



Vectorisation de complexes d'iridium (III) par des analogues de sidérophores : une stratégie de cheval de Troie utilisant la lumière contre les bactéries pathogènes

Aline Faucon

► To cite this version:

Aline Faucon. Vectorisation de complexes d'iridium (III) par des analogues de sidérophores : une stratégie de cheval de Troie utilisant la lumière contre les bactéries pathogènes. Autre. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAF021 . tel-04535553

HAL Id: tel-04535553

<https://theses.hal.science/tel-04535553>

Submitted on 6 Apr 2024

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
UMR7242 – Biotechnologie et Signalisation Cellulaire

THÈSE présentée par :

[Aline FAUCON]

soutenue le : **22 mars 2023**

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

Discipline : Chimie

**Vectorisation de complexes d'iridium(III)
par des analogues de sidérophores :
une stratégie de cheval de Troie utilisant
la lumière contre les bactéries pathogènes**

THÈSE dirigée par :
M. MISLIN Gaëtan

Directeur de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
M. GASSER Gilles
M. SONNET Pascal

Professeur, Université Paris Sciences et Lettres
Professeur, Université de Picardie Jules Verne

EXAMINATEURS :
Mme DELANGLE Pascale
Mme SEEMANN Myriam

Directrice de recherche CEA, Université Grenoble Alpes
Directrice de recherche CNRS, Université de Strasbourg

MEMBRES INVITÉS :
M. GAILLARD Sylvain
M. PLÉSIAT Patrick

Maître de Conférences, Université de Caen Normandie
Professeur, Université de Bourgogne-Franche-Comté

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Gaëtan MISLIN, pour son encadrement, ses conseils et surtout son côté humain. Merci pour la confiance que tu as eue en moi et pour m'avoir encouragée à prendre mes propres initiatives. Je tiens à t'exprimer ma gratitude pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ces trois ans et demi de thèse. Tu as toujours été disponible quand j'en avais besoin.

Mes remerciements vont à l'Agence Nationale de la Recherche pour avoir financé cette thèse et au CNRS pour son support.

Je remercie Françoise, ma voisine de bureau et de labo. J'ai passé de très bons moments avec toi, à partager notre playlist au labo, mais aussi tous les potins qu'on s'est racontés, et merci pour tes réponses à mes questions quand j'avais des doutes pour les manip.

Un grand merci également à tous mes amis de l'équipe MMBCA. Sarah pour ta bienveillance, ta gentillesse et toutes les conversations à propos de tout et de rien quand on était les dernières dans le bureau le soir. Hélène pour ton humour, les aller-retours au RU tous les midis et pour m'avoir fait découvrir que oui, on peut rédiger sa thèse en écoutant du métal ! Virginie, ma voisine de bureau pour ces derniers mois de thèse, pour ta bonne humeur et ta motivation. Marion, Gwen, Thibaut, Quentin, Séb, Manon et Pauline pour les pauses du midi, les pauses cafés et thés et les soirées au bar.

Je remercie aussi mes autres collègues de l'équipe MMBCA pour la bonne ambiance dans l'équipe, même quand on ne parle pas le même langage scientifique : Valérie (sans qui je n'aurais pas adopté mon bébé chat, Artémis), Isabelle, Anne, Olivier, Coraline, Véro, Régine et Pierre.

Je remercie l'UMR 7242 BSC, particulièrement le Dr Jean-Luc GALZI, le Dr Guy ZUBER, Sylvie DOUESSIN et Claire GUTH, pour m'avoir accueillie dans l'unité et qui ont contribué à rendre mes années de thèse plus faciles.

Je remercie aussi les amis de l'étage avec qui j'ai passé de bonnes soirées au bar : Juliette, Masha, Alexis, Thomas (merci d'ailleurs pour ton investissement lorsque tu as encadré Julien pendant une semaine).

Merci aussi aux Dr Renaud WAGNER et Dr Myriam SEEMANN pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Je vous remercie pour les précieux conseils que vous m'avez apportés.

Je remercie également les stagiaires chimistes que j'ai pu encadrer de près ou de loin : Élise, Noémie, Élis, Angélique et Marina.

Un grand merci à l'équipe du PACSI (Faculté de Pharmacie) : les Dr Estefania OLIVA, Dr Cheng DENG et surtout Dr Delphine GARNIER, pour avoir analysé mes molécules.

Je tiens à remercier grandement les personnes avec qui j'ai collaboré sur ce projet :

- l'équipe du LCMT à Caen avec le Dr Sylvain GAILLARD et le Pr Jean-Luc RENAUD ; merci surtout à toi, Julien, pour les complexes d'iridium(III) que tu as synthétisés et tes réponses à mes questions de chimie organométallique ;
- l'équipe du CNR à Besançon avec le Pr Patrick PLÉSIAT ; je te remercie Julie, pour la rapidité avec laquelle tu as effectué les expériences de microbiologie, surtout quand j'avais besoin très vite des résultats lors de la rédaction ;
- le Dr Christophe GOURLAOUEN (LCQ, Strasbourg) pour les modélisations de mes molécules.

Je remercie de tout cœur ma famille, mes parents pour votre amour et votre soutien sans faille et pour m'avoir permis de faire des études longues. Merci aussi pour m'avoir aidée et avoir relu ma thèse en fin de rédaction. Mon frère, Marc, pour tes encouragements surtout lors des dernières semaines de rédaction.

Enfin, je remercie les membres du jury, le Pr Gilles GASSER, le Pr Pascal SONNET, le Dr Pascale DELANGLE et le Dr Myriam SEEMANN, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

*« Happiness can be found, even in the darkest of times
if one only remembers to turn on the light. »*

– J.K. Rowling, Harry Potter et le Prisonnier d'Azkaban

Abréviations

A	AB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	Ac	Acétyle
	AcOEt	Acétate d'éthyle
B	BCV	<i>Bis-Catechol Vector</i>
	Bn	Benzyle
C	Cbz	Carboxybenzyle
	CCM	Chromatographie sur Couche Mince
	CDI	1,1'-Carbonyldiimidazole
	CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
D	DAP	Acide diaminopropionique
	DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
	DCM	Dichlorométhane
	DEPTQ	<i>Distortionless Enhanced Polarization Transfer Quaternary</i>
	DFO	Desferrioxamine B
	DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
	DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
	DMAP	4-diméthylaminopyridine
	DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
	DMSO	Diméthylsulfoxyde
	dpa	Di(2-pyridyl)amine
	Dpaa	Dipyridylamine-acétamide
E	EDC.HCl	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide chlorhydrate
	EC	<i>Escherichia coli</i>
	Ent	Entérobactine
	EtOH	Éthanol
	Et ₂ O	Éther diéthylique
H	HBTU	Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium
	HOBt	Hydroxybenzotriazole
L	LC/MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> , chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
	LC/MS-BR	LC/MS Basse Résolution
M	MCV	<i>Mono-Catechol Vector</i>
	MeOH	Méthanol

N	MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
	MS-HR	<i>Mass Spectrometry</i> Haute Résolution
	NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
O	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	OMT	<i>Outer Membrane Transporter</i> , transporteur de membrane externe
	PACT	Chimiothérapie antimicrobienne photodynamique
	PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Pch	Pyochéline
	PDT	<i>Photodynamic therapy</i> , thérapie photodynamique
	PEG	Polyéthylène glycol
	piq	1-phénylisoquinoline
	PLA	Polylactide
	PMB	<i>para</i> -méthoxybenzyle
	Pvd	Pyoverdine
R	rdt	Rendement
S	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
	ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , espèces réactives de l'oxygène
	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
T	SEC	<i>Size Exclusion Chromatographie</i> , chromatographie d'exclusion
	TBAI	Tétrabutylammonium
	TCV	<i>Tris-Catechol Vector</i>
	TFA	Acide trifluoroacétique
	THF	Tétrahydrofurane
	TIPS	Triisopropylsilane
	TMSOK	Triméthylsilanolate de potassium

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PARTIE I – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
Chapitre I – La stratégie du cheval de Troie fondée sur les sidérophores.....	9
A. Généralités sur les bactéries	9
B. Un nutriment essentiel : le fer	10
C. Sidérophores et transport du fer	11
1. Sidérophores	11
2. Transport du fer par les sidérophores.....	13
D. Principe de la stratégie du cheval de Troie basée sur les sidérophores	14
E. Les sidéromycines naturelles	15
F. Les sidéromycines artificielles.....	18
1. Généralités.....	18
2. Sidéromycines artificielles ciblant le périplasme	20
3. Sidéromycines artificielles ciblant le cytoplasme.....	22
G. Vectorisation de complexes métalliques par des sidérophores.....	27
1. Conjugués entre la desferrioxamine et un complexe de Ru(II)	27
2. Conjugués entre un vecteur entérobactine et un complexe de Pt(IV).....	28
3. Conjugués sidérophore-Ru(IV)	29
Chapitre II – Thérapie photodynamique antibactérienne	33
A. Généralités	33
B. Photosensibilisateurs pour la PDT antibactérienne.....	35
PARTIE II – RÉSULTATS ET DISCUSSION	45
Chapitre I – Synthèse et propriétés des conjugués desferrioxamine-Ir(III)	47
A. Propriétés du sidérophore desferrioxamine 46 chez <i>P. aeruginosa</i>	47

B. Rétrosynthèse.....	50
C. Synthèse et propriétés des dérivés dpa et de leurs complexes d'Ir(III).....	53
1. Synthèse de la dpa 51	53
2. Synthèse de l'azoture 55	53
3. Synthèse des complexes d'Ir(III) des dérivés 55 et 57	54
4. Évaluation de l'activité antibactérienne des complexes d'Ir(III) non vectorisés	56
D. Synthèse des conjugués DFO-dpa	58
E. Coordination à l'iridium(III).....	61
F. Évaluation de l'activité antibactérienne des composés iridiés	65
G. Conclusions et perspectives du chapitre	66

Chapitre II – Conjugués entre des complexes d'Ir(III) et des sidérophores catécholés mimant l'entérobactine	67
A. Voie de transport du fer entérobactine-dépendante chez <i>P. aeruginosa</i>	67
B. Synthèse des vecteurs analogues à l'Ent	69
1. Conception du TCV 63 , du BCV 64 et du MCV 65	69
2. Synthèse du TCV 63 , du BCV 64 et du MCV 65	70
C. Rétrosynthèse du conjugué TCV-Ir(III)	75
D. Synthèse des synthons catéchols	77
1. Synthèse du synthon catéchol 70b	77
2. Synthèse du synthon catéchol 70d	78
3. Synthèse du synthon catéchol 70c	79
E. Tentatives de synthèse des vecteurs catécholés acétylés	80
F. Synthèse du TCV-dpa 82	82
1. Synthèse du châssis tris-carbamate 79	82
2. Synthèse du conjugué TCV-dpa 82d	83
G. Synthèse des vecteurs catécholés munis d'un ligand dpa valérate	88
1. Synthèse du ligand dpa valérate 84	88
2. Synthèse des conjugués non iridiés	89
3. Tentatives de coordination à l'iridium(III).....	91

H. Synthèse des vecteurs catéchols benzylés munis d'un ligand dpa valérate et de leurs dérivés iridiés	93
1. Synthèse des ligands sidérophore-dpa	93
2. Coordination à l'iridium(III)	96
I. Stratégie alternative pour la synthèse des conjugués sidérophore catéchol-Ir(III)	97
1. Rétrosynthèse	97
2. Synthèse de l'azoture 107 et réactions de chimie click sur des vecteurs catécholés	99
3. Synthèse de l'ester activé de dpa coordonné à l'iridium(III)	101
4. Couplage des sidérophores au complexe d'Ir(III) 101	106
J. Conclusions et perspectives du chapitre	109
Chapitre III – Propriétés particulières des ligands di(pyridin-2-yl)glycine.....	110
A. Origine de la découverte	110
B. Hydrolyse acide.....	110
1. Synthèse des ligands	110
2. Clivage et cinétique	112
3. Mécanisme.....	114
C. Conclusions et perspectives du chapitre	117
PARTIE III – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES	119
PARTIE EXPÉRIMENTALE	131
I. Matériel et méthodes.....	133
A. Solvants et réactifs	133
B. Chromatographie sur Couche Mince	133
C. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).....	133
D. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	134
E. Procédures générales.....	134
1. Détermination de CMI.....	134
2. Coordination à l'Ir(III)	136

II. Protocoles et données analytiques et spectrales	137
BIBLIOGRAPHIE	185
ANNEXES.....	199
I. Index des molécules de la Partie II.....	201
II. Index des figures	209
III. Index des schémas.....	214
IV. Index des tableaux	217
V. Communications	218
A. Publications	218
B. Communications orales	218
C. Communications par affiche	219

Introduction générale

Les antibiotiques ont été largement utilisés dès les années 1940, permettant de limiter efficacement l'impact des maladies infectieuses bactériennes, et par conséquent, de sauver des millions de vies. Cependant, suite à plusieurs décennies d'utilisation mondiale intensive et parfois abusive des antibiotiques, les bactéries ont développé des résistances aux antibiotiques qui ne cessent d'augmenter.

Aujourd'hui, la résistance bactérienne aux antibiotiques est une menace majeure pour l'humanité.¹ En 2019, l'antibiorésistance aurait directement causé près de 1,3 millions de décès dans le monde et engendré un coût sanitaires de plus de 1,5 milliards d'euros en Europe et plus de 55 milliards de dollars aux États-Unis.² Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), si cette résistance reste au même niveau qu'aujourd'hui et sans un effort massif dans l'innovation, elle pourrait causer jusqu'à 10 millions de morts par an en 2050.³

La Société américaine des maladies infectieuses a défini un groupe de six bactéries pathogènes nosocomiales appelé ESKAPE (pour *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) qui inclut à la fois des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.⁴⁻⁶ En 2017, l'OMS a classé ces pathogènes multirésistants (particulièrement ceux carbapénèmes-résistants : *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et les *Enterobacteriaceae*) comme priorité critique pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques.⁷

La résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif, particulièrement celles faisant partie du groupe ESKAPE, est l'un des aspects le plus préoccupant d'autant qu'il se double d'un manque criant de nouvelles molécules actives. En juin 2019, 42 antibiotiques candidats étaient en phase d'essais cliniques, ce qui est faible comparé aux nombres de médicaments et vaccins contre le cancer (plus de 1100 composés en 2018 en essais cliniques).^{8,9} De plus, la majorité de ces composés antibactériens sont seulement des dérivés d'antibiotiques déjà sur le marché, et seule une des nouvelles molécules était efficace contre les bactéries à Gram négatif résistantes. Il est donc crucial de trouver des stratégies alternatives, ou complémentaires, aux antibiothérapies classiques pour lutter contre les infections causées par les bactéries à Gram négatif critiques : *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et les *Enterobacteriaceae*.^{4,10}

L'une des stratégies les plus prometteuses est la thérapie photodynamique (PDT), initialement développée contre le cancer et plus récemment contre les infections bactériennes. La PDT combine l'effet d'un photosensibilisateur à de la lumière en présence d'oxygène pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), toxiques pour les cellules.

La PDT antibactérienne représente un énorme potentiel dans le traitement des infections de la peau et des autres tissus accessibles (poumons et voies aériennes, système digestif supérieur et inférieur, sphère uro-génitale) aux systèmes modernes d'irradiation (laser, fibre optique guidée, etc.). Les tissus les moins accessibles à la lumière comme les os, les muscles et le système nerveux, ne sont touchés par les bactéries à Gram négatif que dans les phases tardives de l'infection avec un pronostic défavorable et des options principalement chirurgicales.

L'équipe MMBCA (Métaux et Microorganismes : Biologie, Chimie et Applications, appartenant à l'UMR 7242) dirigée par les Dr Isabelle SCHALK et Dr Gaëtan MISLIN, s'intéresse à la synthèse de conjugués sidérophore-antibiotique reposant sur la stratégie du cheval de Troie. Ces composés sont capables d'utiliser les voies d'assimilation du fer, nutriment essentiel pour les bactéries, pour transférer l'antibiotique dans la bactérie. Cette stratégie, développée par quelques équipes dans le monde au cours des trois dernières décennies, permet d'augmenter l'efficacité des antibiotiques, mais aussi d'élargir le spectre d'activité d'une molécule donnée. La grande majorité des molécules vectorisées par cette méthode sont des antibiotiques commerciaux et purement organiques.

Dans le cadre de cette thèse, nous souhaitons synthétiser des analogues de sidérophores bactériens de différents types et utilisables par les bactéries pathogènes et particulièrement par *P. aeruginosa*. Ces molécules sont conjuguées à des complexes d'iridium(III) qui ont la particularité d'avoir à la fois une activité antibactérienne intrinsèque en tant que métal toxique, et aussi une activité antibactérienne photoinduite en présence de lumière. Ce projet inédit est donc à la croisée de trois domaines actuellement en plein essor : la stratégie du cheval de Troie fondée sur les sidérophores, le développement des métalloantibiotiques et la PDT antibactérienne.

Cette thèse fait partie du projet VECTRIUM, qui se développe à l'interface de la chimie organique, de la chimie organométallique et de la microbiologie. Il est financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) en collaboration avec deux autres équipes : celle du Dr

Sylvain GAILLARD et du Pr Jean-Luc RENAUD (Laboratoire de Chimie Moléculaire et Thio-organique, ENSICAen), chargée de la chimie organométallique, et celle du Pr Patrick PLÉSIAT (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Service de Bactériologie, CHU de Besançon), responsable des expériences de microbiologie.

Après quelques généralités sur les bactéries, le fer et son transport par les sidérophores, les stratégies du cheval de Troie et de la PDT seront présentées au travers d'exemples représentatifs. Puis les travaux de thèse seront décrits et discutés : la synthèse des analogues de la desferrioxamine B et des analogues de l'entérobactine conjugués à des complexes d'iridium(III), et une étude méthodologique concernant les ligands di(pyridin-2-yl)glycine. Enfin, nous concluons sur les travaux de cette thèse et proposeront des perspectives au projet.

Partie I – Synthèse bibliographique

Chapitre I – La stratégie du cheval de Troie fondée sur les sidérophores

A. Généralités sur les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes du type procaryote, car elles ne possèdent pas de noyau. Leur ADN se trouve dans le cytoplasme sous forme de plasmide ou sous forme chromosomique circulaire. Elles peuvent être classifiées selon différents critères comme leur morphologie, leur besoin en oxygène ou encore la structure de leur enveloppe membranaire. C'est ce dernier critère qui permet de distinguer les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif, selon le test de Gram découvert par le bactériologiste danois Hans Christian GRAM en 1884.¹¹

Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif possèdent toutes les deux une membrane cytoplasmique composée d'une double couche de phospholipides et de protéines. Chez les bactéries à Gram positif, des acides lipotéichoïques traversent l'épaisse couche de peptidoglycane qui représente la majorité de la couche externe de la bactérie. Chez les bactéries à Gram négatif, la couche de peptidoglycane est plus fine et sépare le périplasme de la membrane externe, cette dernière étant composée de phospholipides, de lipopolysaccharides, de protéines de transport dont des porines permettant le passage de molécules à travers la membrane externe (**Figure 1**).¹² L'enveloppe bactérienne est une protection contre les contraintes mécaniques et les agressions chimiques susceptibles d'affecter la bactérie. Si une perméabilité contrôlée de l'ensemble de ces feuilletts est une nécessité, les nutriments doivent pouvoir traverser ces structures lamellaires complexes pour subvenir aux besoins de la bactérie. Au nombre des nutriments nécessaires à la prolifération bactérienne se trouvent les métaux biologiques et plus particulièrement le fer.

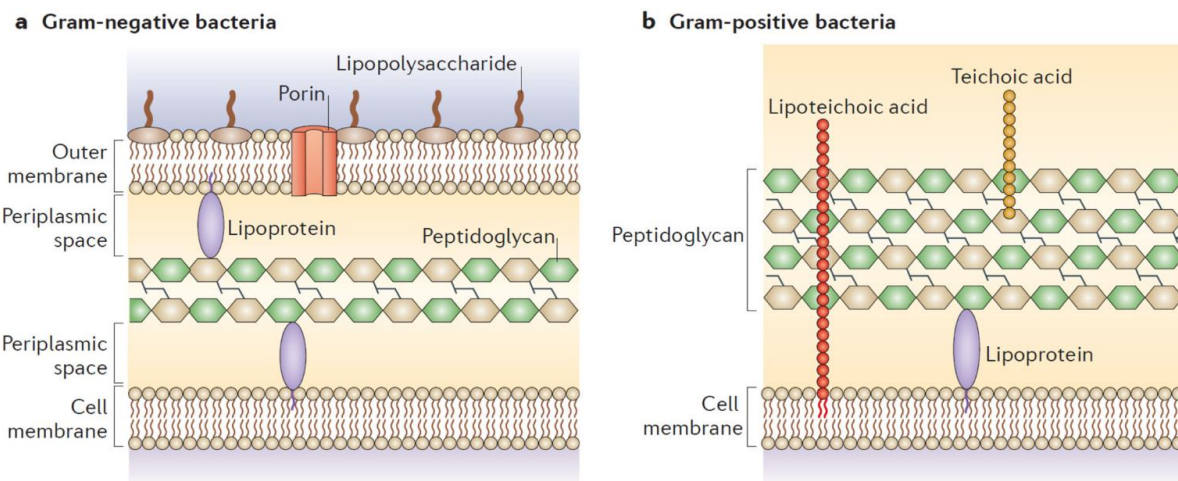


Figure 1. Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif (a) et à Gram positif (b). Modifié de Brown, L. et al., *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 620–630.¹²

B. Un nutriment essentiel : le fer

Le fer est le deuxième métal le plus abondant sur Terre¹³ et il peut exister sous différents états redox avec une chimie de coordination très riche.¹⁴ C'est probablement pour ces raisons que l'évolution l'a sélectionné pour le placer au cœur de nombreux processus biologiques cruciaux comme la photosynthèse, la transcription et la réparation d'ADN, la respiration aérobie et la biosynthèse des nucléotides. La majorité des microorganismes ont donc un métabolisme basé sur le fer, à l'exception de certains lactobacilles comme *L. plantarum*¹⁵ et la bactérie pathogène *Borrelia burgdorferi*,¹⁶ responsable de la maladie de Lyme, qui n'en ont pas besoin. Pour les bactéries qui en dépendent, ce nutriment très important est cependant peu biodisponible en milieu aérobie et pH physiologique, car il se trouve principalement sous la forme d'hydroxydes de fer(III) insolubles. Dans ces conditions, la concentration maximale en fer libre est de 10^{-9} M,^{17,18} cette concentration diminuant même à 10^{-18} M dans un hôte eucaryote où la plus grande partie du fer est en général séquestrée dans des protéines. Il est communément admis que la majorité des bactéries ont besoin d'une concentration en fer de 10^{-7} M au minimum pour une croissance optimale. Pour pallier cette faible biodisponibilité, l'évolution a pourvu les bactéries de mécanismes d'acquisition particulièrement efficaces. L'un des systèmes d'assimilation le plus répandu est fondé sur

l'utilisation de molécules capables de complexer le fer sous sa forme d'ion ferrique : les sidérophores.

C. Sidérophores et transport du fer

1. Sidérophores

Du grec ancien *pherein* signifiant « porter/transporter » et *sideros* « fer », les sidérophores sont des composés de faible poids moléculaire ($< 2000 \text{ g.mol}^{-1}$), synthétisés et excrétés par la bactérie dans le milieu extracellulaire. Les sidérophores sont riches en hétéroatomes principalement oxygénés, plus rarement azotés, susceptibles d'interagir avec l'ion métallique. En effet, le fer ferrique est un acide de Lewis dur qui préférera former des liaisons avec des bases de Lewis dures comme les bases conjuguées de fonctions chimiques oxygénées protiques. Les ions fer(III) forment préférentiellement des complexes de type octaédrique hexacoordinés. Les hétéroatomes du sidérophore impliqués dans la sphère de coordination sont positionnés aux angles de l'octaèdre. Les hétéroatomes sont en général appariés dans des fonctions chimiques bidentates comme les catéchols, les hydroxamates et les hydroxyacides carboxyliques. Il faut, par conséquent, trois fonctions bidentates pour satisfaire aux règles de coordination de l'ion Fe(III) . Ces fonctions bidentates sont associées à un squelette carboné, souvent de nature peptidique, qui permet d'organiser les motifs chélatants en termes d'angles et de distances pour une complexation optimale de l'ion ferrique (**Figure 2**).

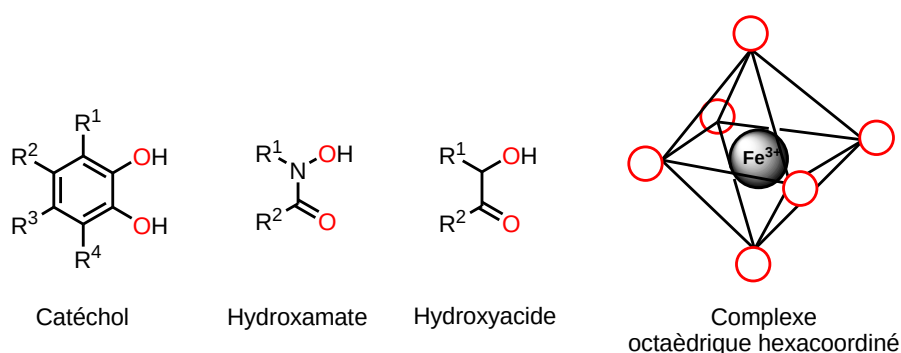


Figure 2. Structures de groupes bidentates retrouvés dans les sidérophores. Organisation des hétéroatomes (colorés en rouge) autour de l'ion Fe(III) .

