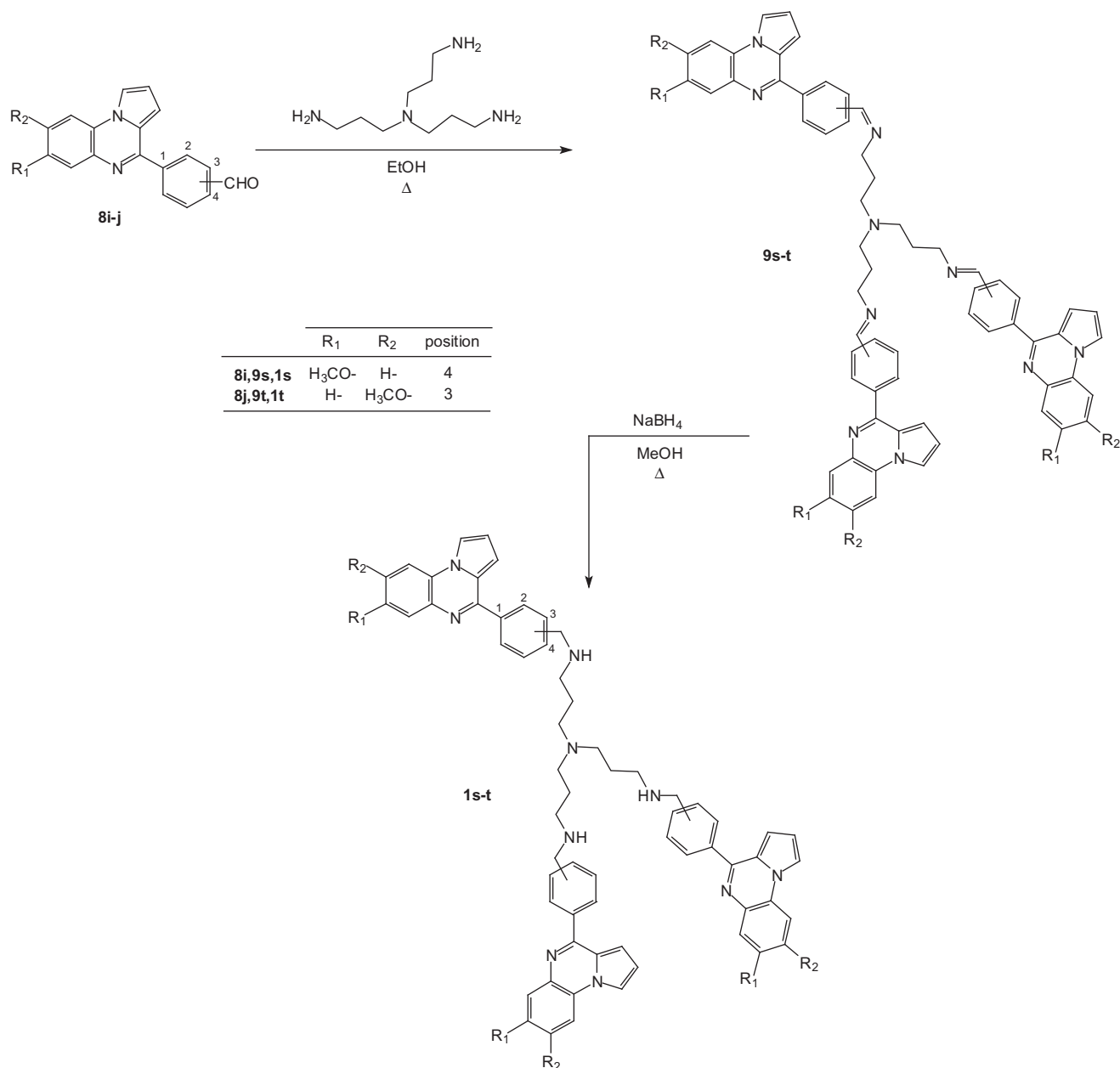
Scheme 2. Synthesis of bisindolo[1,2-*a*]quinoxaline **1q**.Scheme 3. Synthesis of bispyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline **1r**.

and 3.40 μM for **1b** and **1c**, respectively. As a general rule against the W2 strain, the introduction of a methoxy substituent in position 7, 8 or 9 of the bis-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline skeleton linked in position 4 of the benzyl ring (compounds **1d-i**) strongly increased the antiparasitic activity in comparison with their respective unsubstituted bispyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline homologs **1b-c**: i.e. IC_{50} = 0.13–0.44 μM for **1d-i** and 3.40–4.20 μM for **1b-c**. Moreover, introduction of an ethoxy substituent in position C-3 of the pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline moieties joined by a bis-(3-aminopropyl) piperazine linker (compound **1k**) was found more active (up to 38 times) than its non-substituted homolog **1c** (IC_{50} = 0.09 μM for **1k** in comparison of 3.40 μM for **1c**). In addition, **1k** was found to be 2.2 times more active than the reference drug CQ (IC_{50} = 0.20 μM). In contrast, the addition of a phenyl in position 2 of the pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline moiety (compound **1l**) reduced considerably the antimalarial activity on the W2 strain (IC_{50} = 1.39 μM).

The bis-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1m-n**, which are linked with polyaminoalkyl chains on position 3 of the benzyl moieties, increased the antimalarial activity up to 35 and 68 times when compared to their non-substituted counterparts linked in position

4 (compounds **1b-c**). Thus, compound **1n** bearing a diaminopropylpiperazine linker exhibited the most potent antiparasitological activity (IC_{50} = 0.05 μM) against the CQ-resistant strain (W2). Nevertheless, in these subseries in which the polyaminoalkyl side chain was anchored in position 3 of the benzyl ring, the introduction of a methoxy substituent on the pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline heterocycles (compounds **1o-p**) seemed to be less detrimental against drug-resistant strain W2 in comparison with their analogs **1d-i**. The bis-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline **1r**, structural isomer of derivative **1c**, was also found to have a significant activity against the W2 strain (IC_{50} = 0.75 μM). In addition, the tris[*N*-[(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]amines **1s-t** showed similar antimalarial activities when compared with their bis-homologs **1d-i** (IC_{50} = 0.19–0.29 μM for **1s-t** versus 0.13–0.44 μM for **1d-i**). Moreover, the replacement of the polyaminoalkyl linker by a 1,11-diamino-3,6,9-trioxundecane chain (compound **1u**) showed the same level of antimalarial activity against the W2 strain with IC_{50} = 0.25 μM .

Against the CQ-sensitive strain (3D7) and in the subseries of the pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines unsubstituted on their heterocyclic moieties (compounds **1a-c**), compound **1c** joined by a



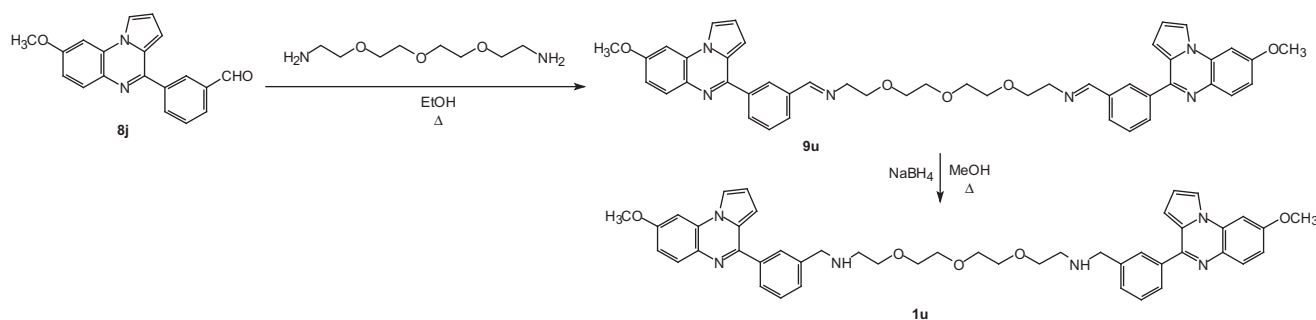
Scheme 4. Synthesis of trispyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1s-t**.

bis-(3-aminopropyl)piperazine linker was found more active than its structural analogs with bis-(3-aminopropyl)amine (compound **1a**) or bis-(3-aminopropyl)methylamine linkages (compound **1b**): i.e. $IC_{50}=0.80\ \mu\text{M}$ for **1c** versus 3.42 and $1.20\ \mu\text{M}$ for **1a** and **1b**, respectively. Surprisingly, most of the pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1d-g** and **1i** bearing a methoxy substituent on the heterocyclic skeleton exhibited moderate antimalarial activity against 3D7 strain with IC_{50} ranging from 1.28 to $5.85\ \mu\text{M}$, in the exception of compound **1h** which showed an interesting IC_{50} of $0.25\ \mu\text{M}$ against this *Plasmodium* strain. As against the W2 strain, replacement of the methoxy function by an ethoxy one in position 3 of the pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline moieties (compounds **1j-k**) increased the anti *P. falciparum* activity against the 3D7 strain ($IC_{50}=0.26$ and $0.19\ \mu\text{M}$ for **1j** and **1k**, respectively). The introduction of a phenyl ring in position 2 of the pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline moiety (compound **1l**) reduced considerably the antimalarial activity on the 3D7 strain ($IC_{50}=8.96\ \mu\text{M}$). Similar observations could be made with the structural analogs **1q-r** which showed moderate activity