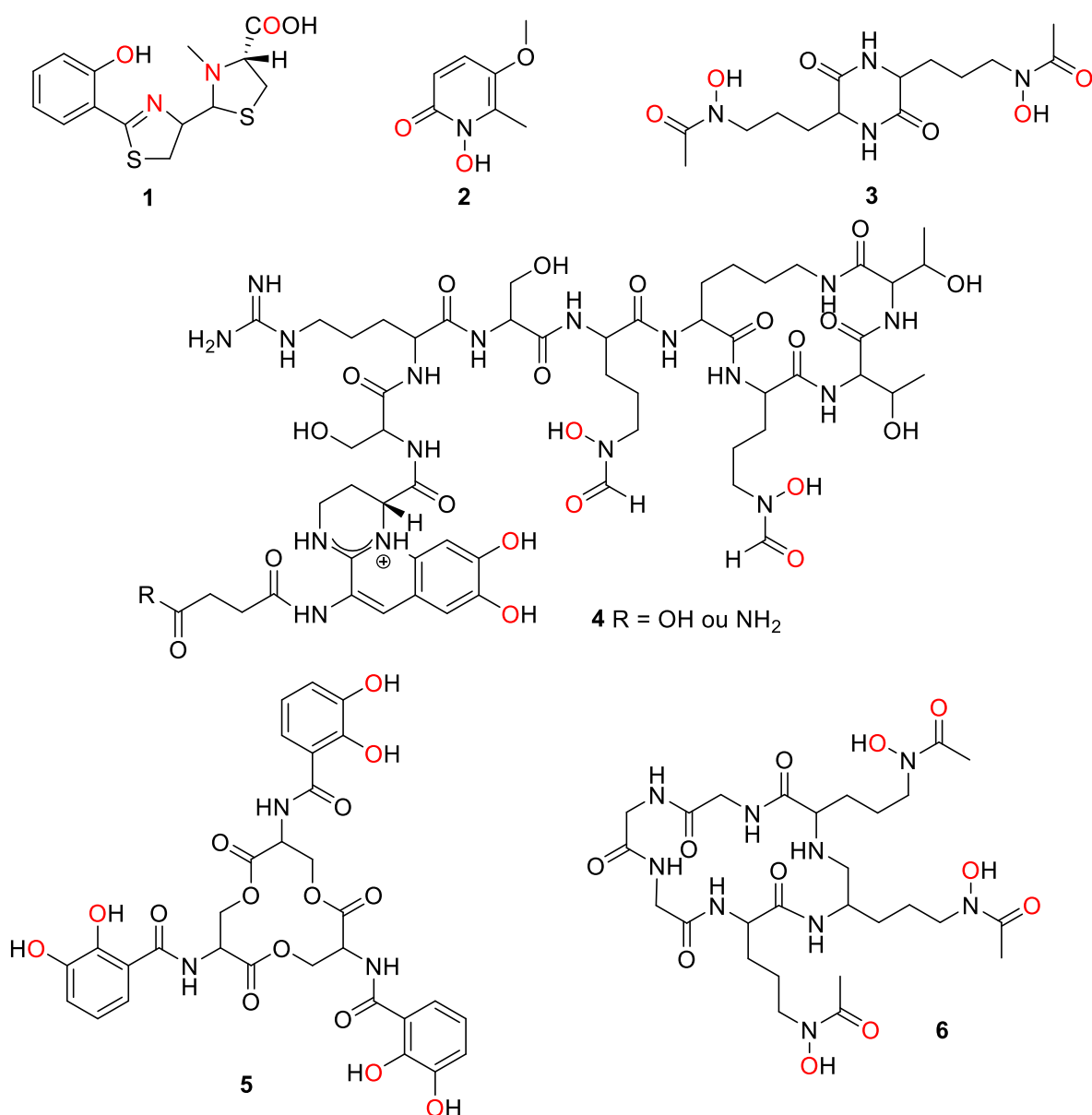


Figure 3. Structures de six sidérophores bactériens représentatifs. Les hétéroatomes impliqués dans la chélation du fer(III) sont colorés en rouge.

Découverts dans les années 1950 puis caractérisés en 1956 par GARIBALDI et NEILANDS,¹⁹ les premiers sidérophores n'étaient que l'échantillon des 500 sidérophores avec des structures très diverses qui ont été identifiés à ce jour.²⁰ Parmi ces sidérophores, certains sont de structures très simples comme la pyochéline **1** (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*), la cépabactine **2** (*Burkholderia cepacia*) ou l'acide rhodotorulique **3** (*Rhodotorula pilimanae*) alors que d'autres présentent des architectures moléculaires nettement plus complexes comme la pyoverdine **4** (*Pseudomonas aeruginosa*). Les sidérophores peuvent posséder trois groupes chélatants identiques, des catéchols dans le cas de l'entérobactine (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) **5** ou des hydroxamates pour le

ferrichrome **6** (*Ustilago sphaerogena*). Cependant, la majorité des sidérophores sont mixtes et pourvus de groupes bidentates différents comme la pyoverdine **4** par exemple qui contient un motif catéchol et deux groupes hydroxamates (**Figure 3**).

Cette diversité structurale est à l'origine d'une large palette de stœchiométries de complexation ligand/Fe(III). Des sidérophores comme la pyoverdine **4**, l'entérobactine **5** ou le ferrichrome **6** possédant trois groupes bidentates, sont capables de lier l'ion ferrique avec une stœchiométrie 1:1. Il faut par contre deux pyochélines **1** ou trois cépabactines **2** pour complexer un ion Fe(III).^{21,22} L'acide rhodotorulique **3** est un cas plus complexe, car trois ligands doivent s'associer pour complexer deux ions Fe(III).²³

2. Transport du fer par les sidérophores

Les sidérophores sont synthétisés dans le cytoplasme et le périplasme puis sont sécrétés dans le milieu extracellulaire, par un mécanisme qui reste à découvrir pour la plupart d'entre eux. Certains, comme la pyoverdine **4**, passent par des pompes d'efflux.²⁴ Ils complexent le fer disponible présent sous forme ferrique dans le milieu extracellulaire puis ces complexes ferriques sont reconnus par des transporteurs spécifiques de membrane externe et importés dans le périplasme.²⁵ L'énergie nécessaire pour le transport du complexe est apportée par la machinerie TonB (TonB/ExbB/ExbD), située dans le périplasme et la membrane cytoplasmique, et un gradient de protons entre le périplasme et le cytoplasme.²⁶ Une fois dans le périplasme, le destin du sidérophore ferrique peut varier en fonction du sidérophore et/ou de la bactérie considérés. Si certains sidérophores ferriques sont dissociés dans le périplasme, d'autres complexes peuvent poursuivre leur périple et être transportés par une protéine périplasmique jusqu'à un transporteur transmembranaire de type ABC ou une perméase, pour arriver ensuite au cytoplasme (**Figure 4**). Néanmoins, que ce soit dans le périplasme ou le cytoplasme, l'ion ferrique est réduit en ion ferreux par une réductase (propre à chaque bactérie, parfois à chaque sidérophore) et/ou par une modification chimique du sidérophore.²⁷⁻²⁹

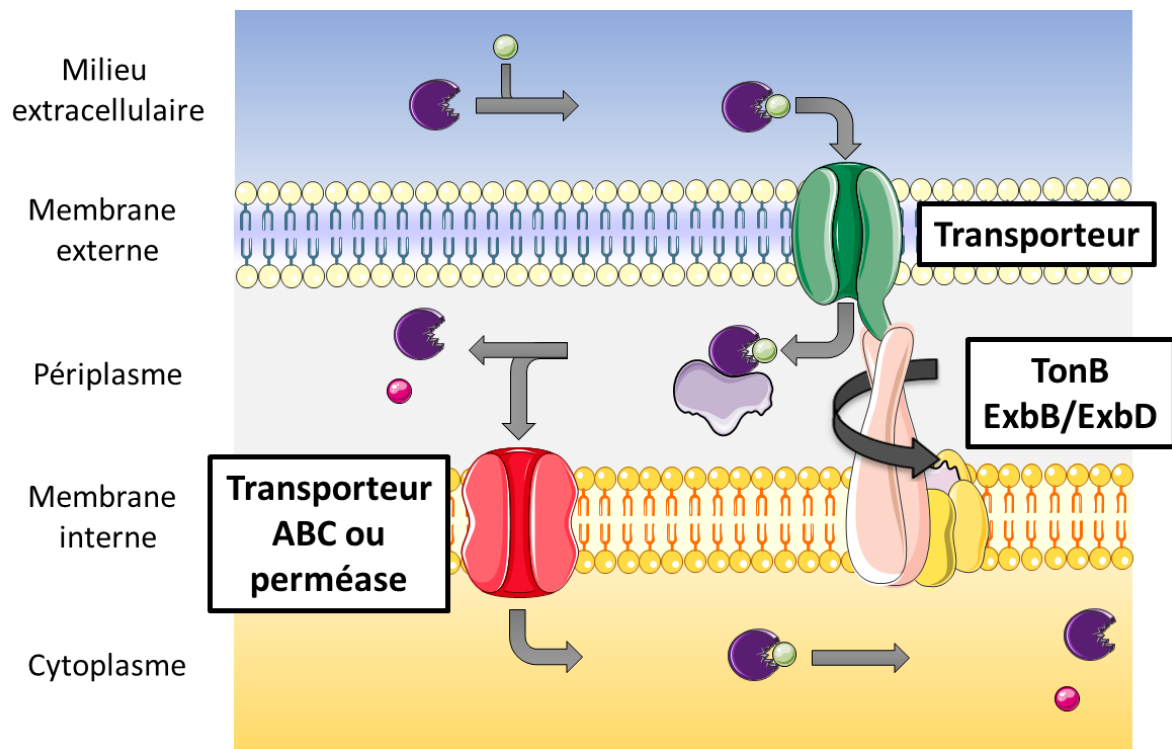


Figure 4. Processus général du transport du fer sidérophore-dépendant dans une bactérie à Gram négatif. Le sidérophore est coloré en violet et la protéine périplasmique en violet pâle. L'ion Fe^{3+} est représenté sous la forme d'une sphère verte et l'ion Fe^{2+} sous la forme d'une sphère rose.

D. Principe de la stratégie du cheval de Troie basée sur les sidérophores

Tout comme Ulysse a réussi à passer les portes de la ville de Troie en utilisant un cheval de bois rempli de soldats Achéens, nous utilisons des sidérophores comme vecteurs pour antibiotiques afin de les faire entrer à l'intérieur de la bactérie en utilisant comme « portes d'entrée » les voies d'acquisition du fer. Dans cette approche, le conjugué est composé de trois éléments : le sidérophore, l'antibiotique et un bras espaceur les séparant. Le bras espaceur peut être clivable *in vivo*. De plus, il permet d'éviter l'encombrement stérique généré par l'antibiotique, tout particulièrement lors de la reconnaissance du sidérophore par son transporteur de membrane externe et les autres protéines de la voie de transport. En fonction du sidérophore utilisé comme vecteur, le conjugué, nommé sidéromycine, est transporté dans le périplasma ou jusqu'au cytoplasme (**Figure 5**).^{30,31}

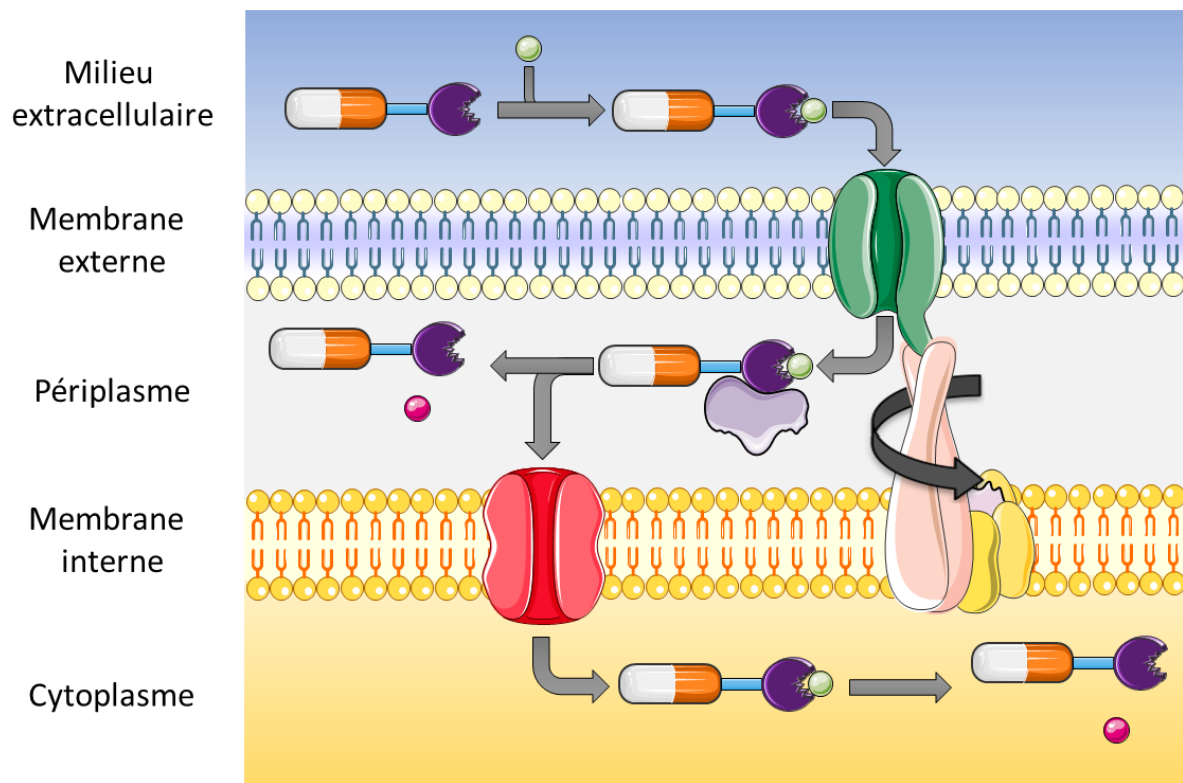


Figure 5. Principe général de la stratégie du cheval de Troie utilisant des conjugués sidérophore-antibiotique (sidéromycines). Le sidérophore est coloré en violet et le bras espaceur en bleu. L'antibiotique est représenté sous la forme d'une gélule orange et blanche, l'ion Fe^{3+} sous la forme d'une sphère verte et l'ion Fe^{2+} sous la forme d'une sphère rose.

Cette stratégie permet d'accroître la quantité d'antibiotique pénétrant dans la bactérie par comparaison avec une simple diffusion passive.^{32,33} Le mécanisme d'assimilation du fer est radicalement différent chez l'être humain de sorte que la vectorisation par les sidérophores permet d'adresser plus spécifiquement l'antibiotique à la bactérie, ce qui peut présenter un intérêt dans le cas de molécules présentant une toxicité importante. Cette stratégie élégante n'est cependant pas uniquement le fruit de l'inventivité des chercheurs, car elle s'inspire des structures et modes d'action des sidéromycines naturelles.

E. Les sidéromycines naturelles

Les sidéromycines sont des composés naturels utilisés par les bactéries contre d'autres microorganismes, pour assurer leur prédominance dans un environnement donné. Ces sidéromycines naturelles reprennent évidemment la structure à trois éléments : vecteur sidérophore-bras espaceur-antibiotique. Au nombre des sidéromycines décrites jusqu'ici,

deux sont plus particulièrement intéressantes à présenter, car elles résument parfaitement l'optimisation de la stratégie du cheval de Troie par le processus évolutif. L'albomycine δ_2 **7** et la microcine E492 **8** sont ainsi deux archétypes des sidéromycines naturelles.^{34–36}

L'albomycine δ_2 **7** est produite par les *Streptomyces* et présente un spectre d'activité assez large sur les bactéries à Gram négatif. Cette sidéromycine est un conjugué d'origine biosynthétique entre un analogue du sidérophore ferrichrome **6** (voir **Figure 3**) et un antibiotique de type thioribosylpyrimidine. L'albomycine δ_2 **7** est importée dans les bactéries exprimant le système de transport du sidérophore ferrichrome.³⁷ Une hydrolase endogène clive ensuite une fonction amide du bras espaceur pour libérer la fraction antibiotique qui cible la Ser-tRNA-synthétase (SerRS),³⁸ une enzyme-clé de la synthèse peptidique (**Figure 6**).³⁹ L'albomycine **7** présente une activité antibactérienne (CMI) de 0,005 mg/L contre *Escherichia coli* alors que la fraction antibiotique seule reste peu active sur le même microorganisme (CMI = 256 mg/L).⁴⁰

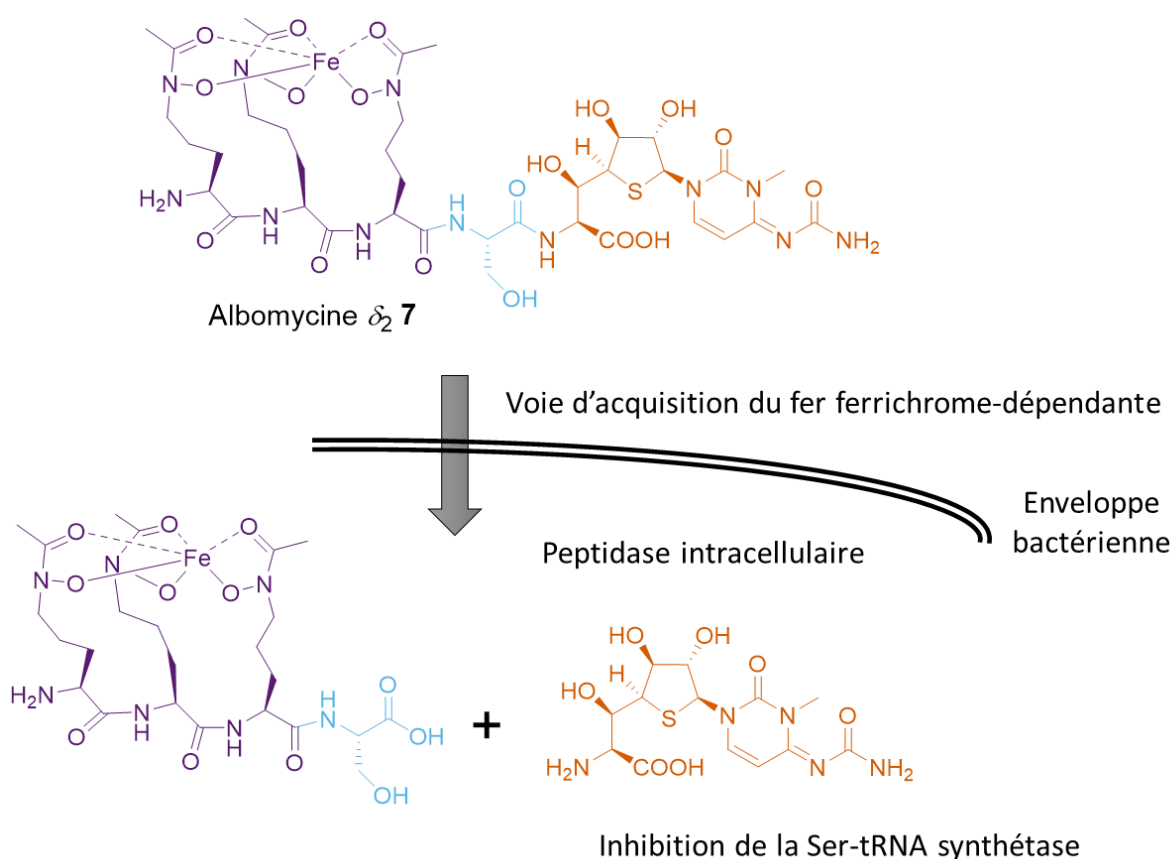


Figure 6. Structure de l'albomycine δ_2 **7** et mode de fonctionnement de cette sidéromycine. Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.

La microcine E492 (MccE492) **8** est produite par des souches de *Klebsiella pneumoniae*. Ce produit naturel est un conjugué entre un analogue linéaire du sidérophore entérobactine **5** (voir **Figure 3**) et un peptide de 84 acides aminés relié par un espaceur glucosidique. Cette sidéromycine présente une activité très importante sur un large panel de bactéries à Gram négatif.⁴¹ La MccE492 est importée par les transporteurs dédiés aux sidérophores catécholés dont l'entérobactine **5** fait partie.⁴² Dans le périplasme, une hydrolase de la bactérie permet la libération du peptide antibactérien. Ce dernier induit la mort bactérienne en dépolarisant la membrane interne et en perturbant le métabolisme du mannose (**Figure 7**).⁴³⁻⁴⁵

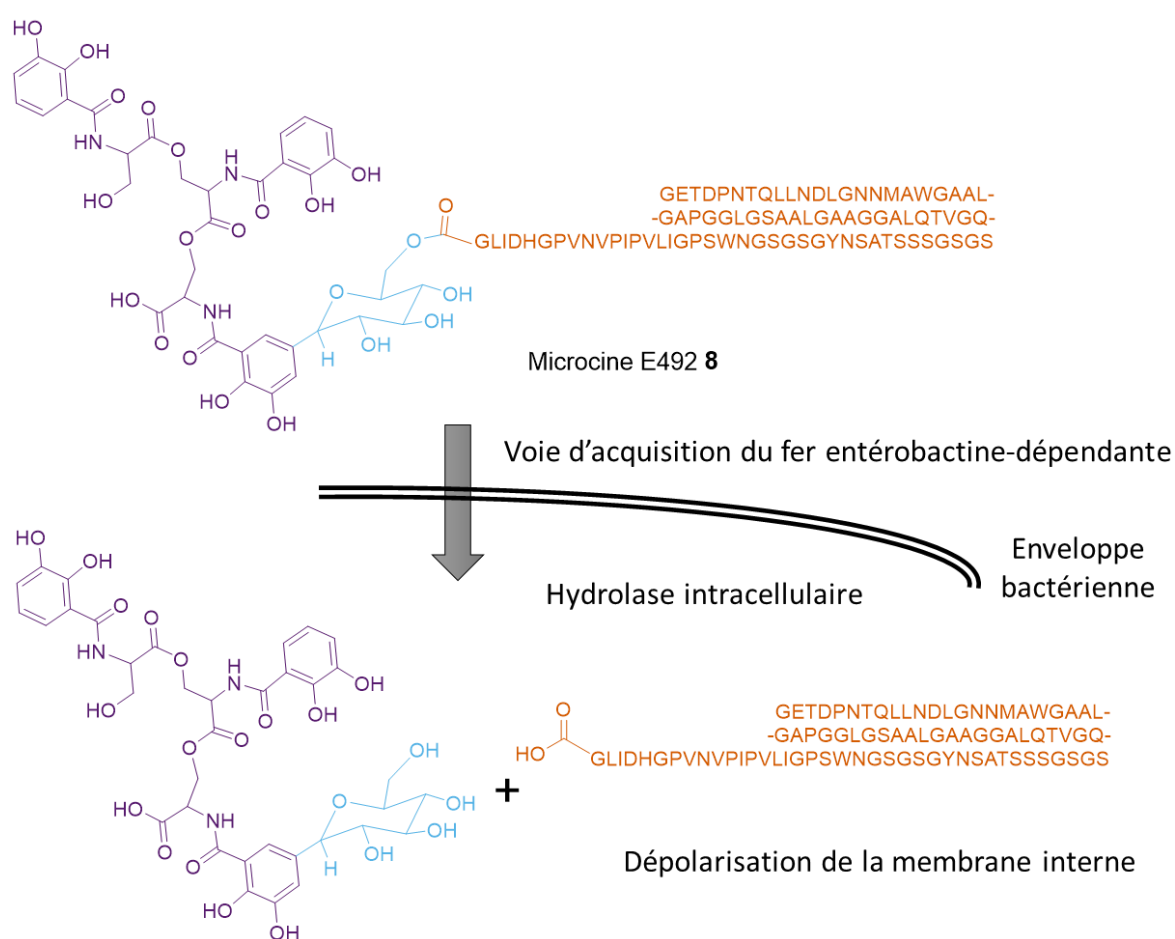


Figure 7. Structure de la microcine E492 **8** et mode de fonctionnement de cette sidéromycine. Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.

L'exemple de la MccE492 **8** montre clairement que la taille des molécules antibiotiques à vectoriser n'est pas forcément un problème et que ces dernières peuvent être bien plus volumineuses que le vecteur lui-même. Ce résultat montre la grande permissivité

stérique des transporteurs de membrane externe qui tranche avec la spécificité de reconnaissance très élevée pour le sidérophore transporté.

Les deux exemples de sidéromycines naturelles choisies mettent aussi en évidence que la libération du composé actif par rupture de l'espaceur peut être nécessaire pour une activité optimale.

L'efficacité de cette stratégie a inspiré les chercheurs dans le développement de sidéromycines artificielles. Ces recherches, développées depuis trois décennies par quelques groupes à travers le monde, sont aujourd'hui un domaine en plein essor. En effet, les connaissances acquises dans le domaine de la biologie des sidérophores et l'élucidation des voies d'assimilation du fer correspondantes, permettent dorénavant de concevoir plus facilement des vecteurs adaptés à un type d'antibiotique donné ou ciblant un pathogène particulier.

F. Les sidéromycines artificielles

1. Généralités

Le développement de sidéromycines artificielles a été envisagé dès les années 1980 et de plus en plus fréquemment à partir des années 1990. De nombreux types d'antibiotiques différents ont été conjugués à des sidérophores naturels, mais plus souvent à des analogues synthétiques fonctionnalisés (**Figure 8**).^{30,31,46–49}

Afin de mettre en perspective les avantages et les limitations de cette stratégie, nous avons choisi de présenter dans la suite du manuscrit quelques exemples choisis dans la littérature récente dans ce domaine, en considérant de façon séparée les stratégies ciblant le périplasme et celles ciblant le cytoplasme.

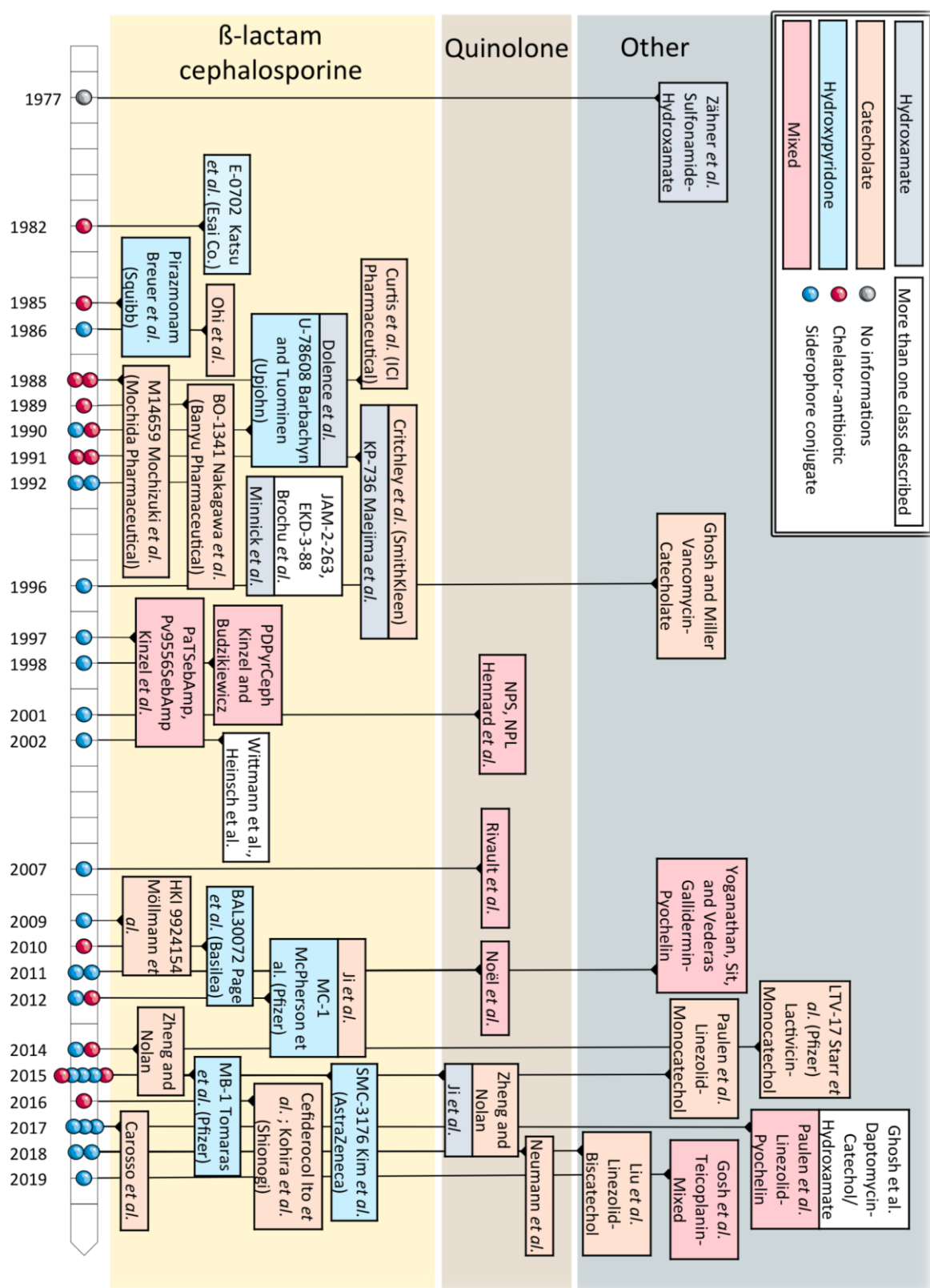


Figure 8. Développement de sidéromycines synthétiques au cours du temps. Extrait de la thèse de Q. Perraud, 2020.²⁹

2. Sidéromycines artificielles ciblant le périplasme

Comme nous l'avons vu avec l'exemple naturel de la MccE492 **8**, la voie d'assimilation du fer entérobactine-dépendante est une porte d'entrée utilisable pour qui en possède les clés. Malheureusement, l'entérobactine (Ent) **5** naturelle ne dispose pas de fonction chimique disponible pour la conjugaison avec un bloc bras espaceur-antibiotique. L'équipe du Pr Liz NOLAN (MIT, USA) a ainsi développé des analogues fonctionnalisés de l'Ent utilisables pour la vectorisation d'antibiotiques. Cette équipe a notamment synthétisé des conjugués Ent-ampicilline **9a** et Ent-amoxicilline **9b** (Figure 9),⁵⁰ des antibiotiques de type β -lactame dont la cible est la biosynthèse du peptidoglycane. Ces conjugués sont transportés jusqu'au périplasme par la voie de transport du fer Ent-dépendante chez *E. coli*. **9a** et **9b** permettent d'éliminer sélectivement cette bactérie tout en ayant une faible toxicité pour les cellules humaines. De plus, conformément à ce qui est attendu pour ce type d'approche, l'efficacité du conjugué est bien plus importante que celle de l'antibiotique seul.