against 3D7 strain ($IC_{50}=1.00\text{--}7.22\ \mu\text{M}$). In the subseries in which the polyaminoalkyl side chain was anchored in position 3 of the benzyl ring, the piperazine substituted bis-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline **1p** was found to be two times more active than the reference drugs chloroquine and mefloquine ($IC_{50}=0.040\ \mu\text{M}$ for **1p** versus $IC_{50}=0.080\ \mu\text{M}$ for the references). The tris-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1s-t** showed similar antimalarial activities when compared with their methoxy substituted bis-homologs **1o-p** ($IC_{50}=0.20\text{--}0.24\ \mu\text{M}$ for **1s-t** versus $0.04\text{--}0.18\ \mu\text{M}$ for **1o-p**). Compound **1u** bearing diaminotrixaundecane linkage exhibited similar activity against the 3D7 strain than those observed for chloroquine and mefloquine ($IC_{50}=0.08\ \mu\text{M}$).

In vitro antileishmanial activity against promastigote forms

In order to increase the biological profile of molecules **1a-u**, complementary analyses were performed. Notably, *P. falciparum* belonging to coccidian protozoan parasites, their *in vitro* biological



Scheme 5. Synthesis of bispyrrolo[1,2-a]quinoxaline **1u**.

activity on flagellate protozoan parasites like *Leishmania donovani* was evaluated (Table 2). In comparison with amphotericin B and pentamidine used as reference drugs (IC_{50} = 0.1 μ M and 5.5 μ M, respectively), most of the tested compounds **1** were found active against the promastigote forms of *L. donovani*. It must be noticed that a majority of these bis-pyrrolo[1,2-a]quinoxaline derivatives **1** (compounds **1a**, **1c**, **1d–j** and **1m–q**) with IC_{50} ranging from 1.0 to 4.26 μ M were found slightly more potent than pentamidine, one of the reference compounds (IC_{50} = 5.5 μ M). In particular, bis[*N*-(4-(indolo[1,2-a]quinoxalin-6-yl)benzyl)-3-aminopropyl]piperazine **1q** was found to be 9.65 times more active than pentamidine (IC_{50} = 0.57 μ M versus IC_{50} = 5.5 μ M). In our previously described antileishmanial series^{21,22}, we have noticed that introduction of a methoxy group in positions 7 and 8 of the pyrrolo[1,2-a]quinoxaline moiety generally increased the antileishmanial activity. In this new series, we also decided to introduce a methoxy or an ethoxy to evaluate the influence of such groups for their *in vitro* antileishmanial activity upon the *L. donovani* strain. Meanwhile, the presence of these alkoxy groups in the 7, 8, 9 or 3 position seems not to be detrimental for the activity against *L. donovani* as illustrated by results obtained for compounds **1d–k** and **1o–p** (IC_{50} = 1.07–4.26 μ M) in comparison with unsubstituted compounds **1a**, **1c** and **1m–n** (IC_{50} = 1.0–3.71 μ M). The same observation could be done for the nature of the polyalkylamine linker between the two benzylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline moieties that seemed also not to be crucial, with the exception of piperazine substituted **1g**, which showed a better antileishmanial activity *in vitro* compared to its structural methylamine analog **1f** (IC_{50} = 4.25 μ M versus 1.07 μ M for **1g**) upon the *L. donovani* strain.

Moreover, in the subseries in which the polyaminoalkyl side chain was anchored in position 3 of the benzyl ring, the various bis-pyrrolo[1,2-a]quinoxalines **1m–p** were found less beneficial for the *in vitro* antiparasitic activity with an IC_{50} of 2.80–3.71 μ M in comparison with their analogs **1a–c** and **1f–g**. In addition, the trisubstitution of the tris(3-aminopropyl)amine linker by the pyrrolo[1,2-a]quinoxaline core (compounds **1s–t**) led to a decrease in the antileishmanial activity (IC_{50} > 10 μ M) in comparison with their bis-pyrrolo[1,2-a]quinoxaline analogs **1d–e** and **1o–p**.

Cytotoxicity and selectivity index

In order to assess their selectivity of action, the cytotoxicity of the antimalarial compounds **1a–u** was also evaluated *in vitro* upon one human cell line. The cytotoxic concentrations 50% (CC_{50}) on the metabolizing human hepatocyte HepG2 cell line allowed access to the corresponding selectivity indexes (SI) defined as ratio of cytotoxic and antimalarial activities ($SI = CC_{50}/W2$ or 3D7 IC_{50}). The SI could validate their real potential as selective antiparasitic agents. The results concerning the cytotoxicity and SI data are presented in Table 2. As expected, most of the active bis- and

Table 1. Physical properties of the final amines **1a–t**.

Compound		Salt ^a	mp (°C) ^b	% Yield ^c
1a	Yellow crystals	3 (COOH) ₂	>260	83
1b	Yellow crystals	3 (COOH) ₂	245–248	79
1c	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	>260	85
1d	Yellow crystals	3 (COOH) ₂	224–226	81
1e	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	246–249	43
1f	Yellow crystals	3 (COOH) ₂	240–242	76
1g	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	236–239	70
1h	Pale-orange crystals	3 (COOH) ₂	160–162	73
1i	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	>260	75
1j	Yellow crystals	3 (COOH) ₂	192–195	88
1k	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	218–220	91
1l	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	239–243	56
1m	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	209–211	82
1n	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	220–223	68
1o	Yellow crystals	3 (COOH) ₂	188–191	81
1p	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	234–237	86
1q	Oranges crystals	4 (COOH) ₂	>260	65
1r	Pale-yellow crystals	4 (COOH) ₂	>260	88
1s	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	192–194	77
1t	Yellow crystals	4 (COOH) ₂	184–187	88
1u	Beige crystals	2 (COOH) ₂	141–144	76

^aThe stoichiometry and composition of the salts were determined by elemental analyses (within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values).

^bCrystallization solvent: 2-PrOH–H₂O.

^cThe yields only included the conversions into the ammonium oxalates.

trispyrrolo[1,2-a]quinoxalines **1** showed significant level of cytotoxicity against the HepG2 cell line (IC_{50} = 1.25–3.38 μ M). Considering the W2 *P. falciparum* strain, the selectivity indexes varied between 0.37 and 40.6, and SI ranged from 0.53 to 39.25 by taking into account the 3D7 strain. This SI led to the identification of compound **1n** with SI of 40.6 on W2 strain, and SI of 39.25 for derivative **1p** on 3D7 strain. We could notice that these last bioactive compounds **1n** and **1p** were bis-pyrrolo[1,2-a]quinoxalines linked by a 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine moiety in position 3 of their benzyl ring. On the other hand, the bis-pyrrolo[1,2-a]quinoxaline **1u** is also interesting with SI = 20.26, on the 3D7 malaria strain. However, according to the SI values, these compounds appeared to be toxic; thus, new modulations by replacing the benzyl substituted heterocyclic moiety to synthesize new candidates could be developed for forthcoming pharmacological investigations.

FRET-melting experiments

As these new compounds presented the same requirements as those required for G-4 stabilizing ligands, we have also investigated their ability of targeting *P. falciparum* telomeres as a potential strategy to interfere with human protozoan parasite infections. In fact, the telomeres of the parasite could constitute an attractive target. They are composed of repetitions of a degenerate motif (5'GGGTTYA^{3'}, where Y could be T or C), which is different from

Table 2. *In vitro* sensitivity of compounds **1a-u** on *P. falciparum* and *L. donovani* strains, and cytotoxicity on the HepG2 cell line.