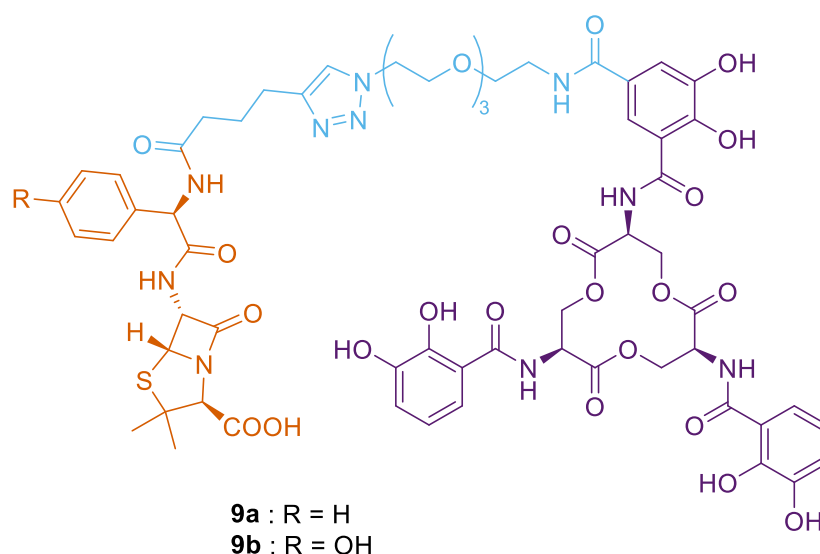


Figure 9. Structures des conjugués **9a** et **9b** entre un analogue fonctionnalisé de l'Ent **5** et des antibiotiques de la famille des β -lactames.⁵⁰ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.

L'entérobactine **5** est un sidérophore tris-catécholé et, aussi performante que soit l'approche du Pr NOLAN, ces synthèses multi-étapes ont en fin de compte des rendements finaux très faibles, ce qui limite le potentiel de ces approches dans un but thérapeutique.

Ce principe a ainsi été simplifié à l'extrême dans le cas du céfidérocol **10** (commercialisé sous le nom de FETCROJA® par le groupe Shionogi, **Figure 10**), le premier (et seul) conjugué sidérophore-antibiotique approuvé à ce jour aux USA (novembre 2019) et en Europe (avril 2020), pour une utilisation dans des infections urinaires résistantes. Il est en cours d'évaluation sur d'autres types d'infections. Le céfidérocol **10** est un conjugué entre un mono-catéchol et un antibiotique de la famille des céphalosporines qui cible la biosynthèse du peptidoglycane. Il est transporté par les systèmes d'assimilation du fer dépendants des sidérophores catécholés comme l'Ent **5**.⁵¹ Utilisé uniquement en tant que médicament de dernier recours, il est actuellement le meilleur antibiotique contre les bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes avec une efficacité antibactérienne très importante *in vitro* (CMI ≤ 2 mg/L pour des isolats de *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*).⁵¹ Cependant, des souches cliniques de certains pathogènes comme *P. aeruginosa* montrent déjà des résistances *in vivo* au céfidérocol.⁵²

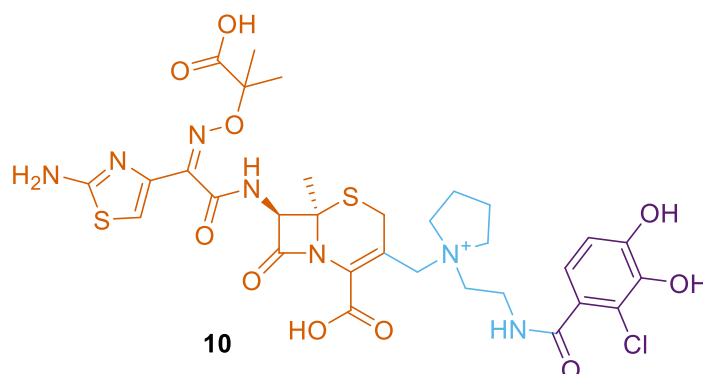


Figure 10. Structure du céfidérocol **10** (FETCROJA®). Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.

Dans le céfidérocol **10** comme dans les conjugués **9a** et **9b**, le β -lactame est relié au sidérophore vecteur par un bras non hydrolysable ce qui ne semble pas impacter, bien au contraire, l'efficacité antibactérienne de la molécule. À ce jour, la cible principale des sidéromycines artificielles dans le périplasme est la transpeptidase impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane. Cette protéine présente une grande permissivité structurale qui explique que l'inhibiteur n'ait pas besoin d'être libéré de son vecteur pour interagir favorablement avec sa cible. L'exemple du céfidérocol **10** montre que des analogues, parfois très simplifiés des sidérophores naturels, sont capables de leurrer les systèmes de transport.

Si des travaux récents menés par notre équipe montrent que d'autres protéines du périplasma, comme TonB par exemple, peuvent servir de cibles biologiques,⁵³ la majorité des antibiotiques de l'arsenal actuel inhibe des processus biologiques cytoplasmiques.

3. Sidéromycines artificielles ciblant le cytoplasme

L'équipe du Pr Liz NOLAN (MIT, USA) s'est aussi intéressée à des conjugués Ent-ciprofloxacine (**Figure 11**).⁵⁴

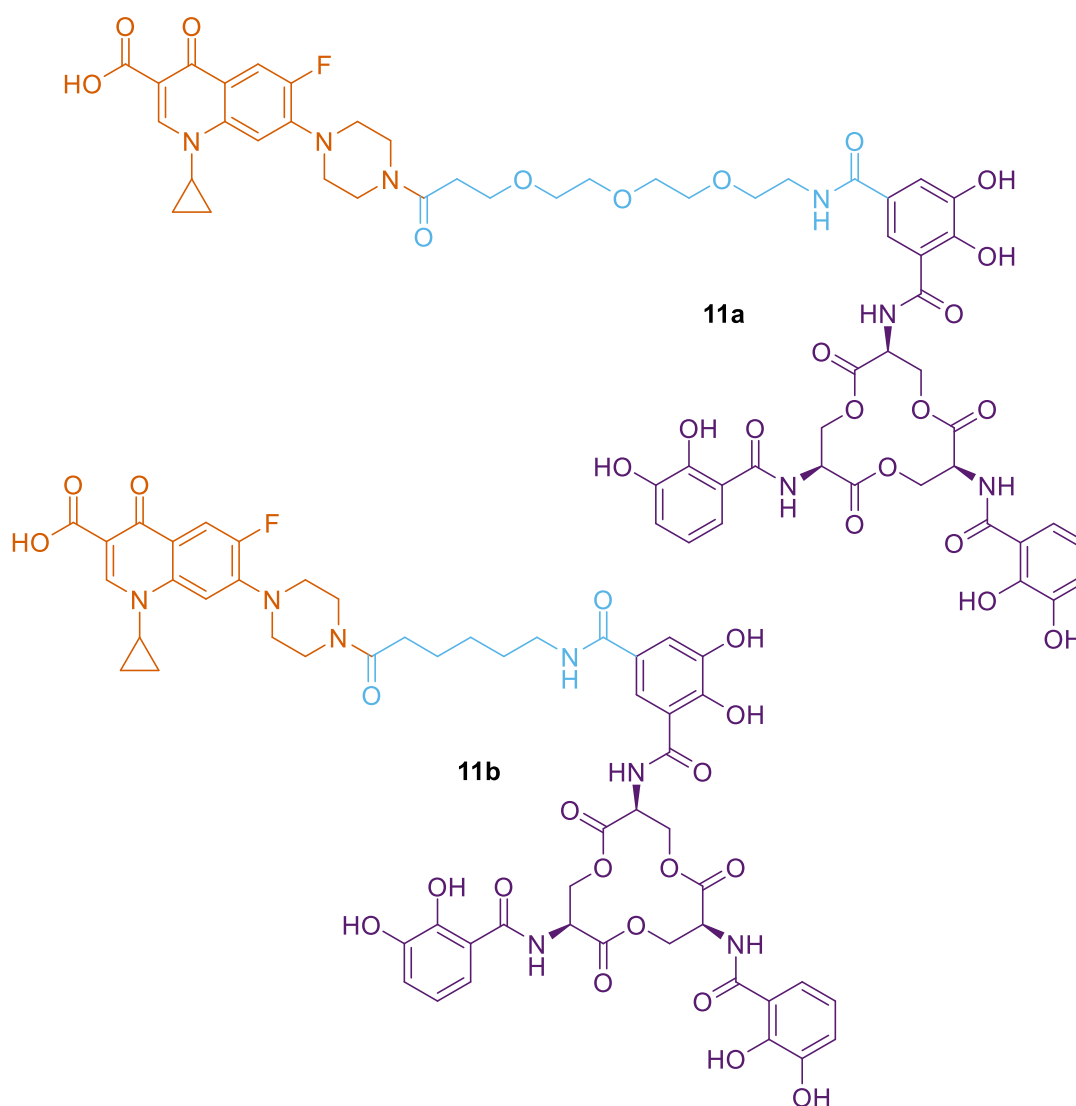


Figure 11. Structures des conjugués **11a** et **11b** entre un analogue fonctionnalisé de l'Ent **5** et de la ciprofloxacine, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones.⁵⁴ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.

La ciprofloxacine est un antibiotique de la famille des fluoroquinolones qui vise des enzymes cytoplasmiques⁵⁵ comme l'ADN gyrase ou la topoisomérase de type IV. L'Ent **5** est un sidérophore pouvant être transporté jusqu'au cytoplasme chez *E. coli*. Ainsi, la conjugaison Ent-Cipro a permis de vectoriser l'antibiotique jusqu'à sa cible *via* les voies d'acquisition du fer Ent-dépendante. Les composés **11a** et **11b** sont actifs sur les souches pathogènes de *E. coli* qui produisent l'estérase IroD permettant d'hydrolyser le cycle trilactone de l'Ent **5**. L'activité antibactérienne de **11b** est comparable avec celle de l'antibiotique sur des bactéries à Gram négatif pathogènes. En revanche, **11a** n'a pas eu la même efficacité, car probablement le conjugué est resté piégé dans le périplasme sans pouvoir traverser la membrane interne.

Récemment, en utilisant le même antibiotique, l'équipe du Pr Pascal SONNET (Université de Picardie Jules Verne, Amiens) a synthétisé six conjugués avec des analogues simplifiés de sidérophores en se basant notamment sur les vecteurs mono-catéchol ou isostères (hydroxy-pyridone notamment), faisant un parallèle avec l'approche qui a conduit au céfidérocol **10** (Figure 12).⁵⁶

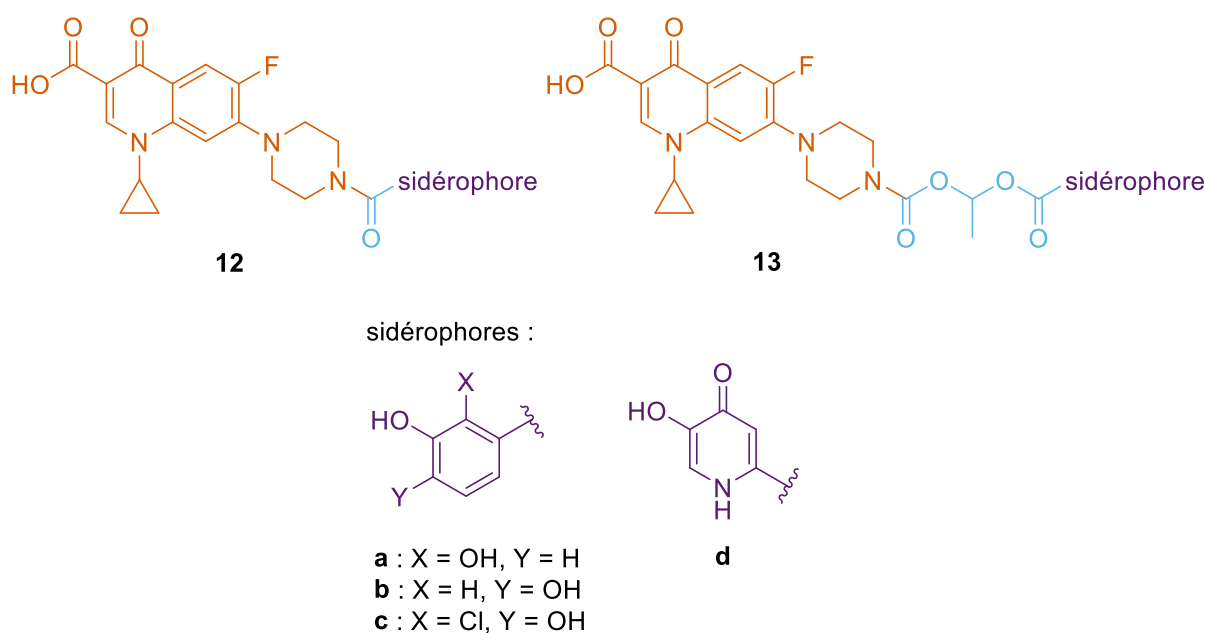


Figure 12. Structures des conjugués **12a-d** et **13a,d** entre un sidérophore et la ciprofloxacine.⁵⁶ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.

Les conjugués **12** possédant un bras espaceur non clivable sont moins efficaces que les conjugués **13** possédant un bras espaceur clivable. De plus, les conjugués **13a** et **13d** sont 2 à 8 fois plus efficaces que la ciprofloxacine seule dans un milieu carencé en fer sur des

souches de *Burkholderia pseudomallei*. Par ailleurs, il semblerait que le conjugué **13d** ne rentre pas dans la bactérie (*P. aeruginosa*) par diffusion passive, mais probablement par un transporteur TonB dépendant non déterminé à ce jour.

Cet exemple montre une nouvelle fois que des analogues simplifiés des sidérophores peuvent vectoriser des antibiotiques de manière satisfaisante même lorsque leur cible est cytoplasmique. Cependant, à la différence des antibiotiques de type β -lactame, une libération des fluoroquinolones dans la bactérie semble nécessaire pour une meilleure activité.

Les sidérophores peuvent aussi permettre d'élargir le spectre de certains antibiotiques. Le cas des oxazolidinones est emblématique. Le linézolide et ses successeurs sont des antibiotiques extrêmement efficaces sur les bactéries à Gram positif, mais restent inefficaces sur les pathogènes à Gram négatif, principalement pour des raisons de pénétration et d'efflux.⁵⁷ La vectorisation par les sidérophores et l'utilisation de la stratégie du cheval de Troie peuvent donc permettre d'accroître la concentration intra-bactérienne de ces antibiotiques à spectre restreint. L'équipe d'accueil MMBCA a été la première à décrire une oxazolidinone active sur *P. aeruginosa* sous forme d'un conjugué stable avec un vecteur mono-catéchol. Malgré cette avancée, les activités observées restaient modestes.⁵⁸ Très récemment, notre équipe a montré que ce résultat est probablement lié au fait que les conjugués entre une oxazolidinone et des vecteurs catécholés restaient localisés dans le périplasme.⁵⁹

En 2018, l'équipe du Pr Marvin J. MILLER (Université de Notre Dame, USA) a repris ces travaux et décrit le conjugué **14** entre une oxazolidinone et un vecteur bis-catécholé.⁶⁰ Les deux entités étaient liées par un antibiotique, une céphalosporine, jouant le rôle d'espaceur. Le conjugué **14** s'est montré particulièrement actif (CMI descendant jusqu'à 0,2 μ M !) sur des bactéries à Gram négatif dont la résistance est liée à l'expression de céphalosporinase. Le conjugué traverse la membrane externe, considérée comme la principale barrière aux oxazolidinones, grâce au vecteur sidérophore. Dans le périplasme la céphalosporinase de la bactérie provoque la libération de l'oxazolidinone qui peut ensuite diffuser librement au travers de la membrane interne pour rejoindre sa cible biologique (ribosome) (**Figure 13**).

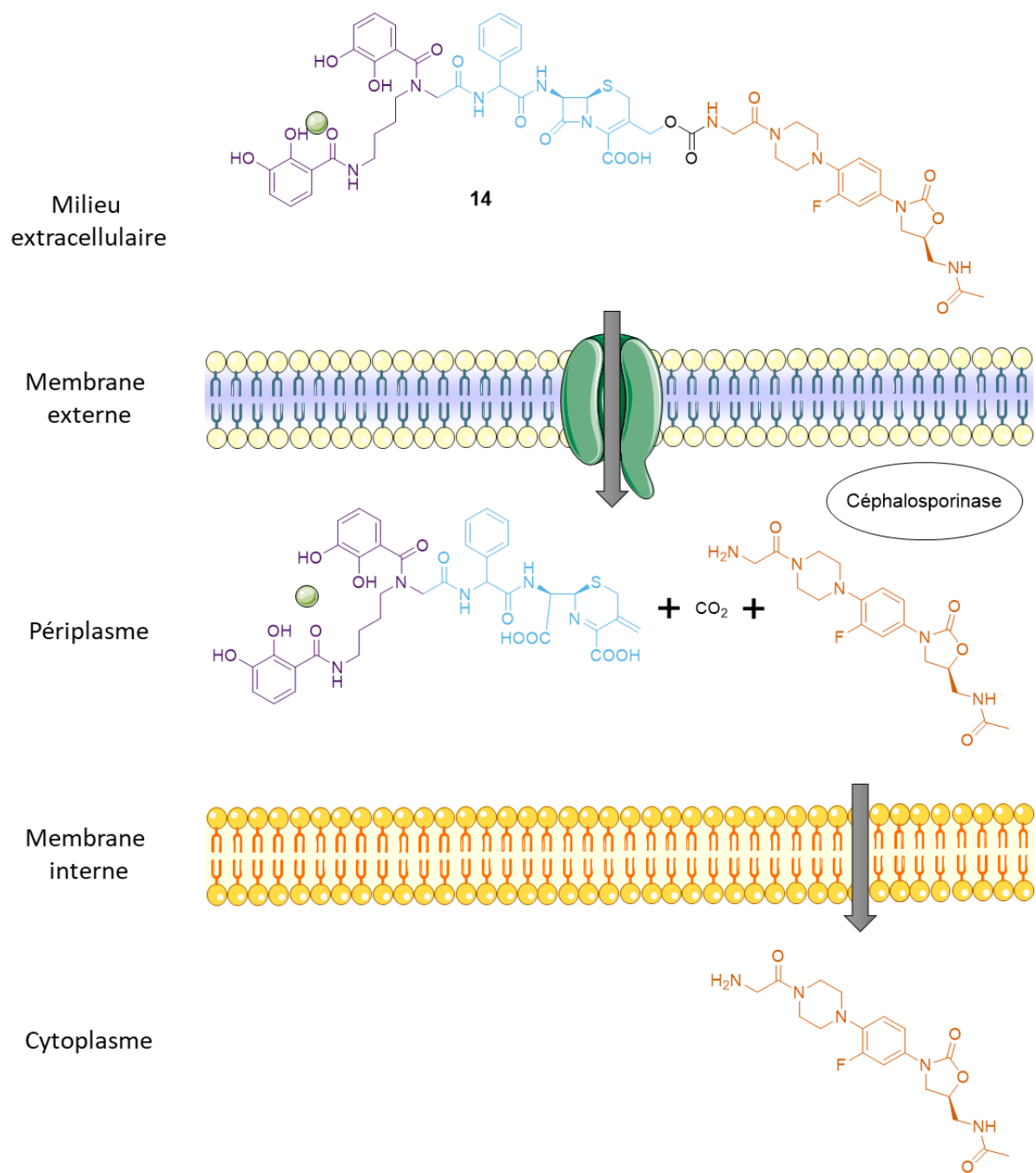


Figure 13. Structure et mode d'action de la sidéromycine artificielle **14**. Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange. L'ion Fe^{3+} est représenté sous la forme d'une sphère verte.

Ces quelques exemples choisis dans une littérature qui s'accroît rapidement depuis la mise sur le marché du céfidérol **10**, mettent en lumière quatre aspects importants dans l'utilisation des sidérophores comme vecteurs d'antibiotiques contre les bactéries à Gram négatif :

- 1) **La taille de la molécule active vectorisée semble avoir peu d'importance jusqu'au périplasme.** Le passage de la membrane externe est gouverné par la spécificité de reconnaissance du sidérophore par le transporteur dédié.
- 2) Bien que spécifique à un sidérophore naturel, **un analogue de synthèse conçu de façon adéquate peut mimer le sidérophore et leurrer le système de transport.** Cet analogue peut d'ailleurs être de structure relativement simplifiée.
- 3) **La libération de la molécule active n'est pas forcément nécessaire** pour obtenir une activité antibactérienne surtout si la destination finale du conjugué est le périplasme.
- 4) Ces exemples montrent aussi ce qui pourrait être une limitation de cette approche : chaque espèce bactérienne (parfois chaque souche) utilise un panel de sidérophores qui lui est propre : des sidérophores endogènes qu'elle produit et utilise, et des sidérophores exogènes qu'elle utilise, mais qu'elle « pirate » à des microorganismes concurrents. **L'efficacité d'un conjugué sera donc très variable au sein d'un microbiote complexe en fonction du sidérophore utilisé**, mais aussi de la destination finale (périplasme ou cytoplasme) du sidérophore et de la cible biologique de l'inhibiteur vectorisé.

La majorité des antibiotiques vectorisés jusqu'ici étaient commerciaux et purement organiques, c'est-à-dire constitué d'éléments légers des trois premières périodes du tableau de Mendeleïev. Si les métaux non biologiques ont été utilisés par le passé pour traiter des infections (vapeurs de mercure contre la syphilis, sels d'or contre la lèpre ou la tuberculose, arsenic contre la maladie du sommeil, etc.), leur toxicité et l'avènement des antibiotiques les ont fait disparaître des pharmacopées modernes. Aujourd'hui, face à l'augmentation des résistances et à la toxicité des antibiotiques de dernier recours, l'utilisation des complexes métalliques en santé semble ne plus devoir se limiter au cancer. La vectorisation par des sidérophores peut contribuer à améliorer le potentiel thérapeutique de complexes organométalliques.

G. Vectorisation de complexes métalliques par des sidérophores

Comme nous venons de le mentionner, il existe beaucoup d'exemples de vectorisation de molécules organiques par des sidérophores et analogues de sidérophores. Les complexes métalliques sont dorénavant une source prometteuse de nouvelles molécules antibactériennes.^{9,61} Ainsi, de nombreux conjugués entre des antibiotiques et des complexes métalliques ont été synthétisés avec souvent des activités particulièrement intéressantes.^{9,62,63} Cependant, à ce jour, la vectorisation de complexes métalliques par des sidérophores reste peu décrite et à notre connaissance, seuls trois exemples, dont deux très récents, existent dans la littérature. Ces exemples sont décrits à la suite dans l'ordre chronologique de publication.

1. Conjugués entre la desferrioxamine et un complexe de Ru(II)

L'équipe du Pr Paul J. DYSON (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse) a synthétisé des conjugués entre des dérivés de la desferrioxamine B (DFO) et des complexes de ruthénium(II) **15**, **16**, **17** et **18** (**Figure 14**).⁶⁴ Ces composés présentent une bonne sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses et, bien que moins actifs que le cisplatine, ils permettent aussi une inhibition modérée de la croissance de certaines souches bactériennes (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, et *P. aeruginosa*). Cette inhibition de la croissance bactérienne est plus importante que celles des complexes arènes de ruthénium(II) seuls avec des agents antibactériens/anticancéreux (ciprofloxacine et quinolones).^{62,65}

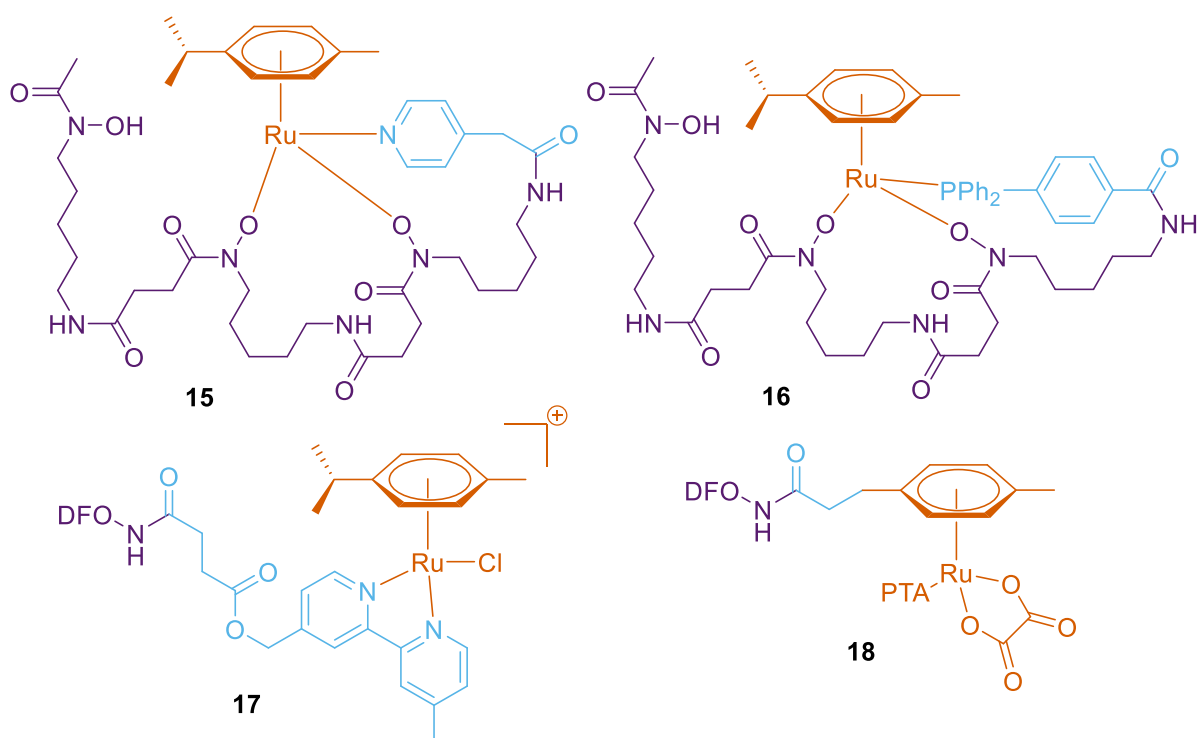


Figure 14. Structures des conjugués DFO-Ru(II) **15**, **16**, **17** et **18**.⁶⁴ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et le métalloantibiotique en orange.