	<i>P. falciparum</i> strains IC ₅₀ values (μM) ^a		<i>L. donovani</i> IC ₅₀ values (μM) ^b	Cytotoxicity CC ₅₀ values (μM) ^c HepG2	Selectivity Index ^d	
	W2	3D7			HepG2/W2	HepG2/3D7
Chloroquine ^e	0.20 ± 0.03	0.08 ± 0.003	n.d. ^g	30	150	300
Mefloquine ^e	0.032 ± 0.001	0.08 ± 0.008	n.d. ^g	n.d. ^g	n.d. ^g	n.d. ^g
Pentamidine ^f	n.d. ^g	n.d. ^g	5.5 ± 0.8	2.3 ± 0.5	n.d. ^g	n.d. ^g
Amphotericin B ^f	n.d. ^g	n.d. ^g	0.1 ± 0.04	8.8 ± 0.6	n.d. ^g	n.d. ^g
1a	0.85 ± 0.15	3.42 ± 0.54	1.0 ± 0.2	1.81 ± 0.10	2.13	0.53
1b	4.20 ± 0.65	1.20 ± 0.20	n.d. ^g	1.56 ± 0.60	0.37	1.30
1c	3.40 ± 0.74	0.80 ± 0.12	1.14 ± 0.2	1.25 ± 0.30	0.37	1.56
1d	0.34 ± 0.04	4.14 ± 0.03	3.89 ± 0.3	2.57 ± 0.7	7.56	0.62
1e	0.21 ± 0.03	2.62 ± 0.25	2.52 ± 0.1	1.46 ± 0.6	6.95	0.56
1f	0.13 ± 0.01	5.85 ± 0.07	4.25 ± 0.2	3.38 ± 0.9	26	0.58
1g	0.36 ± 0.04	2.22 ± 0.25	1.07 ± 0.1	2.14 ± 1.40	5.94	0.96
1h	0.44 ± 0.11	0.25 ± 0.04	2.07 ± 0.02	2.44 ± 0.4	5.54	9.76
1i	0.32 ± 0.04	1.28 ± 0.10	1.58 ± 0.1	1.33 ± 0.3	4.16	1.04
1j	0.49 ± 0.16	0.26 ± 0.03	4.26 ± 0.1	1.95 ± 0.3	3.98	7.50
1k	0.09 ± 0.01	0.19 ± 0.01	≥ 10 ^h	1.48 ± 0.5	16.44	7.79
1l	1.39 ± 0.13	8.96 ± 0.69	n.d. ^g	n.d. ^g	n.d. ^g	n.d. ^g
1m	0.12 ± 0.01	1.07 ± 0.16	2.80 ± 0.1	1.94 ± 1.0	16.17	1.81
1n	0.05 ± 0.01	0.37 ± 0.04	3.71 ± 0.4	2.03 ± 1.2	40.6	5.49
1o	0.206 ± 0.03	0.18 ± 0.02	3.51 ± 0.1	1.50 ± 0.9	7.28	8.33
1p	0.17 ± 0.03	0.04 ± 0.004	3.39 ± 0.4	1.57 ± 0.8	9.23	39.25
1q	n.d. ^g	1.00 ± 0.05	0.57 ± 0.1	1.56 ± 0.70	1.56	n.d. ^g
1r	0.75 ± 0.10	7.22 ± 0.77	n.d. ^g	n.d. ^g	n.d. ^g	n.d. ^g
1s	0.29 ± 0.05	0.20 ± 0.04	≥ 10 ^h	1.66 ± 0.5	5.72	8.30
1t	0.19 ± 0.02	0.24 ± 0.03	≥ 10 ^h	1.72 ± 0.6	9.05	7.17
1u	0.25 ± 0.08	0.076 ± 0.009	≥ 10 ^h	1.54 ± 0.7	6.16	20.26

^aIC₅₀ values were measured on the chloroquine-resistant and mefloquine-sensitive strain W2 and the chloroquine-sensitive and mefloquine-resistant strain 3D7.

^bIC₅₀ values were measured on the promastigotes of *Leishmania donovani* strain. The IC₅₀ (μM) values correspond to the mean ± standard deviation from three independent experiments.

^cCC₅₀ values were measured on the HepG2 cell line. The CC₅₀ (μM) values correspond to the mean ± standard deviation from three independent experiments.

^dSelectivity Index (SI) was defined as the ratio between the CC₅₀ value on the HepG2 cells and the IC₅₀ value against the *P. falciparum* W2 or 3D7 strain.

^eChloroquine and mefloquine were used as antiparasitic drug-compounds of reference.

^fPentamidine and Amphotericin B were used as antileishmanial drug-compounds of reference.

^gn.d.: not done.

^hNo activity noted at the higher concentration tested.

the human one (5'GGGTTA3'). This antimalarial approach based on targeting *P. falciparum* telomeres has been previously described by our team³⁶. Thus, in this report, we investigated the stabilization of *Plasmodium* telomeric G-quadruplexes by these new compounds through a FRET melting assay. For this evaluation, the two *Plasmodium* telomeric sequences (FPf1T and FPf8T) and the human one (F21T), in potassium, were used (two different *Plasmodium* telomeric repeats were used to fit the degenerate consensus). Thus, we used this FRET melting assay to study the interactions of some of our most bioactive compounds **1** and also the reference drugs (chloroquine – CQ and mefloquine – MQ) with these three telomeric sequences. For better visualization, a plot of ΔT_m values induced on FPf1T or FPf8T versus the ΔT_m induced on F21T is presented in Figure 2, allowing us to classify the more active compounds **1** in various subsets. Almost all the tested compounds displayed roughly the same stabilization profiles for the two *Plasmodium* telomeric sequences FPf1T and FPf8T and slightly better than that of the human one F21T, except **1s** and **1t** for FPf1T and **1o** and **1s** for FPf8T. The reference compounds CQ and MQ, never evaluated on these parasitic sequences before our work, showed very slight stabilization on these three telomeric sequences. These preliminary results mean that most of the tested bis-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1** have a moderate preference for *Plasmodium* over human telomeric quadruplexes, excepted bispyrroloquinoxaline **1o**. Surprisingly, the tris-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1s–t** were found more active on the human telomeric sequence F21T in comparison with their bis-analogues **1d–e** and **1o–p**. In contrast, the bis-[N-[4-(methoxypyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]piperazines **1e** and **1i** were found to be more active on the *Plasmodium* sequences with the higher ΔT_m.