2. Conjugués entre un vecteur entérobactine et un complexe de Pt(IV)

Deux conjugués entre une entérobactine fonctionnalisée et des complexes métalliques (**Figure 15**) ont été synthétisés par l'équipe du Pr Liz NOLAN (MIT, USA).⁶⁶ Le complexe de Pt(IV) est prodrogue du Pt(II), toxique pour les bactéries. Les groupements acétyles sont clivés en milieu biologique pour générer l'agent antibactérien final : le cisplatine.

Les conjugués ferriques **19a** et **19b** sont reconnus par les voies de transport du fer Ent-dépendante chez *E. coli* et présentent tous deux une activité antibactérienne similaire à celle du cisplatine seul, mais sont moins toxiques pour les cellules humaines. D'autre part, le cycle trilactone de **19b** n'est pas reconnu par les estérases cytoplasmiques hydrolysant l'Ent **5** en DHBS (2,3-dihydroxybenzoyl sérine) et l'ion ferrique n'est ainsi pas libéré ni réduit en ion ferreux, élément nécessaire aux enzymes de réparation de l'ADN.

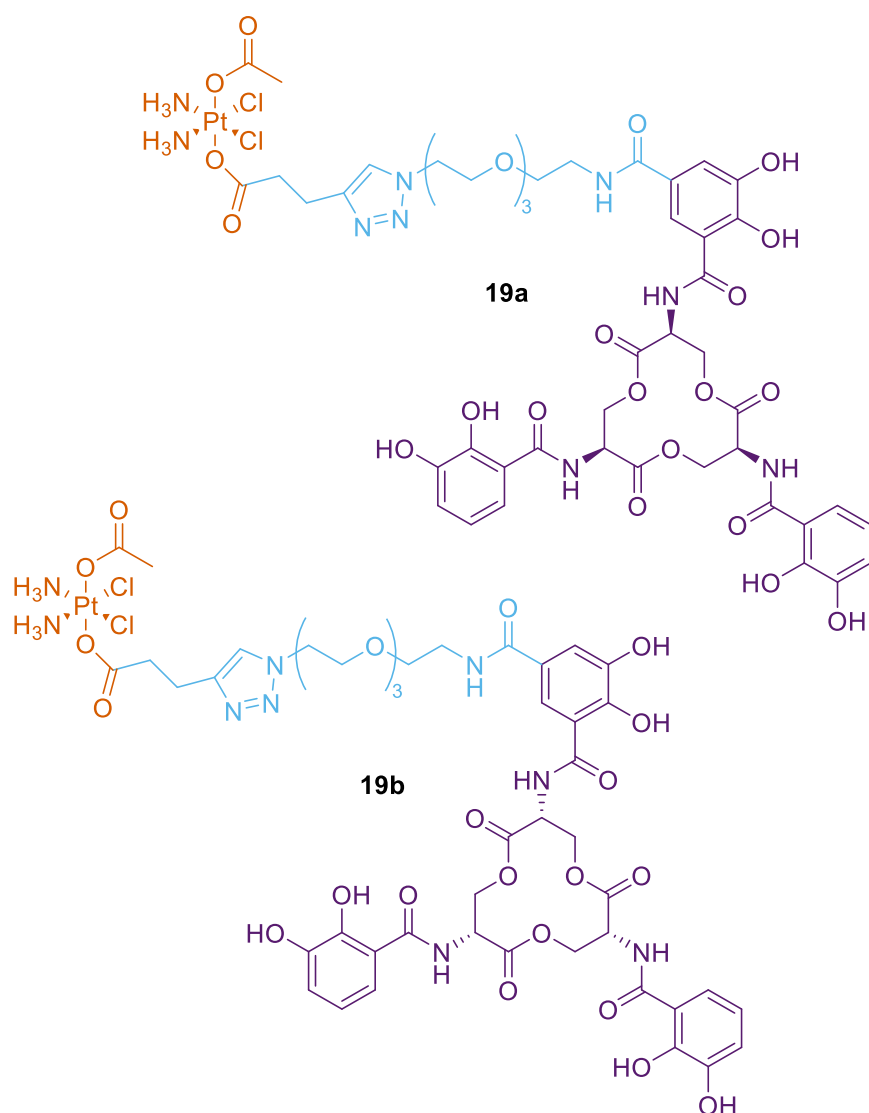


Figure 15. Structures des conjugués Ent-Pt(IV) **19a** et **19b**.⁶⁶ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et le métalloantibiotique en orange.

3. Conjugués sidérophore-Ru(IV)

Le dernier des trois seuls exemples de conjugués entre des sidérophores et des complexes métalliques est un peu particulier, car ce n'est, à priori, pas le complexe métallique qui possède un intérêt antibactérien immédiat. Une étude publiée en 2022 et menée dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire du Pr Anne-Kathrin DUHME-KLAIR (Université d'York, Royaume-Uni) et l'équipe du Pr Nils METZLER-NOLTE (Université de la Ruhr, Bochum, Allemagne) a montré qu'il est possible d'utiliser un conjugué sidérophore-complexe de ruthénium(IV) pour catalyser la conversion d'une prodrogue **20** de moxifloxacin en

l'antibiotique actif **21** (Schéma 1).⁶⁷ Les complexes sidérophore-Ru(IV) **22a-e** (Figure 16) permettent globalement d'obtenir un taux de conversion d'environ 90 % après 8 heures.

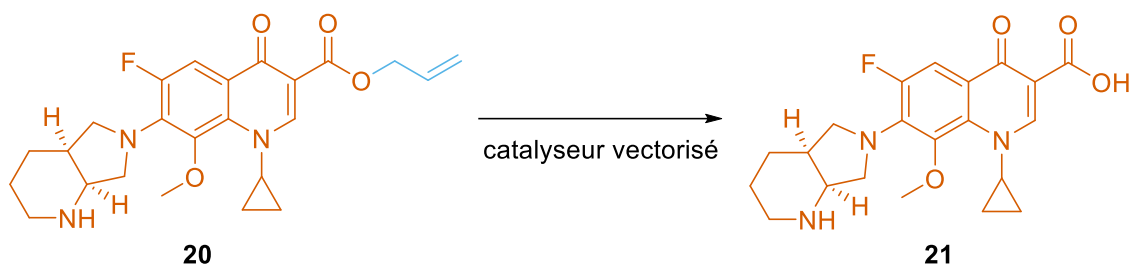


Schéma 1. Antibiotique **21** et sa prodroge **20**.⁶⁷ L'antibiotique est coloré en orange et le groupement protecteur en bleu.

Parmi les cinq complexes testés à une concentration de 10 μM (sans prodroge), seuls les complexes **22b** (sidérophore mono-catéchol) et **22d** (sidérophore azotochéline) engendrent une croissance bactérienne (*E. coli*) faible et importante respectivement, ce qui implique un import de ces conjugués dans la bactérie. Lors des expériences de co-addition (**20** + complexe, sur *E. coli*), l'activité antibactérienne mesurée est similaire à celle de l'antibiotique **21**, ce qui est d'autant plus remarquable dans le cas du complexe **22d**. Pour déterminer si l'activation de la prodroge **21** est réalisée de manière intracellulaire ou extracellulaire, une pré-addition de **21** a été effectuée, permettant un import de la prodroge dans la bactérie. Dans ces conditions, les complexes **22c**, **22d**, **22e** conduisent à une faible réduction de la croissance bactérienne alors que cette réduction est de 40 % avec le complexe **22b**, ce qui reste moins efficace que l'antibiotique **21**.

Ainsi, il semblerait que le complexe de ruthénium(IV) conjugué à un sidérophore mono-catéchol **22b** soit le meilleur parmi les cinq complexes testés. Il est intéressant de noter que ce type de sidérophore est similaire à celui du céfidérocol **10**. Bien que les résultats obtenus ne soient pas optimaux (activités antibactériennes plus faibles que celle de l'antibiotique **21**), cette stratégie a du potentiel et il devrait être possible d'obtenir un meilleur import du complexe de ruthénium(IV) en utilisant des sidérophores spécifiques à la bactérie ciblée.

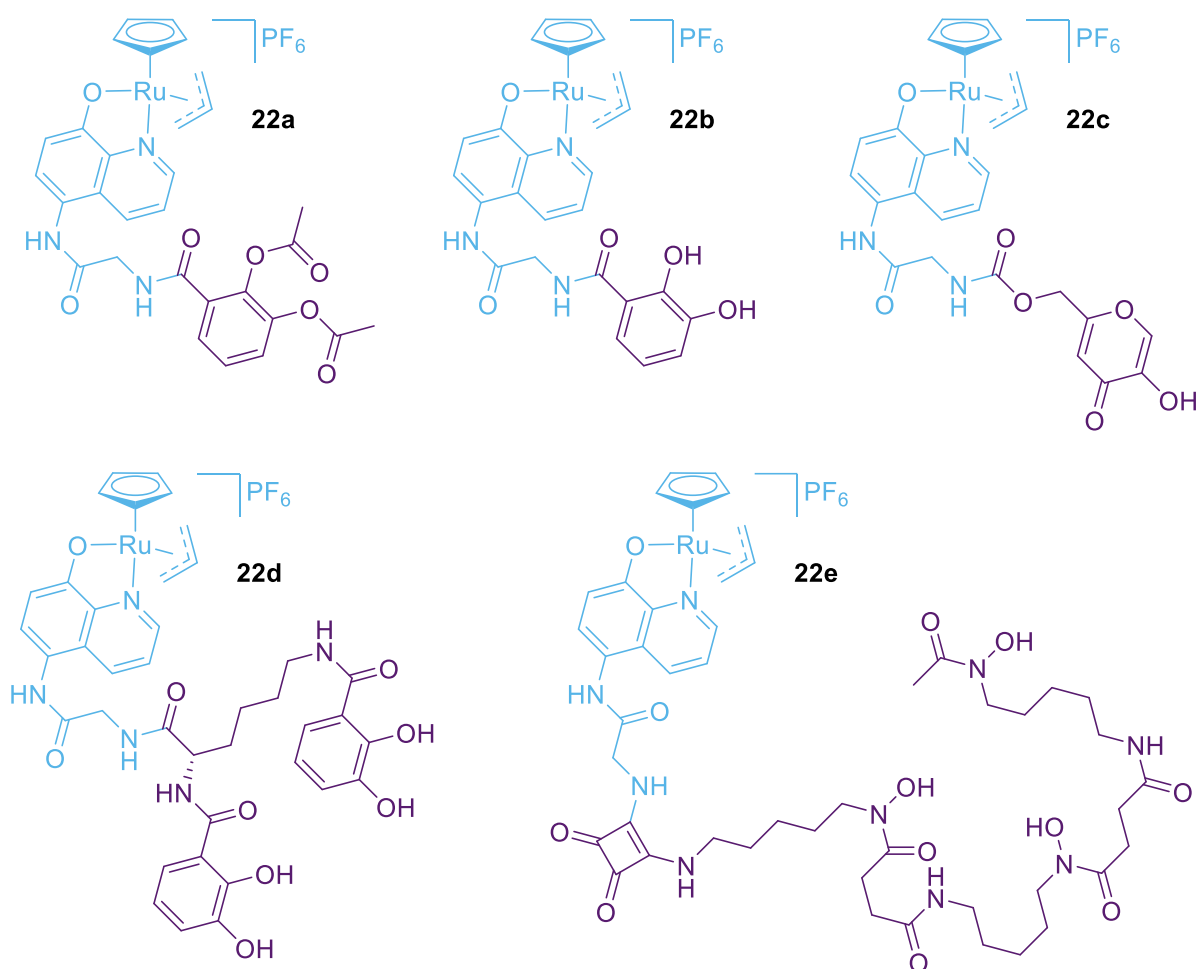


Figure 16. Structures des catalyseurs sidérophores-Ru(IV) **22a** à **22e**.⁶⁷ Le vecteur sidérophore est coloré en violet et le bras espaceur-complexe Ru(IV) en bleu.

Ces exemples apportent de nouvelles informations sur le potentiel offert par la vectorisation par les sidérophores bactériens :

- 1) Malgré les propriétés chimiques assez différentes des complexes vectorisés, ces molécules peuvent être internalisées dans les bactéries et avoir une efficacité avérée. **Cette stratégie**, mise au point pour des composés antibactériens purement organiques, **est donc parfaitement adaptable pour potentialiser l'action d'organométalliques**.
- 2) Les métaux sont toxiques pour les cellules procaryotes, mais aussi eucaryotes. **La vectorisation par les sidérophores semblent diminuer *in vitro* la toxicité des complexes pour les cellules humaines**. La faible pénétration des sidérophores dans les cellules eucaryotes et des mécanismes d'assimilation du fer différents (eucaryotes vs procaryotes) induisent sans doute une ségrégation dans la distribution des complexes métalliques.

La rareté des exemples de complexes métalliques vectorisés par les sidérophores, mais aussi le fait que ces travaux soient extrêmement récents, montrent que ce domaine est en pleine évolution et qu'il offre de grandes possibilités. Comme dans les exemples publiés par le Pr DYSON et le Pr NOLAN, notre projet vise à utiliser la toxicité intrinsèque du métal pour tuer les bactéries. Néanmoins, son aspect novateur réside dans le fait de vectoriser des complexes métalliques photoréactifs permettant ainsi d'avoir un effet antibactérien plus affirmé dans le cadre d'une approche par thérapie photodynamique antibactérienne.

Chapitre II – Thérapie photodynamique antibactérienne

A. Généralités

La combinaison de lumière avec des photosensibilisateurs (PS) pour éradiquer des cellules a été décrite pour la première fois au début de XX^e siècle.⁶⁸ La thérapie photodynamique (PDT) a été développée depuis les années 1960 pour tuer les cellules cancéreuses, mais ce n'est qu'en 1991 que le groupe du Pr Nancy OLEINICK a pu identifier l'induction d'apoptose par PDT pour détruire les cellules.⁶⁹ Ce n'est que plus récemment que cette approche a été envisagée pour lutter contre les infections bactériennes.

La PDT nécessite 3 composants : un PS, de la lumière et de l'oxygène. En général, l'utilisation de PS en présence de lumière du spectre visible au lieu de la lumière UV permet d'éviter les effets secondaires de cette dernière.⁷⁰⁻⁷³ De plus, utiliser des PS qui absorbent dans des plus hautes longueurs d'onde comme le rouge permet d'améliorer la pénétration de la lumière dans le tissu cellulaire.⁷⁴ Pour une efficacité optimale *in vivo*, la zone d'activation est communément admise entre 600 et 900 nm afin de permettre une pénétration de la lumière jusqu'à 10 mm.⁷⁴⁻⁷⁶ Une absorbance dans la lumière verte peut encore être possible dans certains traitements superficiels (jusqu'à 2 mm). Les sources de lumière utilisées jusqu'ici sont principalement des lasers et des lampes à incandescence, ces deux sources ayant des efficacités similaires.⁷⁷ Cependant, les lasers sont plus faciles à utiliser (durée de vie plus longue, dosimétrie automatisée, système de calibration) et peuvent maintenant être créés spécialement pour la PDT en les couplant avec une gaine afin de diriger la fibre optique vers la cible. L'utilisation des LEDs voit aussi le jour grâce à leur zone d'absorption restreinte et leur taux de fluence élevé (c'est-à-dire une densité de flux de particules élevée sur un intervalle de temps donné).⁷⁸

Le PS, sous l'effet de la lumière, génère des radicaux toxiques, le plus généralement des espèces réactives de l'oxygène (ROS).^{70,72} Les tissus normaux de l'hôte ne doivent donc pas, ou peu, accumuler le PS, c'est pourquoi la lumière est appliquée sur la zone à traiter

lorsque le PS atteint sa concentration maximale dans les tissus à éliminer tout en ayant une concentration minimale dans les tissus sains.⁷⁹ Les conditions de dosimétrie (dose totale de lumière, temps d'exposition à la lumière, mode d'éclairage) sont aussi très importantes.⁷⁵

Le principe de la PDT repose sur un transfert d'énergie entre le PS et la molécule de dioxygène. Le PS, dans son état fondamental S_0 , reçoit de l'énergie (photons) et passe à un état excité. Cet état S_1 , appelé état singulet dans lequel les électrons sont de spin opposés, est très instable et va donc transmettre l'énergie soit par fluorescence (retour à l'état fondamental S_0), soit par conversion intersystème pour conduire à un état triplet T_1 dans lequel les électrons sont de spin parallèle. Dans la majorité des cas, l'état triplet va transmettre son énergie à une molécule de dioxygène 3O_2 . Cette molécule a la particularité d'être sous sa forme d'état triplet à l'état fondamental. Le transfert d'énergie lui permettant de passer à l'état de singulet d'oxygène 1O_2 est appelé processus Type II. Cet état 1O_2 fait partie des ROS et, ayant un temps de vie très court, permettra un effet photodynamique uniquement sur les cellules environnant le PS. Il est aussi possible pour le PS dans son état T_1 de réagir avec à une molécule organique dans l'environnement cellulaire *via* un processus Type I, formant ainsi un radical. Il est considéré que la majorité des PS suivent un processus de Type II plutôt que Type I (**Figure 17**).⁷⁵

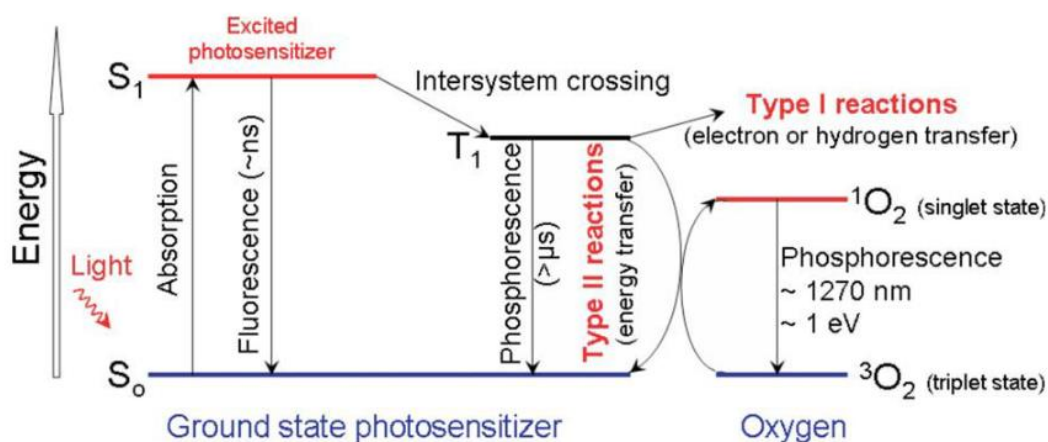


Figure 17. Processus de photosensibilisation illustré par un diagramme de Jablonski modifié. Extrait de Agostinis, P. et al., *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2011**, 61, 250–281.⁷⁵

Comme nous l'avons mentionné plus haut, il peut être difficile de cibler certaines zones du corps humain, car la lumière ne peut pas pénétrer profondément dans les tissus. Cependant, la PDT à 2 photons, technique en cours de développement, devrait pallier ce

problème. Ce système repose sur le même principe que la PDT à 1 photon, à la différence que 2 photons sont émis simultanément, chacun contribuant à la moitié de l'énergie nécessaire pour que le PS passe à son état excité.⁸⁰ Cela permet ainsi d'utiliser la lumière proche de l'infrarouge et d'atteindre une meilleure pénétration dans les tissus.⁸¹

Malgré les nombreux avantages de la PDT, elle est généralement utilisée cliniquement en complément d'autres techniques comme la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie dans le cas des cancers. Ce n'est que plus récemment que la PDT a été envisagée pour lutter contre les infections bactériennes plus accessibles à la lumière que les tumeurs.

B. Photosensibilisateurs pour la PDT antibactérienne

La PDT est bien moins développée contre les bactéries que contre les cancers, mais des applications antibactériennes utilisant la lumière ont cependant vu le jour durant ces dernières années, avec par exemple le traitement du biofilm bactérien dans le cas de maladies bucco-dentaires (caries dentaires, maladies parodontales),⁸² la suppression d'agents pathogènes provoquant des intoxications alimentaires,⁸³ l'inactivation de bactéries à Gram négatif multirésistantes dans les eaux polluées,⁸⁴ ou encore des vêtements et polymères auto-stérilisants inhibant les bactéries.⁸⁵

La chimiothérapie antimicrobienne photodynamique (PACT) combine les mêmes éléments que la PDT classique avec une combinaison d'un PS faisant office d'antibiotique en présence de lumière, afin de générer des ROS toxiques pour les bactéries. Ses avantages sont multiples⁸⁶ :

- Un large spectre d'action (bactéries, virus, champignons, parasites) ;
- Une activité phototoxique très efficace, y compris sur des souches multirésistantes aux antibiotiques ;
- Un faible risque de développement de résistance bactérienne à cette technique ;
- Une efficacité très rapide et localisée due à la formation d'oxygène singulet ayant une faible durée de vie.

Les PS communément utilisés dans le cadre de la PACT sont la chlorine e6 **23**, la phtalocyanine **24** complexée à un métal, la curcumine **25**, le bleu de toluidine **26**, le bleu de méthylène **27** et le rose Bengale **28** (**Figure 18**).⁸⁶ D'autres PS synthétiques sont aussi utilisés dans des stratégies de PACT, par exemple des PS glycosylés basés sur un motif BODIPY spécifiquement reconnus par *P. aeruginosa* et inhibant 90 % du biofilm de cette bactérie dans les conditions testées, sans affecter les cellules de l'hôte.⁸⁷

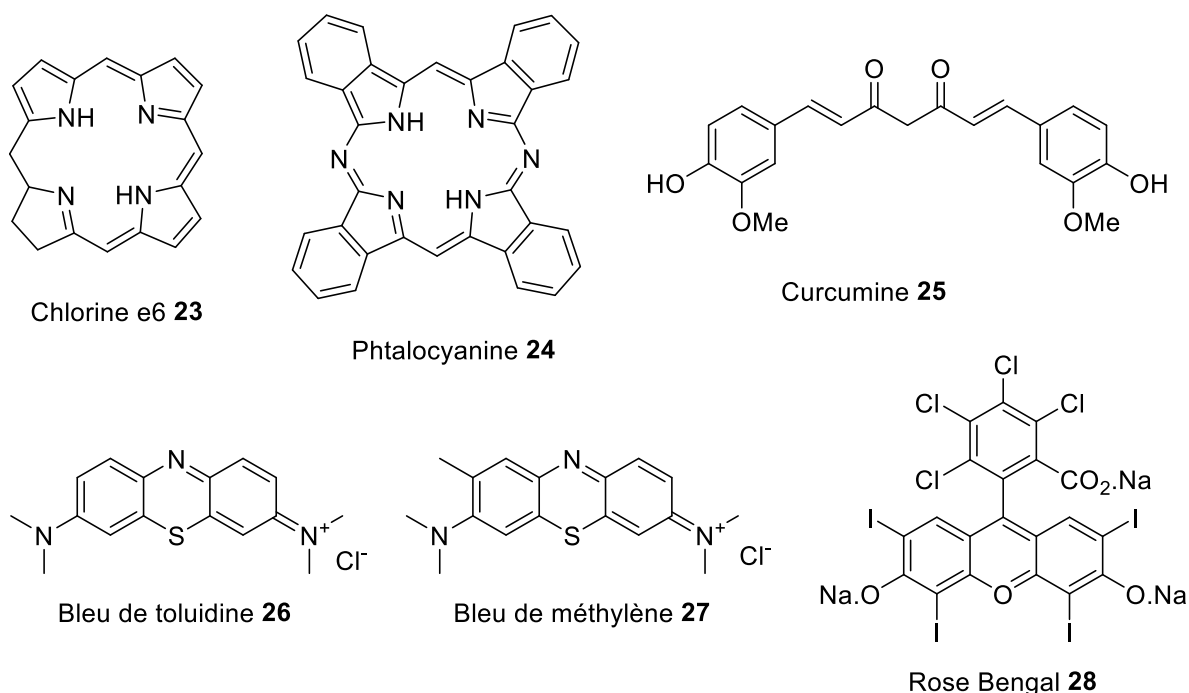


Figure 18. Structures de quelques PS communs.

Si l'utilisation de PS totalement organiques contre les bactéries a été la première option développée largement dans la littérature, l'utilisation de PS organométalliques est actuellement en plein essor. Au nombre des métaux les plus utilisés dans les PS organométalliques figurent le ruthénium et l'iridium, car en fonction des ligands, les complexes de ces deux métaux peuvent présenter une large palette de spectres d'absorption, notamment dans le visible. Les exemples suivants sont représentatifs et montrent le potentiel de ce type de molécules.

L'équipe du Pr Gilles GASSER (Chimie ParisTech, Université Paris Sciences & Lettres) a été la première équipe à tester des complexes de ruthénium(II) polypyridyl encapsulés dans des nanoparticules de polymère dans le cadre de la PDT antibactérienne.⁸⁸ Les nanoconjugués

ruthénium(II)-polylactide (PLA) **30a-e** ont été obtenus à partir du complexe de ruthénium(II) polypyridyl **29** (Figure 19, Tableau 1).

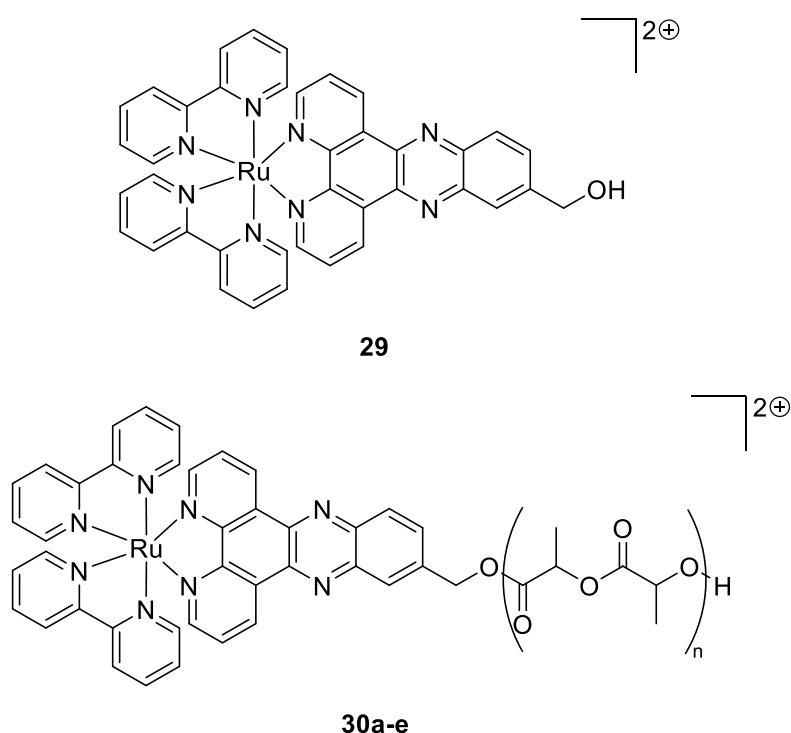


Figure 19. Structures du complexe de Ru(II) **29** et des nanoconjugués ruthénium(II)-polylactide **30a-e**.⁸⁸

Tableau I. Caractérisations macromoléculaires des nanoconjugués **30a-e**.⁸⁸

Nanoconjugué	Tacticité	$M_{n,RMN}$ ($g.mol^{-1}$)	% 29 wt%
30a	Atactique	7000	15
30b	Atactique	4000	25
30c	Isotactique	4000	25
30d	Atactique	2000	53
30e	Isotactique	7000	15

Les composés **29** et **30a-e** ont été testés sur deux souches de bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) et deux souches de bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*). Avec ou sans irradiation, ces cinq composés sont inefficaces à une concentration de 50 μ M sur les bactéries à Gram négatif. Cependant, sur les bactéries à Gram positif, en présence de lumière, les nanoconjugués **30a**, et particulièrement **30c** et **30e** présentent une activité antibactérienne (CMI = 12,5 μ M pour **30c** et **30e**). L'encapsulation du

complexe de ruthénium(II) **29** par des nanoparticules permet donc d'augmenter l'activité antibactérienne photoinduite de ce composé. D'autre part, des expériences de cytométrie de flux indiquent que, parmi les cinq nanoconjugués, **30e** est celui interagissant le plus avec les bactéries, bien que cette interaction reste plus faible dans le cas des bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa*) comparés aux bactéries à Gram positif. Néanmoins, ces expériences ne permettent pas de conclure sur l'import des nanoconjugués dans les bactéries. Ces travaux ouvrent la voie à l'utilisation de conjugués entre des complexes de ruthénium(II) polypyridyl et des nanopolymères dans le cadre de la PDT antibactérienne.

L'équipe du Dr Tony LE GALL en collaboration avec l'équipe du Pr Gilles LEMERCIER ont montré que des complexes de ruthénium(II) dont les ligands sont de type 10-phénanthroline (Phen), ont des propriétés photophysiques et photochimiques ainsi que des activités biologiques variables, en fonction des substituants sur les ligands du complexe.⁸⁹ Sur les 17 composés testés, seuls 6 d'entre eux, les plus représentatifs, ont été choisis dans ce manuscrit (**Figure 20**).

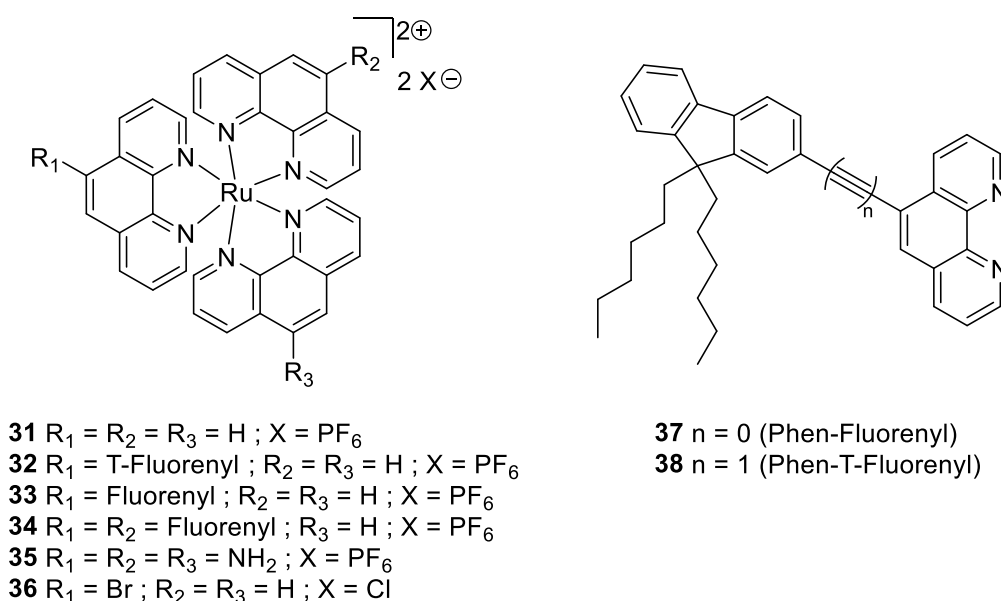


Figure 20. Structures des complexes de Ru(II) **31** à **36**, ainsi que les ligands Phen **37** et **38**.⁸⁹

La structure asymétrique du complexe permettrait d'obtenir une phototoxicité antibactérienne élevée. En effet, les complexes mono- (**32**, **33**) et bis- (**34**) fonctionnalisés ont une meilleure activité antibactérienne que ceux tris-fonctionnalisés (non représentés ici). De plus, sur tous les complexes testés, **33** est le meilleur agent antibactérien, même sans ajout de lumière, y compris sur une souche de *S. aureus* résistante à la méthiciline (MRSA),

probablement dû à l'effet de la lumière ambiante et/ou à un effet indépendant de la PDT. Le complexe **32** a une activité antibactérienne moyenne sans lumière sur MRSA, qui augmente nettement en présence de lumière. Sous irradiation lumineuse d'intensité moyenne et avec 10 μM de complexes, **32** et **33** sont efficaces sur toutes les souches de *S. aureus* (une de laboratoire, trois cliniques dont deux MRSA), mais aussi sur des bactéries à Gram négatif (une souche de laboratoire de *E. coli*, trois souches cliniques de *P. aeruginosa*), alors que **36** est principalement actif sur une seule des souches cliniques de *P. aeruginosa*. Concernant **34**, ce complexe, ne présentant aucune activité sans lumière sur MRSA, est cependant particulièrement efficace sur cette souche lors de l'ajout de lumière. Ainsi, la structure chimique des complexes influence l'activité sur une ou plusieurs espèces/souches bactériennes.

De manière intéressante, les complexes **35** et **36** ayant la meilleure production d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (ROS) n'étaient pas ceux avec la meilleure activité PDT antibactérienne (**32**, **33**, **34**), ce qui suggérerait l'implication de paramètres supplémentaires pour déterminer l'activité antibactérienne des complexes de ruthénium(II) (par exemple la toxicité intrinsèque du métal).

Enfin, les complexes ont été testés pour leur phototoxicité sur des cellules eucaryotes sous irradiation lumineuse, et seuls **32** et **33** présentent une toxicité dans ces conditions.

Cet article montre que certains des complexes de ruthénium(II) sont efficaces dans le cadre de la PDT antibactérienne, à faibles concentrations, et en présence de lumière (courte durée, intensité importante, 1 à 3 irradiations successives), sur des souches cliniques résistantes, laissant entrevoir une application clinique potentielle. En 2022, quatre ans après les travaux cités précédemment, ces deux équipes ont publié des résultats complémentaires, concernant l'application des complexes **31** (Figure 20) et **39** (Figure 21) en PDT antibactérienne dans le cas de la mucoviscidose.⁹⁰

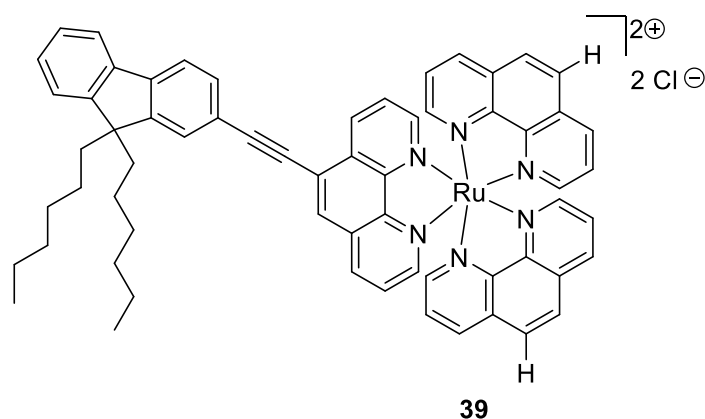


Figure 21. Structure du complexe de Ru(II) **39**.⁹⁰

Ces travaux montrent que l'absorption dans le spectre UV-visible de **31** et **39** n'est pas, ou peu, modifiée entre un milieu aqueux et un milieu salin (dont la concentration en NaCl est similaire à celle rencontrée les voies respiratoires d'un patient atteint de mucoviscidose). Sous irradiation lumineuse, les deux complexes de ruthénium(II) entraînent une inactivation de la souche de laboratoire de *S. aureus* et de la souche clinique multi-résistantes de *P. aeruginosa*, soit en cultures séparées ou en co-culture. De plus, l'effet antibactérien en PDT de **31** et **39** suggère que la diffusion des ROS n'est pas empêchée par l'épaisseur du biofilm de *P. aeruginosa*. Cependant, cet effet de **31** reste moindre lors de l'ajout du complexe après la formation du biofilm, comparé à l'ajout avant la formation du biofilm, où l'activité est importante chez *P. aeruginosa* dans ce cas. Cela est dû à la capacité limitée du complexe de ruthénium(II) de diffuser dans le biofilm pour atteindre les bactéries, à l'image de ce qui se passe pour de nombreux antibiotiques. Si cette limitation était contournée, ce complexe pourrait trouver une application en PDT très prometteuse, à différentes étapes de croissance de la bactérie. Par ailleurs, **39** n'est pas phototoxique sur des cellules eucaryotes, plus exactement des cellules épithéliales bronchiques humaines génétiquement modifiées, cultivées avec des bactéries.

L'iridium(III), bien que moins soluble que le ruthénium(II) dans les milieux aqueux, a des propriétés photophysiques et photochimiques le rendant très intéressant pour la PDT. La charge positive de complexes d'iridium(III) permet d'augmenter sa solubilité par rapport à des PS de type porphyrine ou phtalocyanine. De plus, l'iridium(III) peut devenir un excellent PS, car son état excité triplet est très sensible à l'oxygène et donc très propice à créer des ROS avec un rendement quantique approchant parfois 1,0.⁹¹

HO *et al.* ont travaillé sur des complexes d'iridium(III) comportant deux ligands C^N (2-phénylpyridine **40**, 1-phénylisoquinoline **41** ou 2-phénylquinoline **42**) et d'un co-ligand N^N bidentate (**Figure 22**).⁹² Les complexes d'iridium(III) **41** et **42** ont une absorption décalée dans le rouge du spectre visible (comparé à **40**), ce qui leur permet d'être utilisés dans le cas de la PDT, comme nous l'avons mentionné précédemment.

Sous lumière blanche, *in vitro*, **41** est capable d'éradiquer à la fois des bactéries à Gram positif (*S. epidermidis*) et des bactéries à Gram négatif (*E. coli*), alors que **40** et **42** ont une activité antibactérienne réduite dans les mêmes conditions. **41** et **42** ont pourtant le même spectre d'absorption dans l'UV-visible et génèrent la même quantité de ROS en solutions, ce qui suggère que les interactions spécifiques entre les PS et les bactéries auraient donc un rôle critique dans le cas de la PDT antibactérienne. De plus, après activation photodynamique, le complexe d'iridium(III) fait des dégâts significatifs et irréversibles sur l'enveloppe des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, montrant que ces composés semblent s'accumuler plutôt dans les membranes sans pouvoir pénétrer efficacement dans les bactéries, notamment à Gram négatif.

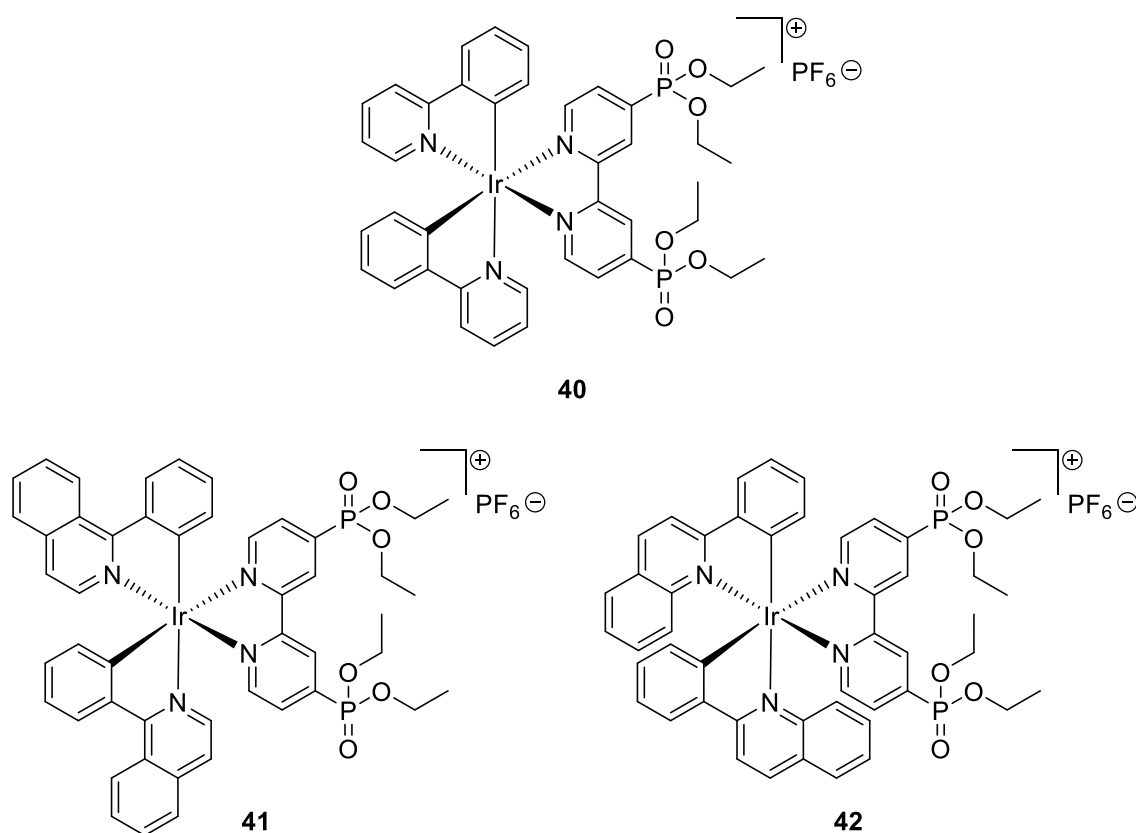


Figure 22. Structures des complexes d'Ir(III) **40**, **41** et **42**.⁹²

Cette problématique de pénétration à travers les membranes des bactéries à Gram négatif est donc commune aux antibiotiques organiques et aux métalloantibiotiques, PS organométalliques compris.

Dans un travail pionnier, l'équipe d'accueil MMBCA en collaboration avec l'équipe du Dr Sylvain GAILLARD et du Pr Jean-Luc RENAUD (LCMT, ENSICAen) a été l'une des premières à envisager la vectorisation de complexes d'iridium(III) par des nutriments. Ainsi, 3 complexes d'iridium(III) comportant deux ligands 1-phénylisoquinoline (piq) et un ligand 2,2'-dipyridylamine (dpa) substitué en position *N* par un méthyle **43**, la biotine **44** ou *p*-nitrophényl glycoside **45** (**Figure 23**), ont été synthétisés et testés sur *P. aeruginosa* PAO1 en présence de lumière bleue (LED).⁹³

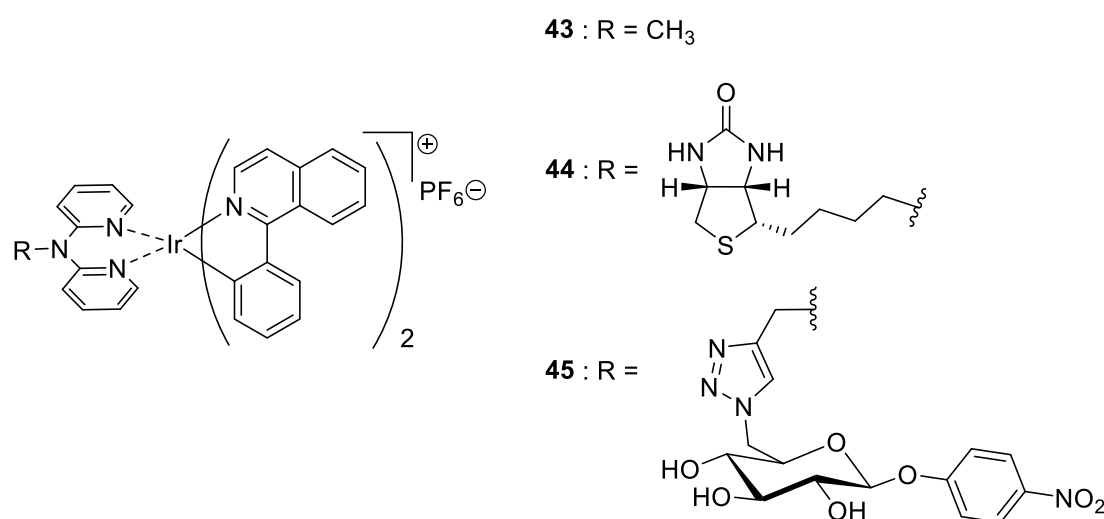


Figure 23. Structures des complexes d'Ir(III) **43**, **44** et **45**.⁹³

Sur *P. aeruginosa* PAO1 et sans ajout de lumière, le composé **45** ne présente pas d'activité antibactérienne (CMI $\geq$ 64 mg/L) et **43** a une activité antibactérienne modérée (CMI = 32 mg/L). En revanche, le conjugué Ir(III)-biotine **44** est extrêmement efficace avec une CMI = 4 mg/L, ce qui, à cette époque, en faisait un des meilleurs complexes d'iridium(III) actif sur *P. aeruginosa*. Pour comparaison, la tobramycine, antibiotique utilisé notamment chez les patients atteints de mucoviscidose, a une CMI = 8 mg/L dans les mêmes conditions.⁹³

Cependant, lors de l'irradiation lumineuse, le taux de survie des bactéries est réduit de manière drastique pour les composés **43** et **45** et de manière plus modérée pour le composé **44**. Ainsi, le substituant sur la dpa semble grandement influencer l'activité bactérienne du complexe, en présence et en l'absence de lumière.

La majorité des bactéries sont en mesure de produire la biotine dont elles ont besoin. De façon assez paradoxale, certaines de ces mêmes bactéries comme *E. coli*, *Salmonella thyphmurium* ou même *P. aeruginosa* possèdent des systèmes de transport pour ce nutriment. Ces systèmes d'acquisition ont d'ailleurs déjà été exploités pour importer efficacement des peptides dans ces bactéries.⁹⁴ Ces systèmes de transport sont par contre loin d'être ubiquitaires ou d'une efficacité comparable, y compris parmi les souches d'une même espèce bactérienne.⁹⁵ Cet exemple fondateur montre de façon implicite, tout l'intérêt d'une vectorisation des complexes d'iridium(III) par les sidérophores transportant un nutriment essentiel, ubiquitaire et non métaboliquement substituable.

Nos travaux se sont ainsi principalement focalisés sur la vectorisation de ces complexes d'iridium(III) par le sidérophore desferrioxamine et par des sidérophores catécholés. Les résultats obtenus constituent l'essentiel du présent manuscrit.

Partie II – Résultats et discussion

Chapitre I – Synthèse et propriétés des conjugués desferrioxamine-Ir(III)

A. Propriétés du sidérophore desferrioxamine **46** chez *P. aeruginosa*

Comme nous l'avons mentionné dans la synthèse bibliographique (Partie I – Chapitre I – G. 1), la desferrioxamine (DFO) **46** a été le premier sidérophore utilisé pour vectoriser un complexe de métal non biologique, en l'occurrence un complexe de ruthénium(II).⁶⁴ Les conjugués DFO-Ru(II) synthétisés dans ces travaux ont à la fois une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et une sélectivité discrète par rapport aux cellules humaines en culture.

Il nous a donc paru essentiel de débiter ce travail en utilisant ce sidérophore, commercial, peu onéreux et déjà fonctionnalisé (**Figure 24**).

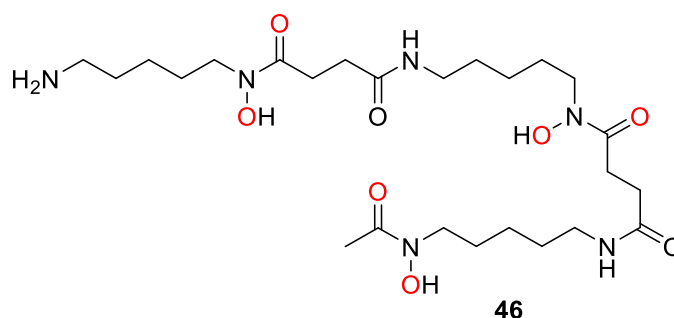


Figure 24. Structure de la DFO **46**. Les hétéroatomes impliqués dans la chélation du fer(III) sont colorés en rouge.

La DFO **46** a une grande affinité pour le fer : 10^{30} M^{-1} .⁹⁶ Ce sidérophore est non biosynthétisé, mais utilisable par *P. aeruginosa*. En effet, il a été montré qu'il existe deux transporteurs TonB-dépendant impliqués dans l'import de complexes DFO-Fe(III) chez *P. aeruginosa* et ainsi permettant l'acquisition du fer par la bactérie (**Figure 25**). Le premier transporteur est FoxA qui peut aussi transporter la nocardamine (NOCA ou desferrioxamine E).⁹⁷ Plus récemment, un second transporteur, FpvB, qui est le transporteur

secondaire de la pyoverdine **4** a été proposé pour le transport du ferrichrome **6** et de la DFO **46**.⁹⁸ Le complexe ferrique de DFO est reconnu par ses transporteurs de membrane externe et transféré dans le périplasma grâce à l'énergie fournie par la machinerie TonB. Dans le cas de FoxR, un système de régulation (FoxR, FoxI) permet l'expression du transporteur lorsque le sidérophore est détecté dans le milieu extracellulaire (**Figure 25**).

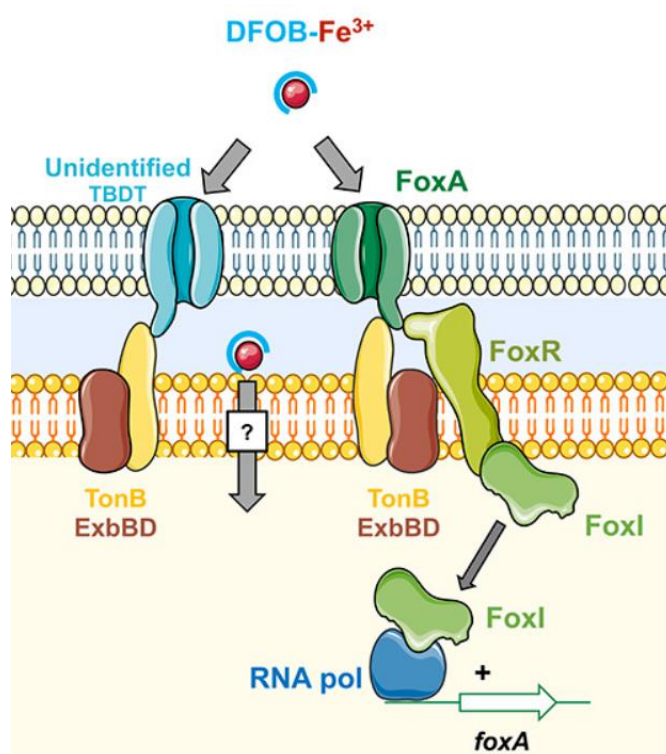


Figure 25. Modèle proposé du système du transport du fer DFO-dépendant. Le second transporteur n'était pas identifié à la date de publication de cet article. Modifié de Normant et al., *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 2741–2751.⁹⁷

De plus, la DFO **46** ainsi que la NOCA ont pu être co-cristallisées avec FoxA montrant ainsi les interactions entre les sidérophores et leur transporteur (**Figure 26**, **Figure 27**).^{97,99} Ainsi, nous espérons que nos conjugués DFO-Ir(III) auront une interaction similaire avec FoxA.

Débuter notre projet en utilisant la DFO **46** présenté aussi un avantage : c'est un composé commercial, peu onéreux et déjà fonctionnalisé. Ce sidérophore est donc un bon modèle pour mettre au point la chimie nécessaire pour atteindre nos objectifs.

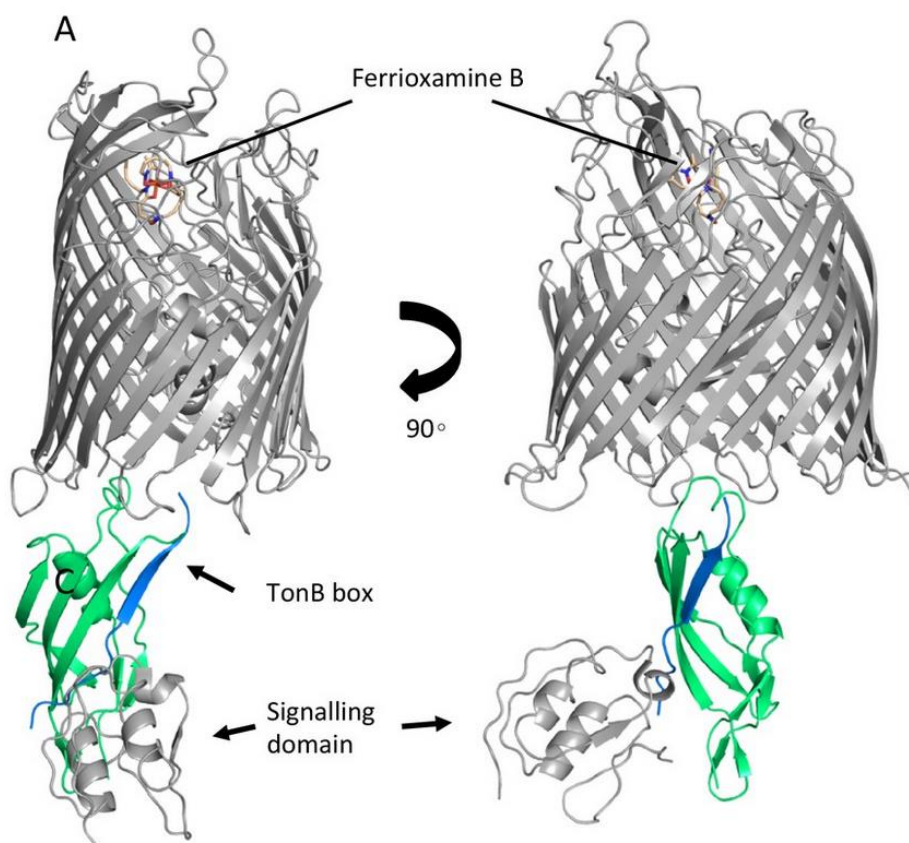


Figure 26. Vue d'ensemble du complexe FoxA-DFO avec la fraction périplasmique de la protéine TonB. Le transporteur FoxA est en gris. Modifié de Josts et *al.*, *eLife* **2019**, 8, e48528.⁹⁹

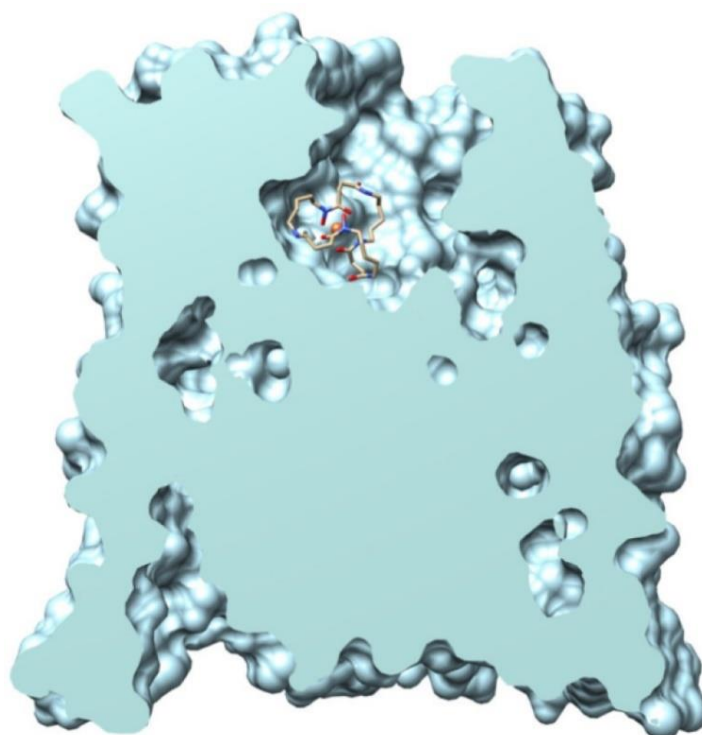


Figure 27. Vue sagittale de FoxA en complexe avec Fe(III)-NOCA. Modifié de Normant et *al.*, *ACS Chem. Biol.* **2020**, 15, 2741–2751.⁹⁷

B. Rétrosynthèse

Dans le cas de la DFO **46**, nous avons choisi de lier le complexe d'iridium(III) au sidérophore, soit par un bras espaceur court (**Schéma 2**), soit par un bras espaceur plus long (**Schéma 3**). Ces deux stratégies ont un synthon commun : une dipyridylamine (dpa) fonctionnalisée **51** obtenue à partir de la dpa commerciale **52**.