These last data could be now considered as a promising starting point for the further development and optimization of new and potent antimalarial compounds as well as promising stabilizers for the telomeric *Plasmodium* DNA sequences. As very little is known about telomere regulation in *P. falciparum*, further studies should be now investigated both on parasitic and human sequences which presented different response or time-response to telomere perturbation.

Conclusion

In the present report, we have described the synthesis and the antimalarial activity of new bis- and trispyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives **1** in which aromatic nuclei are joined by various aliphatic polyamines linker. These new compounds were then tested for their *in vitro* antiparasitic activity on (i) two *P. falciparum* strains (the CQ-resistant W2 and CQ-sensitive 3D7); and (ii) the promastigote forms of *L. donovani* strain. Among these new synthesized molecules, few of them were identified as potential *in vitro* antiparasitic hits, displaying IC₅₀ ranging from 0.04 to 0.09 μM on the W2 and 3D7 strains of *P. falciparum*. Thus, the most promising antimalarial results were obtained for the two bis-pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1n** and **1p** linked by a 3-(aminopropyl)piperazine chain in position 3 of their benzyl moieties. These compounds **1n** and **1p** were identified as the most potent antimalarial candidates with selectivity index (SI) of 40.6 on W2 strain, and 39.25 on 3D7 strain, respectively. In addition, biological results showed activity against the promastigote forms of *L. donovani* with IC₅₀ ranging from 0.57 to 4.26 μM. In parallel, the *in vitro* cytotoxicity of these new

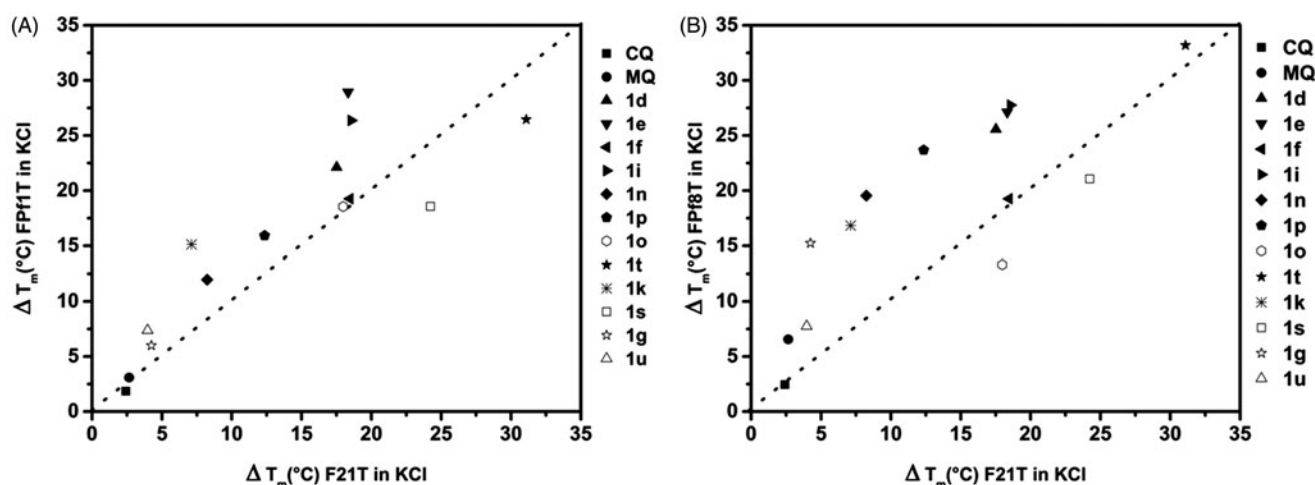


Figure 2. (A and B) Thermal stabilization (ΔT_m) induced by different compounds **1** (at 5 μ M) on the *Plasmodium* telomeric quadruplexes FPF1T and FPF8T versus ΔT_m induced on the human telomeric quadruplex F21T.

molecules was assessed on the human HepG2 cell line. Structure-activity relationships of these new synthetic compounds are here also discussed, as well as their relative ability of targeting *P. falciparum* telomeres as potential mechanism of action. Thus, as the telomeres of the parasite could constitute an interesting target, we have also established the possibility of targeting *Plasmodium* telomeres by stabilizing the *Plasmodium* telomeric G-quadruplexes through a FRET melting assay. These results led us to conclude that the two bis[*N*-[4-(methoxypyrrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]-3-aminopropyl]piperazines **1e** and **1i** seemed to be able to discriminate between *Plasmodium* and human telomeric quadruplexes. By taking into account the biological and biophysical results and also the structure-activity relationships of these new series and those previously described, our overall results could be now considered as a promising starting point for the further development and optimization of new and potent antiprotozoan compounds.