Dans la première approche, les conjugués **47a** et **47b** attendus sont obtenus par coordination de l'iridium(III) sur une DFO fonctionnalisée **49** dotée d'un bras espaceur de type di(pyridin-2-yl)glycine. Nous avons aussi envisagé la synthèse des conjugués **48a** et **48b** dont les fonctions hydroxamates sont protégées par des groupes acétyles (Ac) et cela à partir de la DFO fonctionnalisée par une dpa (**Schéma 2**).

Dans la seconde approche, le conjugué **53** possédant un bras espaceur plus long entre le sidérophore et le complexe d'iridium(III) est obtenu à partir d'un ligand **54** résultant d'une réaction de chimie click entre une DFO propargylée **56** et un azoture **55**. Cet azoture est dérivé de la dpa **51** (**Schéma 3**).

Comme le montre ces rétrosynthèses, la dpa **51** ainsi que l'azoture **55** sont des composés clés de nos différentes voies d'accès aux conjugués recherchés.

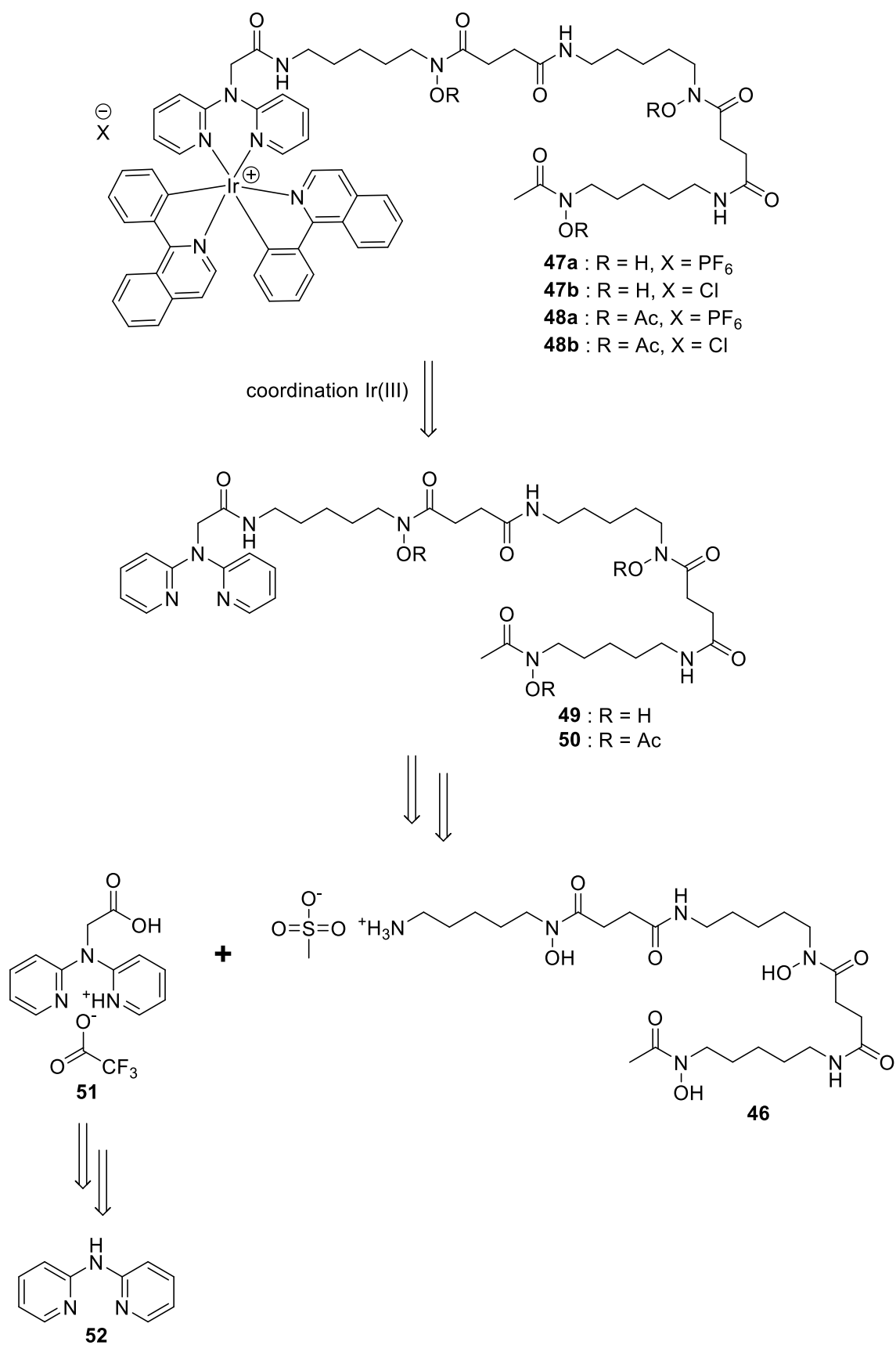


Schéma 2. Rétrosynthèse des conjugués **47a,b** et **48a,b** entre les DFO et un complexe d'Ir(III).

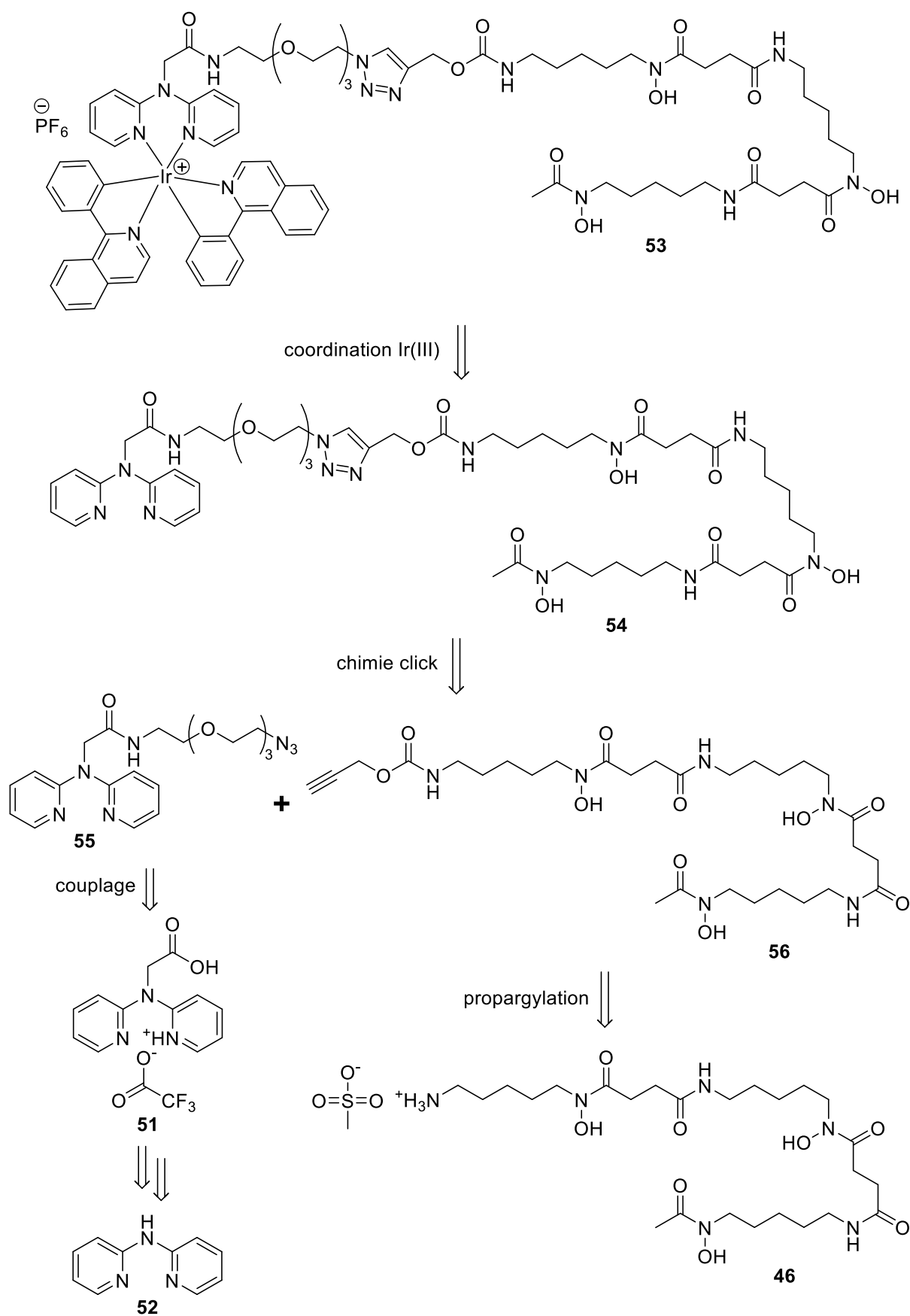


Schéma 3. Rétrosynthèse du conjugué **53** entre la DFO et un complexe d'Ir(III).

C. Synthèse et propriétés des dérivés dpa et de leurs complexes d'Ir(III)

1. Synthèse de la dpa 51

La première étape de synthèse utilise un protocole basé sur la littérature.^{100,101} Elle consiste à alkyler l'amine de la dpa commerciale **52** grâce à un dérivé bromé et en présence d'une base forte dans du DMSO. L'ajout du dérivé bromé est réalisé goutte à goutte et à 15 °C afin d'éviter la saponification de l'ester. Le ligand dpa **57** est ainsi obtenu avec 88 % de rendement. L'ester *t*-butylique est traité ensuite par une solution de TFA dans du DCM (20 % v/v) afin d'obtenir la dpa acide **51** avec 82 % de rendement (**Schéma 4**). Cette molécule est obtenue sous la forme d'un sel de trifluoroacétate, ce qui est confirmé par la RMN du fluor.

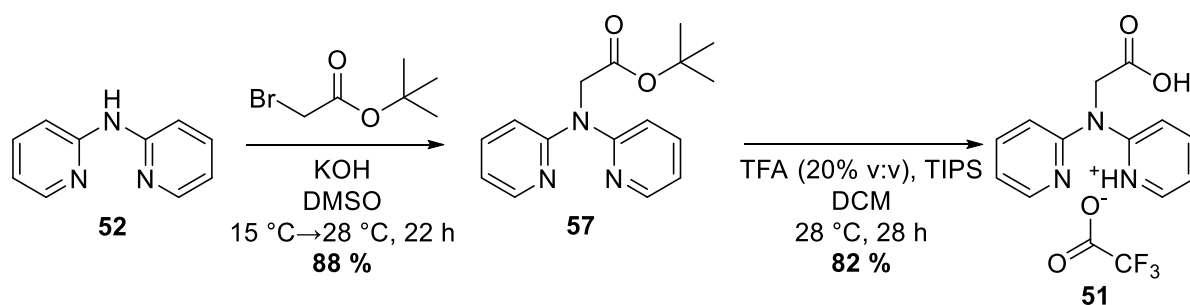


Schéma 4. Synthèse du ligand **51**.

2. Synthèse de l'azoture 55

La dpa acide **51** obtenue précédemment est mis en réaction avec le 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthan-1-amine commercial **58** en présence de DIPEA et EDC.HCl dans du DCM en s'inspirant d'une procédure décrite dans la littérature.¹⁰² Le ligand dpa **55** est ainsi obtenu avec 77 % de rendement (**Schéma 5**). Nous avons ensuite tenté de coordiner l'iridium(III) aux dérivés dpa **55** et **57**.

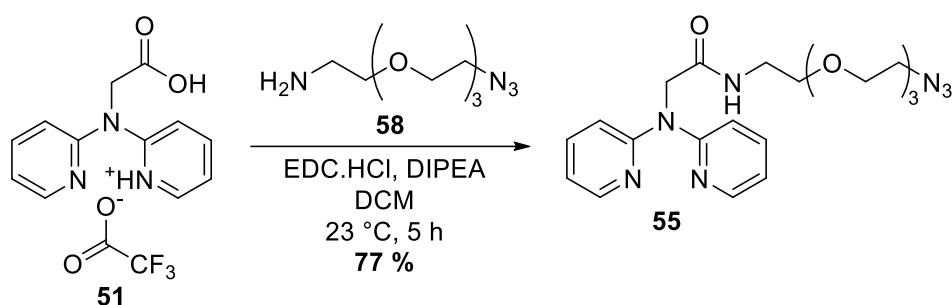


Schéma 5. Synthèse du ligand **55**.

3. Synthèse des complexes d'Ir(III) des dérivés **55** et **57**

Afin de valider les conditions de coordination de l'iridium(III) sur ce type de dpa *N*-fonctionnalisée, nos collaborateurs du LCMT à Caen (Pr Jean-Luc RENAUD, Dr Sylvain GAILLARD, Julien RENAULT) ont fait réagir les dpa **57** et **55** avec le dimère d'iridium(III) **59** (**Schéma 6**) selon la réaction de Nonoyama.¹⁰³

Les complexes **61** et **62** ont été obtenus avec des rendements moyens, respectivement 51 % et 30 %. Par comparaison, le complexe **60**, synthétisé pour servir de référence notamment dans les tests biologiques ultérieurs, a été obtenu avec 92 % de rendement (**Schéma 6**). Ainsi, nous pouvons supposer que la taille du substituant sur le ligand dpa a une influence sur le rendement de cette étape. Par contre, la coordination de l'iridium(III) directement à la dpa glycine **51** n'a pas été possible, probablement à cause de la forme saline (sel de trifluoroacétate) de cette molécule.

Ces données montrent donc que nos ligands dpa sont en mesure de complexer l'iridium(III) suivant un protocole robuste et reproductible. Avant d'aller plus loin dans une synthèse complexe, nous avons voulu montrer que les complexes d'iridium(III) non vectorisés présentent bien les propriétés antibactériennes recherchées.

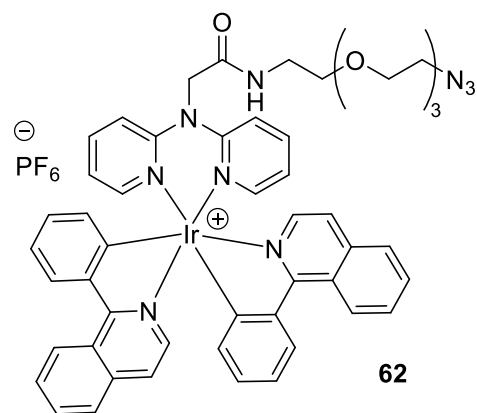
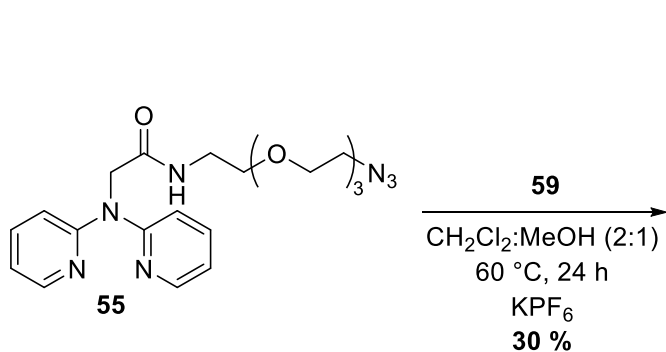
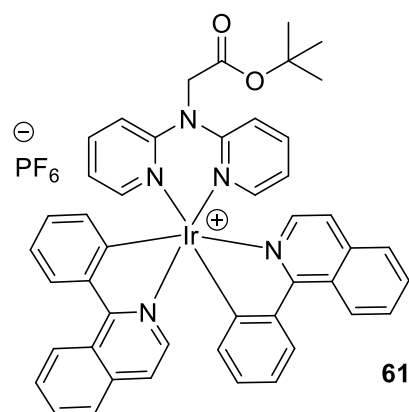
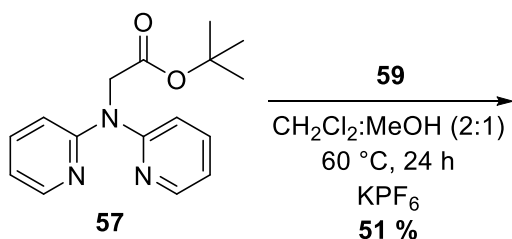
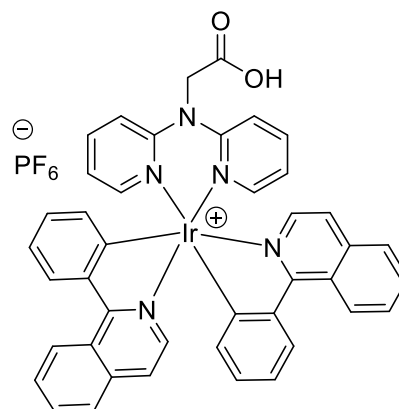
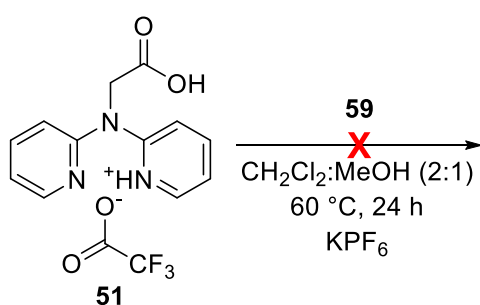
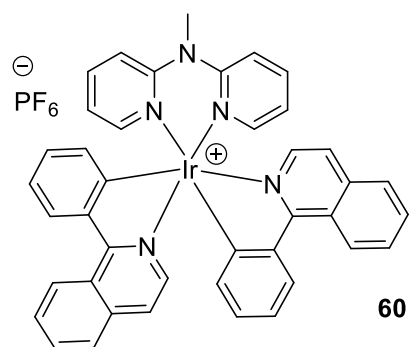
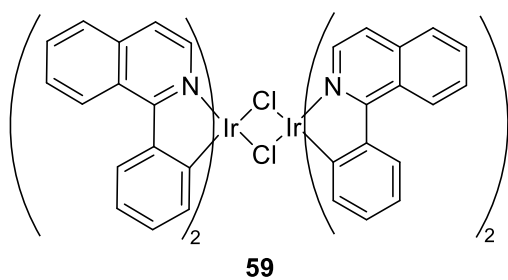


Schéma 6. Structures du dimère **59** et du complexe **60**, et synthèse des complexes d'iridium(III) **61** et **62**.

4. Évaluation de l'activité antibactérienne des complexes d'Ir(III) non vectorisés

Des expériences pour déterminer les CMI de nos composés ont été effectuées par Julie COUCHOT dans l'équipe du Pr Patrick PLÉSIAT (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Service de Bactériologie, CHU de Besançon). Ces expériences ont été réalisées sur 4 souches de laboratoire (une à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (SA) ; trois à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA), *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC) et *Acinetobacter baumannii* CIP7010 (AB)), dans un milieu Mueller-Hinton, soit sans lumière, soit sous lumière bleue (452 nm, 387,8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$), verte (525 nm, 238,2 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) ou rouge (631 nm, 320 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) à l'intensité minimale de la lampe, dans un photoincubateur (lampe combinée à un bain marie à 37°C), optimisé dans le cadre de ce projet (**Figure 28**).



Figure 28. Photoincubateur utilisé pour la détermination de CMI (ici en lumière bleue).

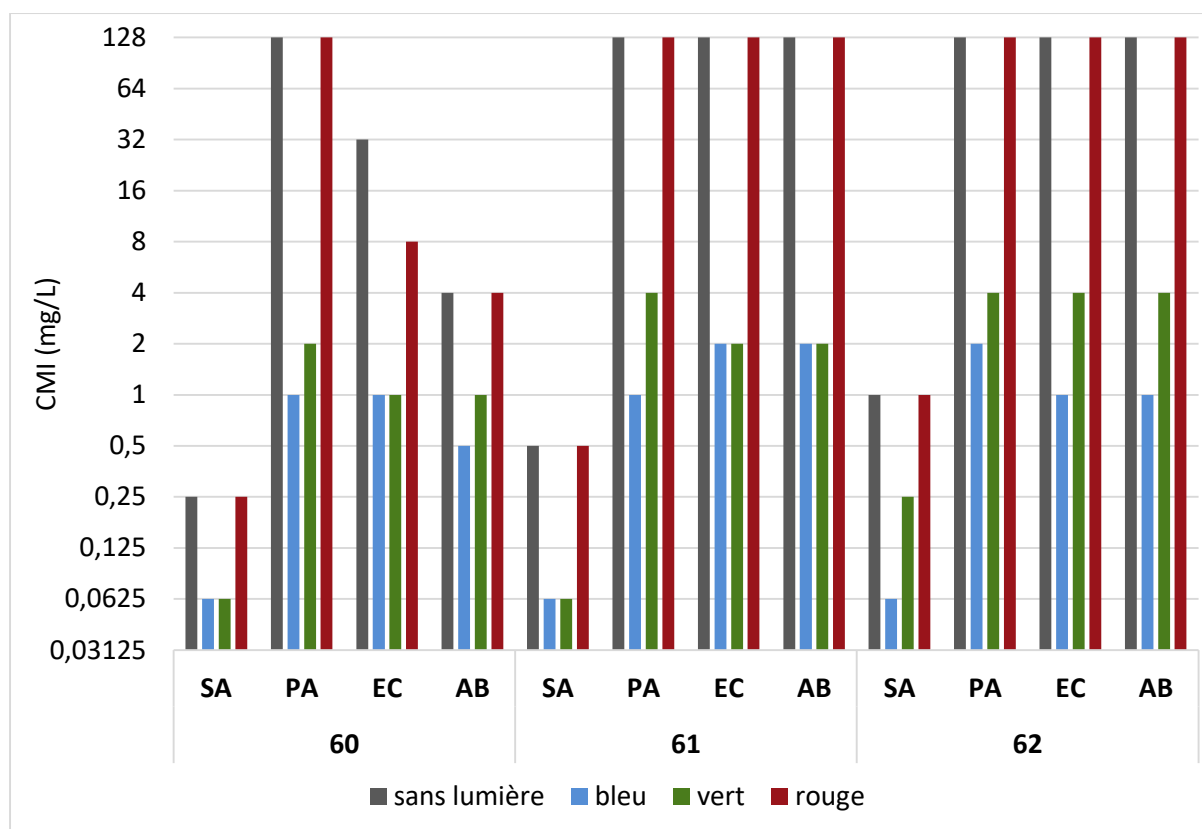


Figure 29. CMI des composés **60**, **61** et **62**. Le graphique ne prenant pas en charge les symboles ">" et "≤", les valeurs "128" et "0,0625" sont en réalité "> 128" et "≤ 0,0625" respectivement. Les résultats ont été obtenus en réplicats biologiques (n = 3).

Les trois complexes d'iridium(III) **60**, **61** et **62** sont efficaces contre la bactérie à Gram positif *S. aureus* en l'absence de lumière (CMI = 0,25-1 mg/L) traduisant une activité antibactérienne intrinsèque liée à la toxicité de l'iridium(III), métal non biologique. Cette efficacité est accrue en présence des lumières bleue ou verte (CMI ≤ 0,0625 mg/L). En revanche, sur les bactéries à Gram négatif, **61** et **62** n'ont aucune activité en l'absence de lumière ni en présence de lumière rouge (CMI ≥ 128 mg/L). **60** a cependant une activité antibactérienne modérée sur EC et AB dans ces conditions (CMI = 4-32 mg/L). Néanmoins, en présence de lumières bleue ou verte, les trois composés ont une activité antibactérienne importante (CMI = 2 mg/L en moyenne) (**Figure 29**).

Les différences observées entre la lumière rouge et les lumières bleue et verte s'expliquent par le fait que ces complexes d'iridium(III), de par les ligands qui les entourent, ont des maxima d'absorption situés dans le spectre du bleu et celui du vert principalement (**Figure 30**).

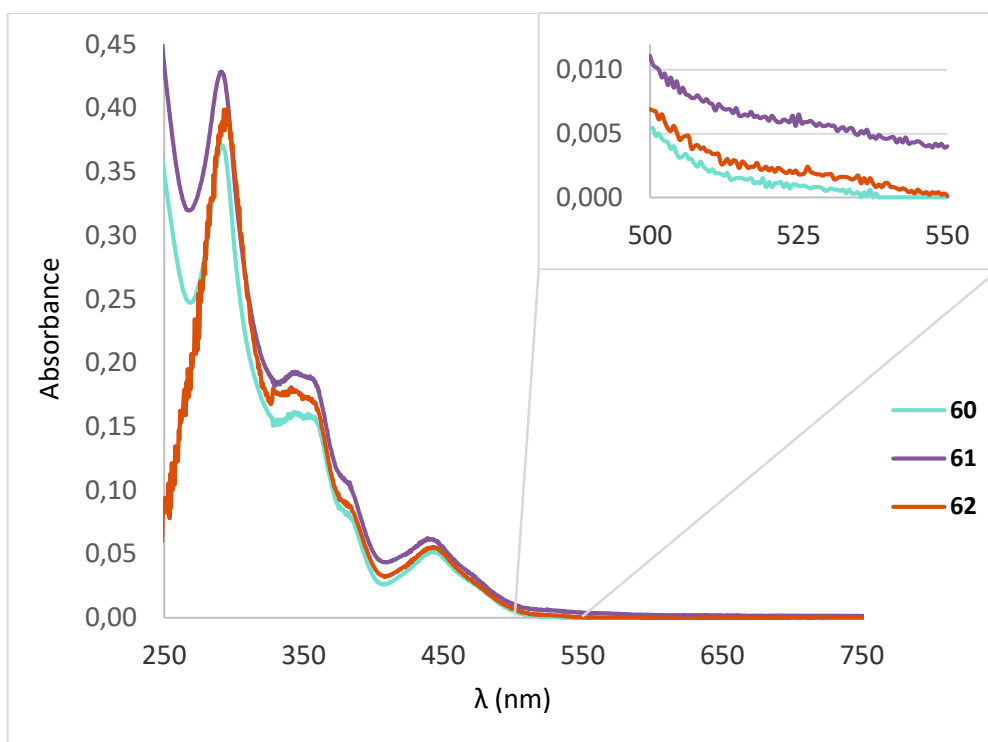


Figure 30. Spectres d'absorption des complexes **60** en cyan ($\lambda_{\text{max}} = 292, 344, 353, 381, 442 \text{ nm}$), **61** en violet ($\lambda_{\text{max}} = 292, 342, 355, 383, 439 \text{ nm}$) et **62** en orange ($\lambda_{\text{max}} = 293, 341, 354, 383, 443 \text{ nm}$). Un zoom du spectre entre 500 et 550 nm est représenté en haut à droite.

L'absence d'activité antibactérienne notable de nos complexes en l'absence de lumière chez les pathogènes à Gram négatif montre tout l'intérêt de procéder à la vectorisation de ces complexes afin d'accroître leur potentiel thérapeutique.

D. Synthèse des conjugués DFO-dpa

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la DFO semble être le sidérophore adéquat pour valider notre approche du point de vue de la synthèse.

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur la synthèse d'un conjugué DFO-dpa possédant un bras espaceur court. Nous nous sommes d'abord inspiré de la littérature et avons couplé la DFO **46** commerciale au ligand dpa **51** en présence de CDI et DIPEA dans un mélange DMF/DMSO.⁶⁴ Le brut réactionnel a été analysé par LC/MS, mais le produit attendu n'a pas été détecté. Le protocole a été modifié pour utiliser des conditions utilisées classiquement dans notre équipe¹⁰² : EDC.HCl comme agent de couplage, en présence de DIPEA, et la DMF comme seul solvant. Dans ces conditions, le conjugué DFO-dpa **49** a été

obtenu avec 91 % de rendement. Au cours des synthèses utilisant la DFO, nous avons rencontré des difficultés de purification liées à la polarité de cette molécule. Nous avons donc décidé de développer en parallèle une version **50** de la DFO conjuguée à la dpa, dont les fonctions hydroxamates sont masquées par un groupe acétyle (Ac). Ce dernier à l'avantage d'être clivable biologiquement (prodrogue). Dans ce but, le ligand **49** a été mis en réaction en présence de carbonate d'argent et d'un excès d'anhydride acétique à reflux de l'acétone. Le conjugué **50** a ainsi été obtenu avec 71 % de rendement (**Schéma 7**).

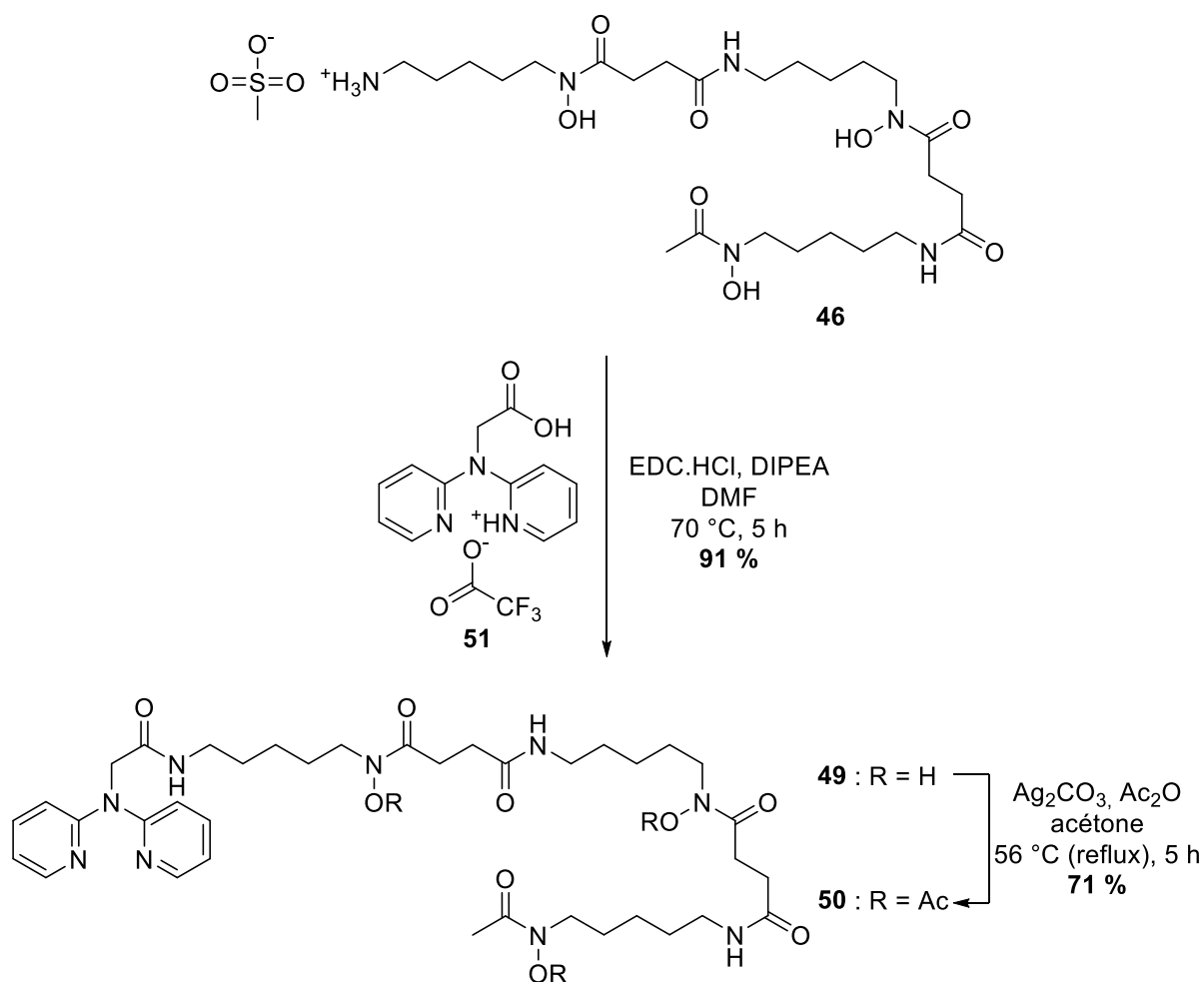


Schéma 7. Synthèse des conjugués DFO-dpa **49** et **50**.



Dans une seconde approche, nous avons augmenté la longueur du bras espaceur afin de tester si l'éloignement du complexe par rapport au sidérophore peut influencer la reconnaissance de ce dernier par son transporteur de membrane externe.

La première étape de synthèse consiste à traiter la DFO **46** en présence de chloroformiate de propargyle et de DIPEA. Après 5 min à 90 °C dans la DMF, la DFO possédant une fonction alcyne terminale **56** a été obtenue avec 86 % de rendement. Ensuite, une réaction de chimie click entre cet alcyne et la fonction azoture du ligand **55** a été réalisée en présence d'un excès de Cu(I). Nous avons d'abord testé cette réaction dans un mélange DMSO/H₂O, mais le milieu a pris en masse empêchant une agitation correcte. Nous avons donc changé de solvant et utilisé du sulfate de cuivre(II) et de l'ascorbate de sodium dans un mélange THF/H₂O. Dans ces conditions, le conjugué **54** a été obtenu avec un rendement maximal de 44 % (**Schéma 8**). La littérature montre que les réactions de chimie click réalisées entre des sidérophores non protégés et des alcynes ont des rendements très variables (51-62 % avec un dérivé de la DFO ; 17-76 % avec des dérivés de l'Ent).^{50,104,105} Une optimisation de ce rendement est sans doute possible en modifiant les conditions de traitement et de purification.

E. Coordination à l'iridium(III)

L'iridium(III) a été introduit sur nos ligands DFO-dpa **49** et **54** par Julien RENAULT (LCMT, ENSICAen) pour conduire aux composés attendus **47a** et **53** (**Schéma 9**, **Schéma 10**). Après réaction, les composés **47a** et **53** nous ont été envoyés afin que nous réalisions leur purification. Ces purifications se sont révélées très complexes à mettre au point du fait de la polarité des produits finaux attendus. En outre, nous avons aussi isolé le complexe ferrique résultant de la chélation du fer présent à l'état de traces dans la phase stationnaire (**Figure 31**, **Figure 32**). Ainsi, il n'a pas été possible de calculer les rendements pour ces deux conjugués, car ils ont été obtenus en mélange, avec et sans fer.

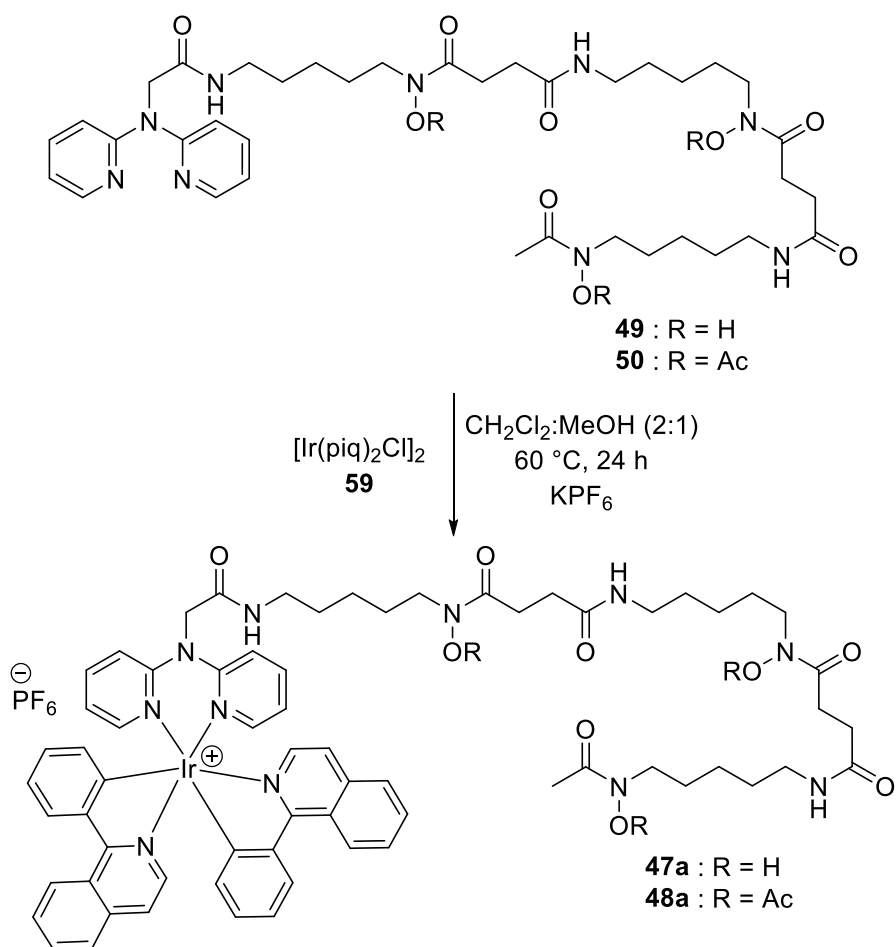


Schéma 9. Synthèse des conjugués **47a** et **48a**.

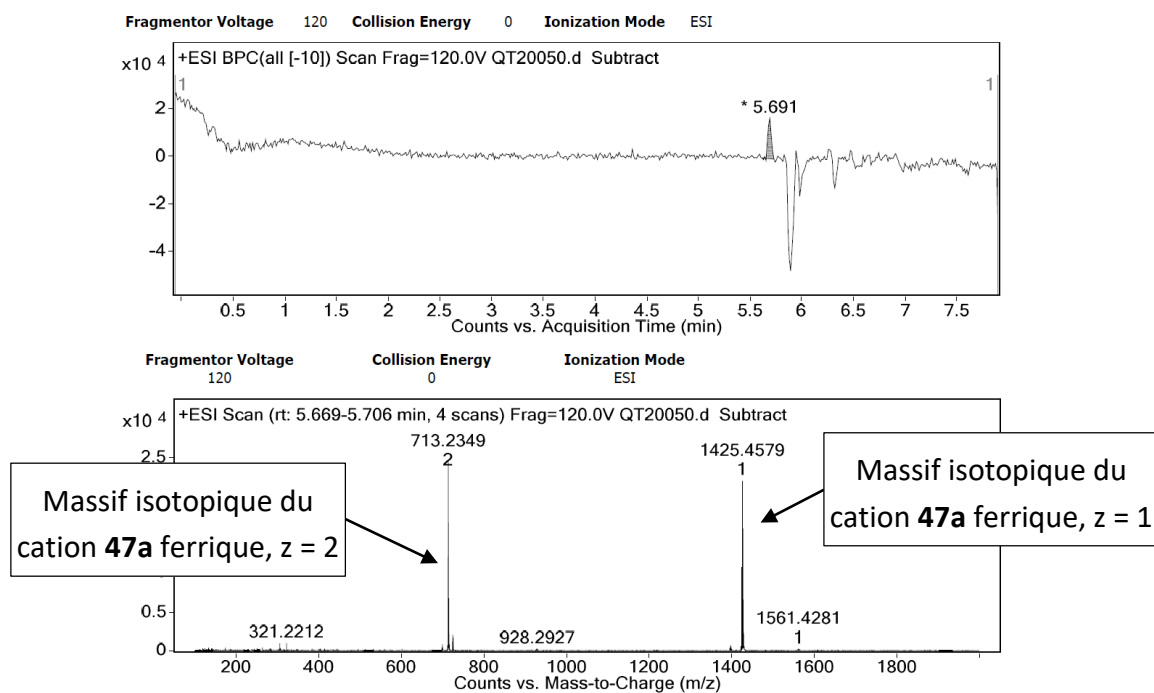


Figure 3I. LC/MS-BR du conjugué **47a** ferrique ($M_{\text{cation } 47a\text{-Fe}} = 1425,49 \text{ g.mol}^{-1}$).

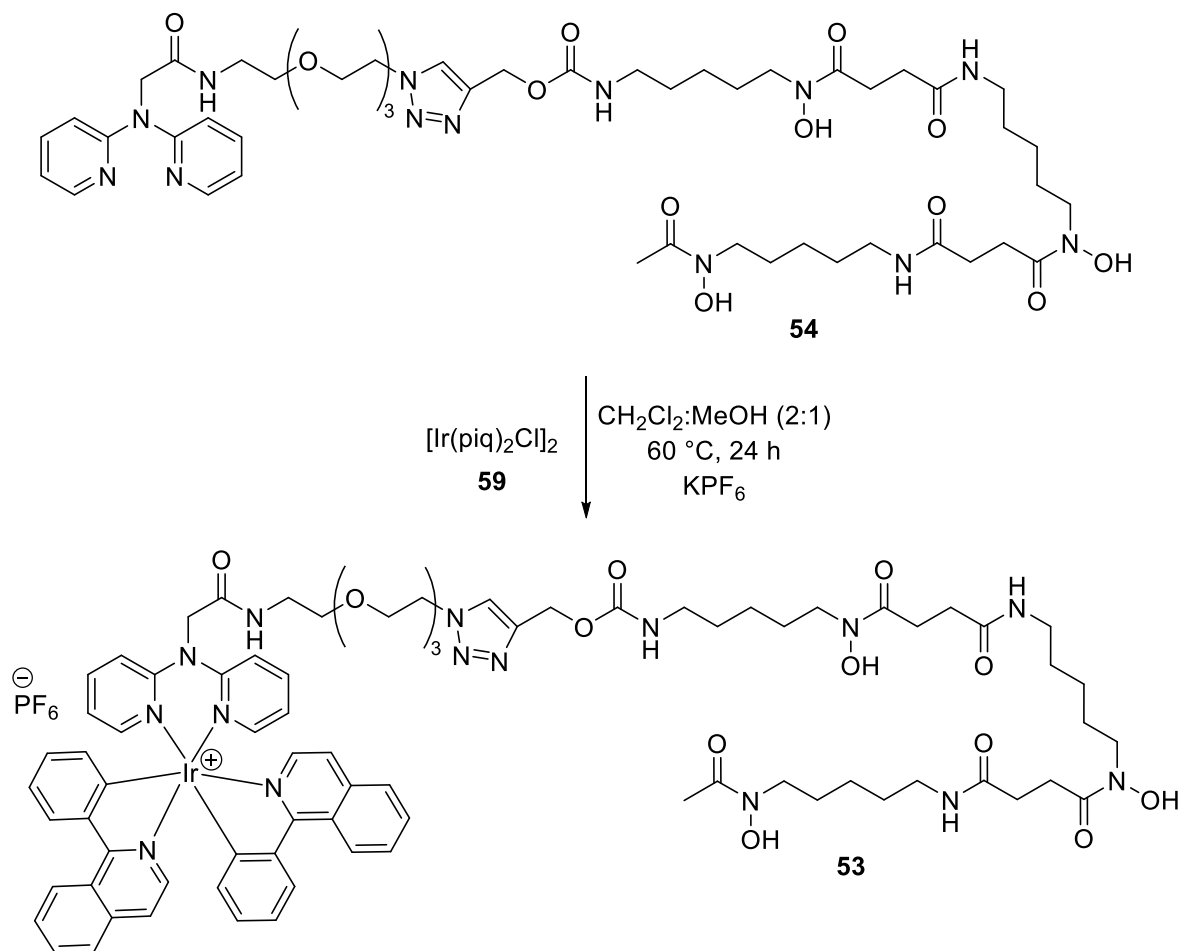


Schéma 10. Synthèse du conjugué 53.

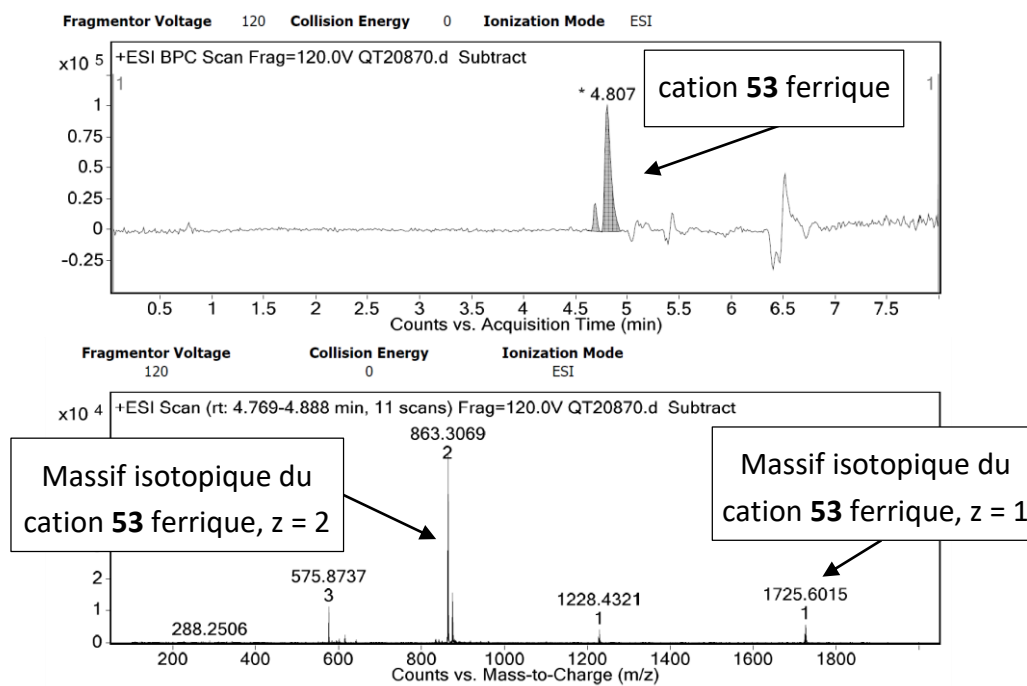


Figure 32. LC/MS-BR du conjugué 53 ferrique ($M_{\text{cation } 53\text{-Fe}} = 1725,61 \text{ g.mol}^{-1}$).

Confrontés à ces problèmes expérimentaux, nous avons travaillé sur la version acétylée **50** du ligand **49** et obtenu le conjugué **48a** (Schéma 9). La purification de **48a** a été réalisée d'abord par méthode classique sur gel de silice, mais le produit final était difficilement séparable des produits de départ résiduels.

Une nouvelle purification utilisant la technique de *Size Exclusion Chromatographie* (SEC), séparation des molécules selon leurs volumes hydrodynamiques, a été mise au point par nos collaborateurs à Caen. L'échantillon est dilué dans le dichlorométhane et déposé sur la colonne remplie d'une résine *Bio-Beads® S-X3* (billes poreuses et neutres de styrène-divinylbenzène) dans du dichlorométhane, d'après un protocole basé sur la littérature.¹⁰⁶ Cette méthode nécessite d'utiliser l'anion chlorure comme contre-ion du complexe d'iridium(III) afin de faciliter la purification des produits. Les conjugués **47b** et **48b** dont le contre-anion est l'anion chlorure au lieu de l'anion hexafluorophosphate ont pu ainsi être obtenus avec 89 % et 77 % de rendement respectivement (Figure 33).

Cette nouvelle stratégie de synthèse comporte plusieurs avantages : une meilleure séparation lors de la purification en SEC, l'étape de métathèse d'anion n'est plus nécessaire, et l'anion chlorure permet en théorie une meilleure solubilité des conjugués dans l'eau ce qui facilitera les tests biologiques.

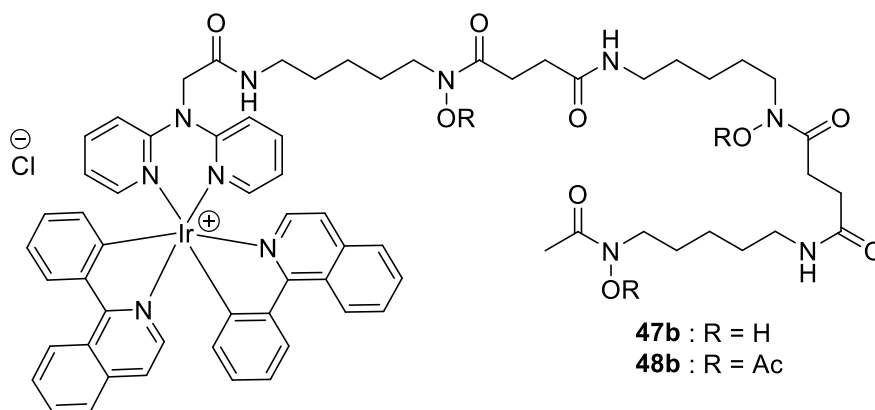


Figure 33. Structure des conjugués DFO-Ir(III) **47b** et **48b** possédant le contre-ion Cl⁻.

Nous avons ensuite testé les propriétés antibactériennes de nos conjugués DFO-Ir(III) pour **47a**, **47a** ferrique nommé **47a-[Fe]** et **53** ferrique nommé **53-[Fe]**.

F. Évaluation de l'activité antibactérienne des composés iridiés

La détermination des CMI des conjugués **49**, **47a**, **47a-[Fe]** et **53-[Fe]** a été effectuée par nos collaborateurs à Besançon. Ces expériences ont été à nouveau réalisées sur 4 souches de laboratoire (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (SA), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PA), *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC) et *Acinetobacter baumannii* CIP7010 (AB)), dans un milieu Mueller-Hinton, soit sans lumière, soit sous lumière bleue (452 nm, 387,8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) à l'intensité minimale, dans le photoincubateur précédemment décrit (**Figure 28**). Le composé **49** sert de contrôle pour pouvoir comparer les conjugués iridiés au vecteur seul.

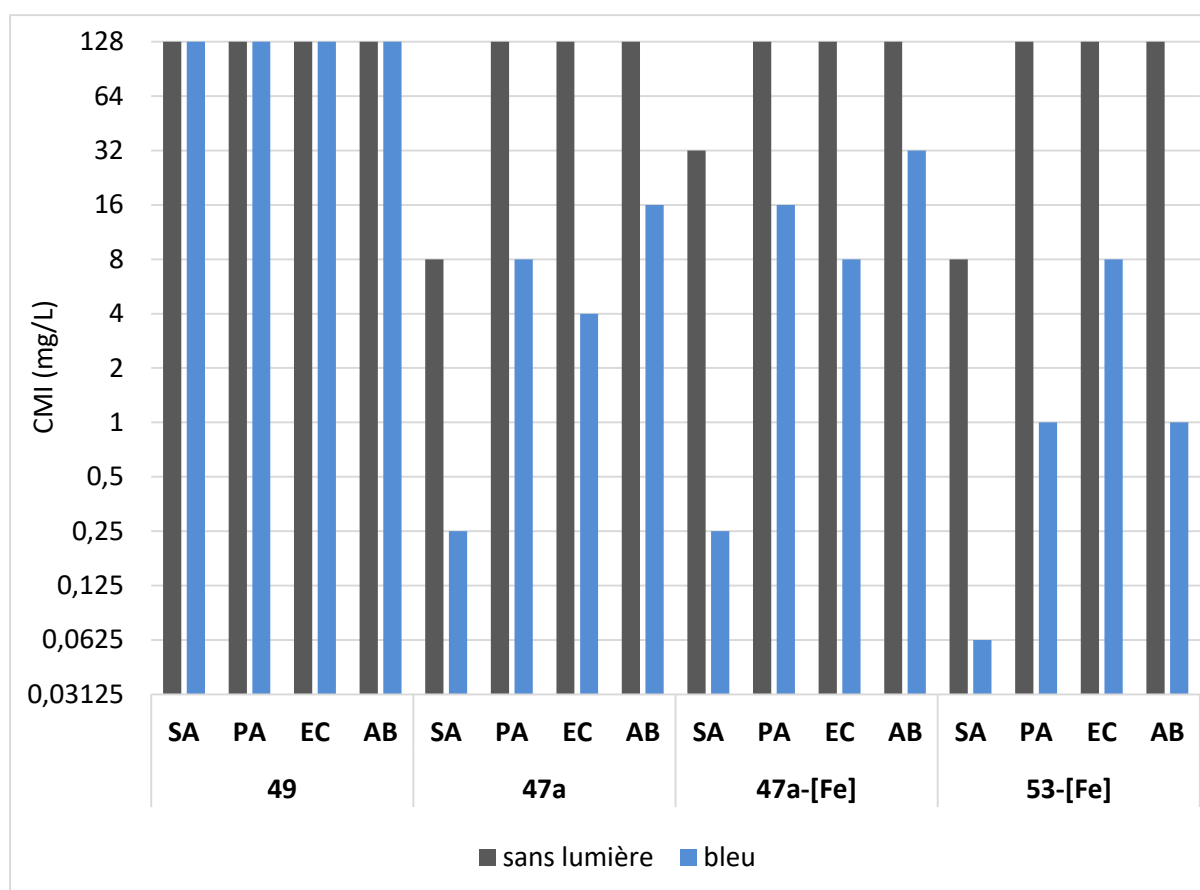


Figure 34. CMI des conjugués **49**, **47a**, **47a-[Fe]** et **53-[Fe]**. Le graphique ne prenant pas en charge les symboles ">" et "<=", les valeurs "128" et "0,0625" sont en réalité "> 128" et "<= 0,0625" respectivement. Les résultats ont été obtenus en répliquats biologiques (n = 3) pour le conjugué **53-[Fe]** mais juste une mesure (n = 1) pour les autres conjugués à l'heure de rédiger ce manuscrit.

Comme attendu, le composé **49** étant un sidérophore non irradié, il n'a aucune activité antibactérienne (CMI ≥ 128 mg/L) sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Le conjugué avec (**47a-[Fe]**) et sans (**47a**) fer a une très bonne activité antibactérienne sur *S. aureus*, particulièrement en présence de lumière bleue (CMI = 0,25 mg/L). Cependant, son activité antibactérienne sur les bactéries à Gram négatif reste modérée (CMI = 8 mg/L en moyenne) et légèrement moins efficace que les complexes d'iridium(III) non vectorisés (CMI = 2 mg/L en moyenne) (**Figure 34**, **Figure 29**). En revanche, le conjugué **53** testé seulement sous sa forme ferrique montre, en présence de lumière bleue, une très bonne activité antibactérienne à la fois la bactérie à Gram positif *S. aureus* (CMI $\leq 0,0625$ mg/L) et les pathogènes Gram négatif (CMI = 1 mg/L sur PA et AB). Ainsi, la longueur du bras espaceur entre le sidérophore et le complexe d'iridium(III) aurait un impact sur l'activité bactérienne du conjugué. Il convient de mentionner qu'à l'heure de la rédaction de ce manuscrit, les conjugués **47b** et **48b** n'ont pas pu être testés.