Acknowledgements

We thank the DGA and ANR (project ANR-12-ASTR-003) for the financial support of this study.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Aponte J, Aregawi M, Cibulskis R, et al. World malaria report. World Health Organization. Geneva: WHO Press; 2015.
- Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64:1–11.
- Klan SM, Waters AP. Malaria parasite transmission stages: an update. *Trends Parasitol* 2004;20:575–80.
- World Health Organization. 2010. Available from: <http://www.who.int/drugresistance/en/> [last accessed 10 Jun 2016].
- World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2015.
- Yeung S, Socheat D, Moorthy VS, Mills AJ. Artemisinin resistance on the Thai-Cambodian border. *Lancet* 2009;374:1418–19.
- Müller O, Sié A, Meissner P, et al. Artemisinin resistance on the Thai-Cambodian border. *Lancet* 2009;374:1419.
- Winzeler EA, Manary MJ. Drug resistance genomics of the antimalarial drug artemisinin. *Genome Biol* 2014;15:544.
- Fairhurst RM. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. *Curr Opin Infect Dis* 2015;28:417–25.
- Tilley L, Straimer J, Gnädig NF, et al. Artemisinin action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 2016;32:682–96.
- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2014;505:50–5.
- Biot C, Chibale K. Novel approaches to antimalarial drug discovery. *Infect Disord Drug Targets* 2006;6:173–204.
- De D, Krogstad FM, Cogswell FB, Krogstad DJ. Aminoquinolines that circumvent resistance in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:579–83.
- Ridley RG, Hfheinz W, Matile H, et al. 4-Aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1846–54.
- Deshpande S, Kupast B. 4-Aminoquinolines: an overview of antimalarial chemotherapy. *Med Chem* 2016;6:1–11.
- Kumar S, Singh RK, Patial B, et al. Recent advances in novel heterocyclic scaffolds for the treatment of drug-resistant malaria. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016;31:173–86.
- Manohar S, Tripathi M, Rawat DS. 4-aminoquinoline based molecular hybrids as antimalarials: an overview. *Curr Top Med Chem* 2014;14:1706–33.
- O'Neill PM, Ward SA, Berry NG, et al. A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem* 2006;6:479–507.
- Huang A, Ma C. Recent progress in biological activities and synthetic methodologies of pyrroloquinoxalines. *Mini Rev Med Chem* 2013;13:607–16.
- Guillon J, Grelhier P, Labaied M, et al. Synthesis, antimalarial activity, and molecular modeling of new pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, bispyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, bispyrido[3,2-*e*]pyrrolo[1,2-*a*]pyrazines, and bispyrrolo[1,2-*a*]thieno[3,2-*e*]pyrazines. *J Med Chem* 2004;47:1997–2009.

21. Guillon J, Forfar I, Mamani-Matsuda M, et al. Synthesis, analytical behaviour and biological evaluation of new 4-substituted pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines as antileishmanial agents. *Bioorg Med Chem* 2007;15:194–210.
22. Guillon J, Forfar I, Desplat V, et al. Synthesis of new 4-(*E*-alkenyl)pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines as antileishmanial agents by Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007;22:541–9.
23. Guillon J, Moreau S, Mouray E, et al. New ferrocenic pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives: synthesis, and *in vitro* antimalarial activity. *Bioorg Med Chem* 2008;16:9133–44.
24. Guillon J, Mouray E, Moreau S, et al. New ferrocenic pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives: synthesis, and *in vitro* antimalarial activity-Part II. *Eur J Med Chem* 2011;46:2310–26.
25. Ronga L, Del Favero M, Cohen A, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-alkapolyenylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines as antileishmanial agents-part III. *Eur J Med Chem* 2014;81:378–93.
26. Desplat V, Geneste A, Begorre M-A, et al. Synthesis of new pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives as potential inhibitors of Akt kinase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2008;23:648–58.
27. Desplat V, Moreau S, Gay A, et al. Synthesis and evaluation of the antiproliferative activity of novel pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives, potential inhibitors of Akt kinase. Part II. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2010;25:204–15.
28. Desplat V, Moreau S, Belisle-Fabre S, et al. Synthesis and evaluation of the antiproliferative activity of novel isoindolo[2,1-*a*]quinoxaline and indolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2011;26:657–67.
29. Guillon J, Le Borgne M, Rimbault C, et al. Synthesis and biological evaluation of novel substituted pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives as inhibitors of the human protein kinase CK2. *Eur J Med Chem* 2013;65:205–22.
30. Desplat V, Vincenzi M, Lucas R, et al. Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity of novel ethyl 4-[4-(4-substitutedpiperidin-1-yl)]benzyl-phenylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-carboxylate derivatives in myeloid and lymphoid leukemia cell lines. *Eur J Med Chem* 2016;113:214–27.
31. Alvar J, Vélez ID, Bern C, the WHO Leishmaniasis Control Team, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7:e35671.
32. WHO Technical report series n°975, Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis, 2012:116.
33. Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral Leishmaniasis Treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2012;2:11–19.
34. Bottius E, Bakhsis N, Scherf A. *Plasmodium falciparum* telomerase: de novo telomere addition to telomeric and nontelomeric sequences and role in chromosome healing. *Mol Cell Biol* 1998;18:919–25.
35. Raj DK, Das BR, Dash AP, Supakar PC. Identification of telomerase activity in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:685–8.
36. De Cian A, Grellier P, Mouray E, et al. *Plasmodium* telomeric sequences: structure, stability and quadruplex targeting by small compounds. *ChemBioChem* 2008;9:2730–9.
37. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;16:710–18.
38. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, et al. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1807–10.
39. Bacon DJ, Latour C, Lucas C, et al. Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1172–8.
40. Kaddouri H, Nakache S, Houzé S, et al. Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3343–9.
41. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
42. Emami SA, Zamanai Taghizadeh Rabe S, Ahi A, Mahmoudi M. Inhibitory activity of eleven Artemisia species from Iran against *Leishmania* major parasites. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15:807–11.
43. De Cian A, Guittat L, Kaiser M, et al. Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods* 2007;42:183–95.

Résumé

La résistance aux antibiotiques devient peu à peu un problème majeur de santé publique. La recherche de nouvelles stratégies pour contrer ce phénomène est donc extrêmement importante. Le Fe(III), qui possède un rôle prédominant dans de nombreuses réactions métaboliques, est un nutriment minéral essentiel à la survie des micro-organismes. Pour acquérir cet élément dans les milieux biologiques appauvris en Fe(III), les bactéries ont développé différentes méthodes. L'une de ces stratégies consiste en la synthèse de sidérophores, des molécules chélatrices du Fe(III) de faible poids moléculaire et reconnues spécifiquement par des récepteurs présents sur les membranes bactériennes. Dans la littérature, le développement d'antibiothérapie utilisant la voie des sidérophores *via* la méthode du « Cheval de Troie » fait l'objet d'une attention particulière. Cette stratégie consiste en la formation d'un conjugué sidérophore-antibiotique permettant la vectorisation de molécules antibactériennes. L'objectif principal de cette thèse est de synthétiser l'acide rhodotorulique (un sidérophore fongique reconnu par des bactéries à Gram négatif telles que *E. coli*) et des analogues 3,6-disubstitués par des fonctions chélatrices du fer. Pour ce faire, plusieurs voies de synthèses ont été développées : i) des voies reposant sur l'alkylation diastéréosélective de dioxopipérazines portant des copules chirales et ii) des voies de synthèse à partir d'acides aminés modifiés tels que l'acide glutamique ou l'ornithine. En parallèle, la synthèse d'analogues pipéraziniques, plus simples à obtenir, a également été étudiée afin de nous guider quant aux choix des fonctions chélatrices du fer. Des études de reconnaissance, par les bactéries, des analogues obtenus ont été réalisées et la mesure du pouvoir bactéricide de complexes au gallium a été déterminée. Par la suite, les analogues obtenus pourront être couplés à des antibiotiques afin de pouvoir les vectoriser et lutter contre les phénomènes de résistance.

Abstract

Antibiotic resistance is becoming a major health problem. The research of new antibiotic therapies is crucial to counter the bacterial resistance. Fe(III) plays a major role in many metabolic reactions. Thus, this element is an essential nutrient for the survival of micro-organisms. As biological environments are depleted in iron, bacteria have developed several methods to acquire Fe(III). One of these strategies is based on the synthesis of low molecular iron chelator, called siderophores and recognized by specific receptors found on the bacterial membranes. In the literature, the development of antibiotic therapies, using the siderophores way to vectorize antibacterial drugs, has received a particular attention. This strategy consists of the formation of a siderophore-antibiotic conjugate recognized and actively transported by bacteria. The main objective of this thesis is to synthesize rhodotorulic acid (a fungal siderophore recognized by several Gram negative bacteria such as *E. coli*) and analogues 3,6-disubstituted by different Fe(III) chelating functions. Different synthesis have been studied: i) ways based on the stéréosélective alkylation of dioxopipérazines carrying chiral inductors, ii) ways based on the coupling of modified amino acids such as ornithine or glutamic acid. Simultaneously, synthesis of piperazinic analogues, easier to obtain, has also been studied to help us in the choice of the chelating functions. "Siderophore like" tests have been realized for the analogues obtained and the measure of antibacterial properties of gallium complexes has been determined. Thereafter, analogues may be coupled to antibiotics in order to vectorize drugs and counter the bacterial resistance phenomena.