G. Conclusions et perspectives du chapitre

Nous avons ainsi obtenu les premiers conjugués entre un sidérophore et un complexe d'iridium(III), montrant ainsi la pertinence de notre approche. Les synthèses et procédés de purification mis au point pour l'obtention des conjugués DFO peuvent désormais servir de base pour l'élaboration de conjugués dont les vecteurs sont plus difficiles à obtenir (synthèse/purification). Les conjugués DFO-Ir(III) testés jusqu'ici présentent une activité antibactérienne très large (sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif), mais uniquement en présence de lumière. Rarement ces activités sont supérieures à celles obtenues avec les complexes d'iridium(III) non vectorisés. Même si des conjugués, notamment **47b** et **48b**, restent à évaluer, il semble que la DFO n'apparaît pas comme le vecteur le plus adapté pour une application thérapeutique.

Dans ce contexte, nous avons travaillé en parallèle sur des conjugués entre des complexes d'iridium(III) et des vecteurs catécholés mimant un autre sidérophore : l'entérobactine.

Chapitre II – Conjugués entre des complexes d'Ir(III) et des sidérophores catécholés mimant l'entérobactine

A. Voie de transport du fer entérobactine-dépendante chez *P. aeruginosa*

L'entérobactine (Ent) **5** est l'archétype des sidérophores catécholés. Cette molécule est organisée autour d'un châssis trilactone et possède trois fonctions catéchols permettant de complexer l'ion ferrique (Figure 35).

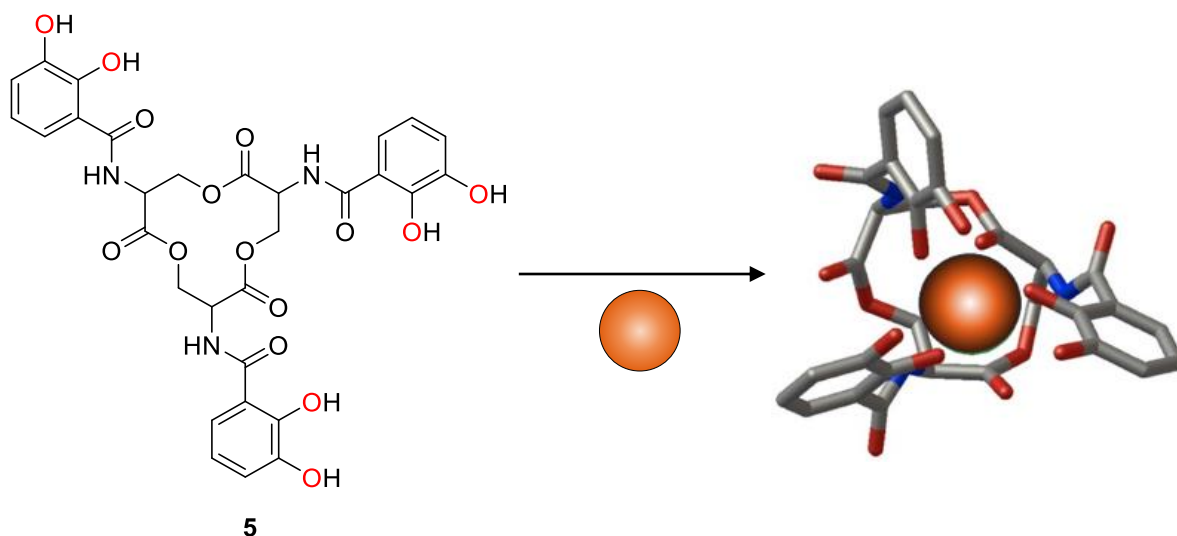


Figure 35. Structure de l'entérobactine **5** et de son complexe ferrique. Les hétéroatomes impliqués dans la chélation du fer(III) sont colorés en rouge. L'ion Fe(III) est représenté par la sphère orange.

L'Ent **5** est le sidérophore présentant la meilleure affinité pour le fer décrite à ce jour : 10^{49} M^{-1} .¹⁰⁷ Ce sidérophore est biosynthétisé par des *Enterobacteriaceae* comme *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, et *Salmonella typhimurium*.¹⁰⁸ Il peut néanmoins être utilisé par *P. aeruginosa* bien que cette bactérie ne le produise pas, et permet l'import du fer chez cette bactérie (Figure 36).^{29,109–111} Le complexe Ent-Fe³⁺, formé dans le milieu extracellulaire, est reconnu par PfeA. Ce transporteur de membrane externe change ainsi de conformation ce

qui induit l'activation de la machinerie TonB (TonB/ExbB-ExbD) localisée dans la membrane interne. Le gradient de protons entre le périplasma et le cytoplasme permet de fournir l'énergie à la protéine TonB qui transfère ainsi cette énergie au transporteur PfeA et permet au complexe Ent-Fe³⁺ d'entrer dans le périplasma. La protéine PfeE hydrolyse le complexe Ent-Fe³⁺ en 2,3-DHBS-Fe³⁺ par clivage du cycle trilactone de l'Ent. L'ion ferrique est ensuite récupéré par un processus réductif (Fe(III) → Fe(II)). La présence de l'Ent ferrique dans le périplasma active le système de régulation de la voie de PfeA. C'est un système à deux composantes : PfeS (*sensor*) qui reconnaît le complexe Ent-Fe³⁺ dans le périplasma et libère PfeR (*receptor*) dans le cytoplasme. Ce dernier est le facteur de transcription et permet l'expression des gènes de la voie d'assimilation du fer Ent-dépendante. *P. aeruginosa* possède un transporteur secondaire des sidérophores de type catéchol comme l'Ent, nommé PirA. Ce transporteur et la voie dont il dépend fonctionnent de manière similaire à celle utilisant PfeA, avec notamment un système à deux composantes (PirS/PirR) pour réguler l'expression des gènes de la voie (**Figure 36**).

Comme nous l'avons mentionné dans la synthèse bibliographique (Partie I – Chapitre I – G. 2), des études précédentes ont montré qu'un complexe métallique anticancéreux peut être couplé à un dérivé de l'Ent. Le conjugué sidérophore-Pt(IV) peut ainsi utiliser la voie d'acquisition de l'Ent **5** pour conduire l'agent toxique au sein de la bactérie et ainsi augmenter son efficacité antibactérienne.⁶⁶ Ce résultat montre le potentiel des analogues de l'Ent pour la vectorisation de complexes métalliques. À ce jour cependant, aucun conjugué entre des analogues de l'Ent et des complexes d'iridium(III) n'a été décrit.

Ainsi, nous avons développé nos propres analogues de l'Ent utilisables pour la stratégie du cheval de Troie chez les bactéries à Gram négatif, et en particulier *P. aeruginosa*. Trois vecteurs ont ainsi été conçus et synthétisés dans l'équipe : le MCV (*Mono-Catechol Vector*), le BCV (*Bis-Catechol Vector*) et le TCV (*Tris-Catechol Vector*).

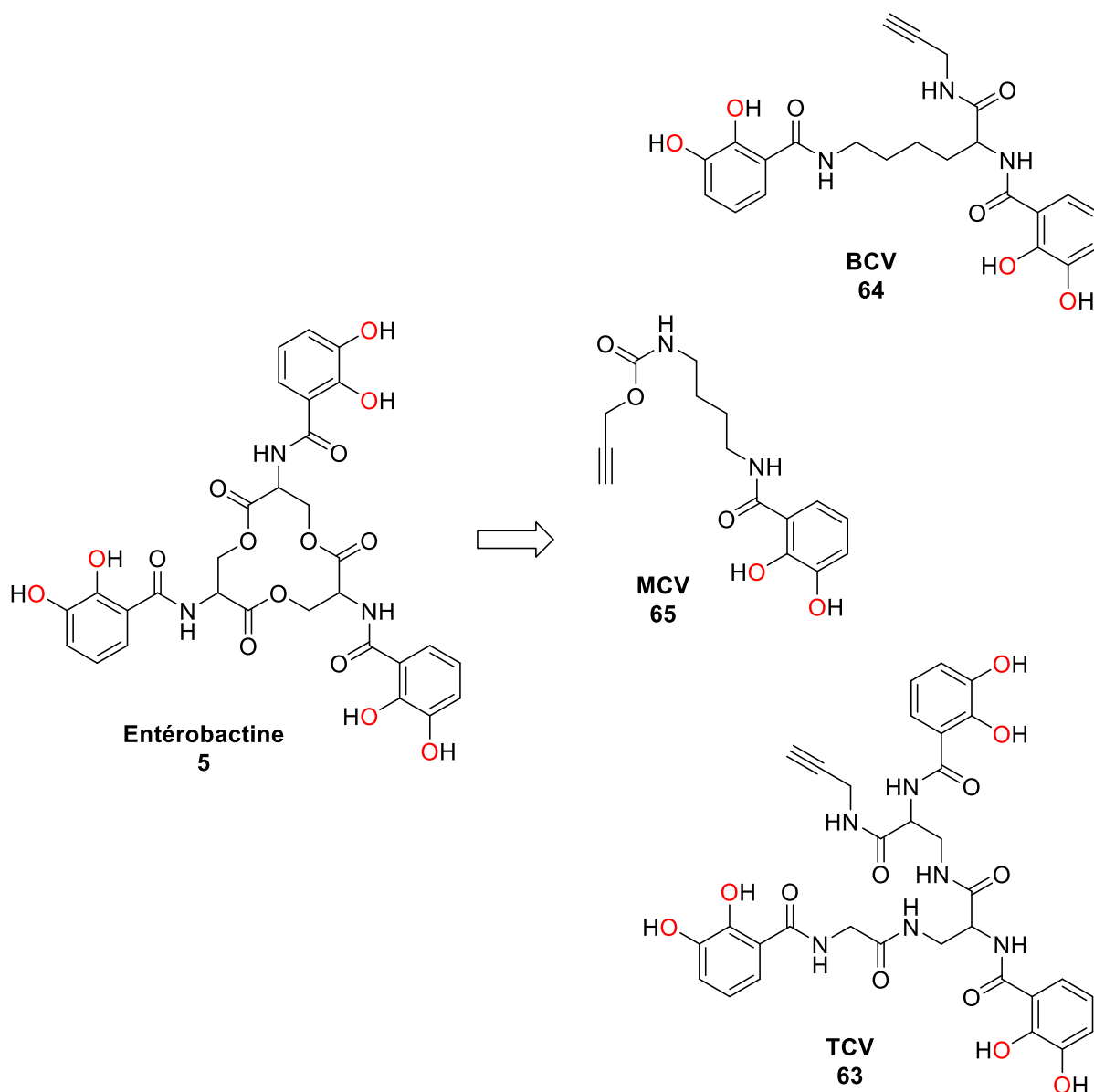
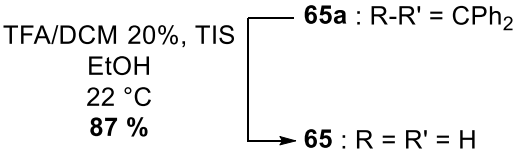


Figure 37. Structures du TCV **63**, du BCV **64** et du MCV **65**. Les hétéroatomes impliqués dans la chélation du fer(III) sont colorés en rouge.

2. Synthèse du TCV **63**, du BCV **64** et du MCV **65**

Le TCV **63**, le BCV **64** et le MCV **65** ont été initialement synthétisés avec des fonctions catéchols protégées par un motif 1,3-benzodioxole permettant de simplifier les étapes de purification et d'éviter les réactions secondaires. Le MCV **65**, le BCV **64** et le TCV **63** ont ainsi été obtenus antérieurement à mon arrivée, après une étape de déprotection (**Schéma 11**, **Schéma 12**, **Schéma 13**).^{58,112}



(71)

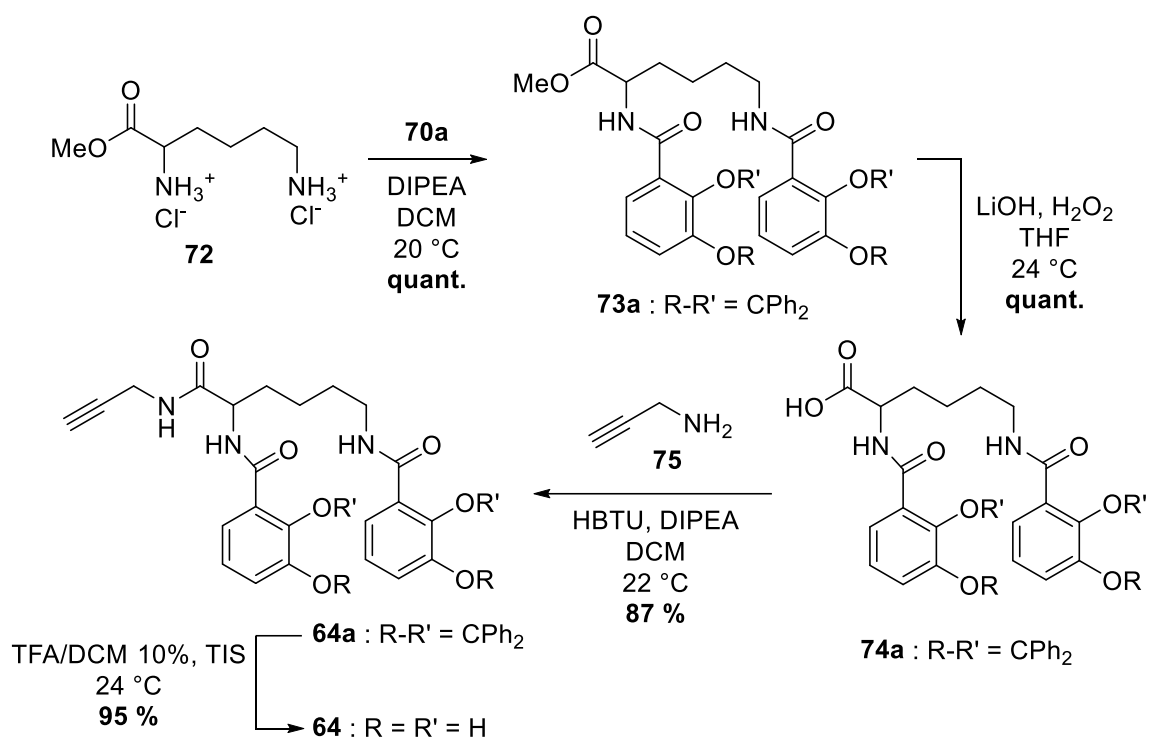


Schéma 12. Synthèse du BCV **64**.¹¹²

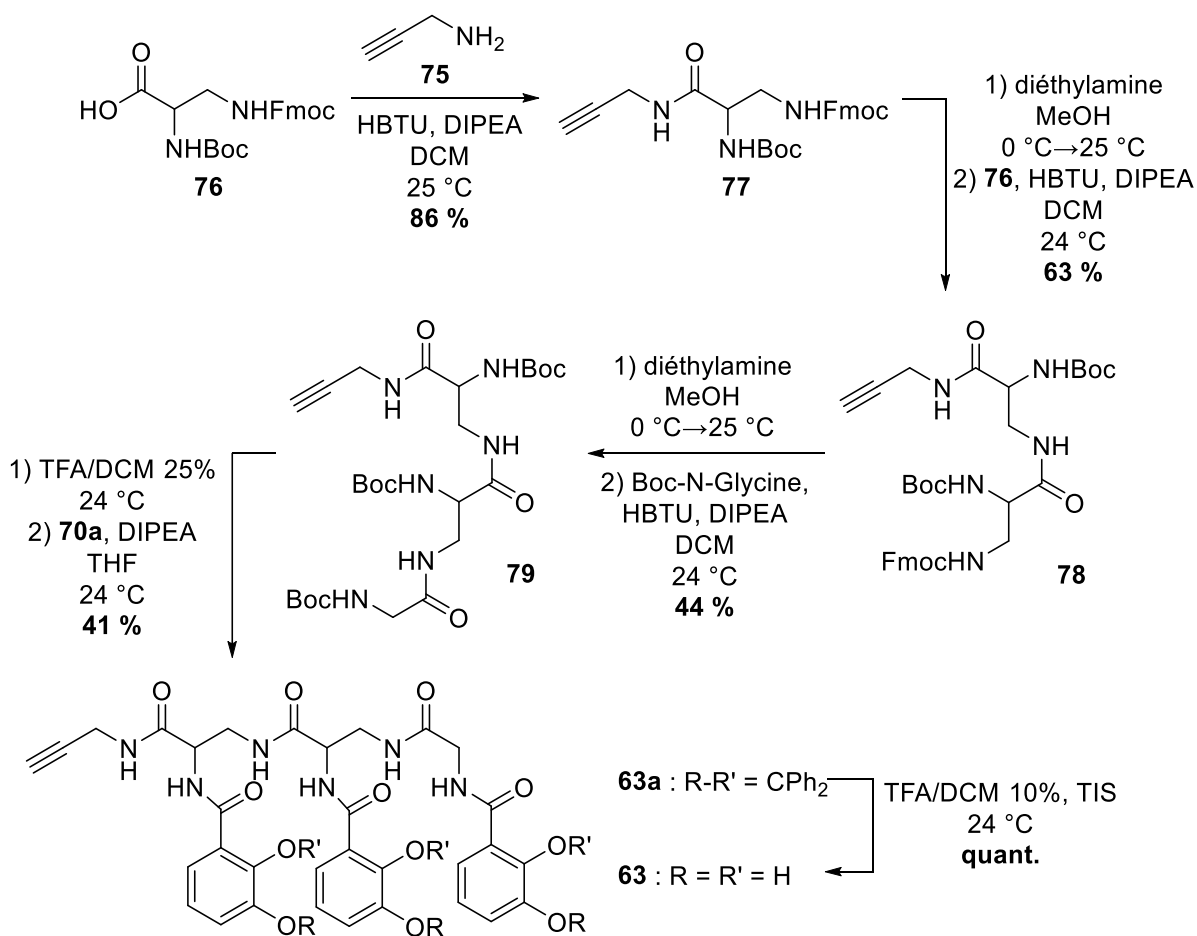


Schéma 13. Synthèse du TCV **63**.¹¹²

Le BCV **64** et le TCV **63** ont montré leurs capacités à transporter le fer dans *P. aeruginosa* et *E. coli* en utilisant la voie de transport du fer Ent-dépendante.^{112,113} Le cas du MCV **65**, par contre, semble plus complexe à analyser : il promeut le transport du fer par plusieurs transporteurs dont certains encore non caractérisés (résultats non publiés). À mon arrivée dans l'unité, la structure 3D de PfeA venait juste d'être publiée dans le cadre d'une collaboration européenne impliquant notre équipe (**Figure 38**).¹¹⁴ Plus récemment, le BCV et le TCV ferriques ont été co-cristallisés avec PfeA et ont montré qu'ils sont de parfaits mimétiques de l'Ent **5** sur le site de liaison de PfeA (**Figure 39**).⁵⁹ De plus, grâce à la synthèse de conjugués entre le BCV **64** et TCV **63** et des oxazolidinones, nous avons prouvé que ces vecteurs, une fois chargés, parviennent jusqu'au périplasme.⁵⁹

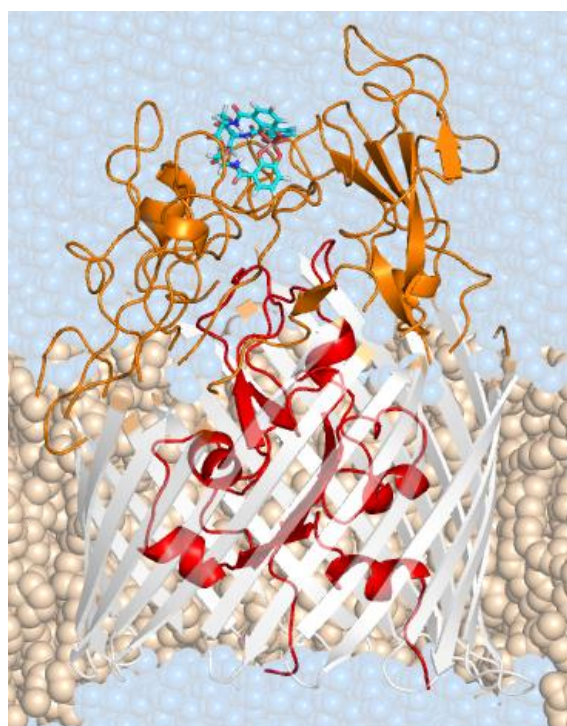


Figure 38. Structure tridimensionnelle de l'entérobactine ferrique et de PfeA, son transporteur de membrane externe spécifique chez *Pseudomonas aeruginosa*. Le transporteur est constitué de deux domaines : un tonneau β est coloré en blanc avec des boucles extracellulaires en orange et le domaine N-terminal en rouge obturant le tonneau. La structure carbonée de l'entérobactine ferrique est représentée en cyan. La membrane externe dans laquelle est enchâssé le transporteur est représentée en beige. Le milieu extracellulaire (en haut) et le périplasme (en bas) sont colorés en bleu.

Le TCV **63** et le BCV **64** principalement, et le MCV **65** en tant que modèle pour mettre au point la chimie, sont donc des vecteurs particulièrement adaptés à notre approche. Néanmoins, le groupe protecteur choisi pour ces premières synthèses de vecteur (1,3-

benzodioxole) n'est pas compatible avec la chimie de l'iridium(III), ces complexes ne tolérant pas les conditions acides drastiques nécessaires à la libération du motif catéchol. Nous avons donc repris ces synthèses en se basant sur trois autres groupements protecteurs de la fonction phénolique des catéchols : acétyle (Ac), benzyle (Bn) et *para*-méthoxybenzyle (PMB). Les travaux de cette thèse reposent principalement sur la synthèse de TCV **63** protégé par ces groupements.

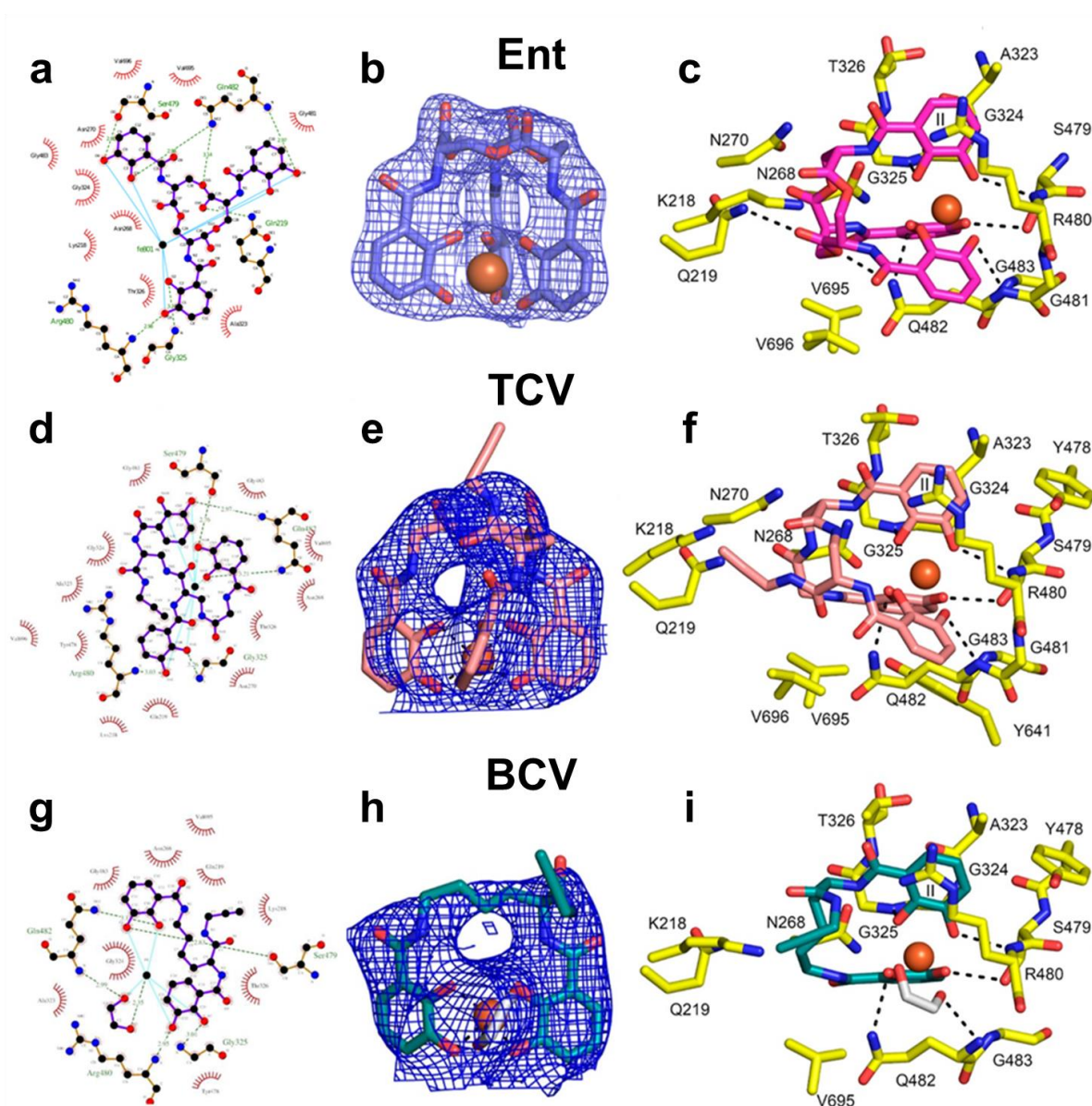


Figure 39. Structures de Ent-Fe³⁺, TCV-Fe³⁺ et BCV-Fe³⁺ en complexe avec PfeA. (a, d, g) Diagrammes Ligplot illustrant les interactions PfeA-sidérophore. (b, e, h) Carte finale de la densité électronique 2F_O-F_C avec un contour à un niveau 1σ autour de Ent-Fe³⁺, TCV-Fe³⁺ et BCV-Fe³⁺ respectivement. (c, f, i) Comparaison du site de liaison Ent-Fe³⁺, TCV-Fe³⁺ et BCV-Fe³⁺. Modifié de Moynié, L. et al., *Nat Commun* **2019**, 10, 3673 et Moynié, L. et al., *ACS Infect. Dis.* **2022**, 8, 1894–1904.^{59,114}

C. Rétrosynthèse du conjugué TCV-Ir(III)

Dans le cas du TCV **63**, nous avons choisi de lier le complexe d'iridium(III) au sidérophore, soit par un bras espaceur court de type di(pyridin-2-yl)glycine ($n = 1$), soit par un bras espaceur long de type acide 5-(di(pyridin-2-yl)amino)valérique ($n = 4$) (**Schéma 14**). Ces deux stratégies reposent sur la synthèse de dpa fonctionnalisées **55** et **84** obtenues à partir de la dpa commerciale **52** (**Schéma 5** et **Schéma 15** respectivement). Les ligands **55** et **84** possèdent une fonction azoture permettant de réaliser les réactions de chimie click.

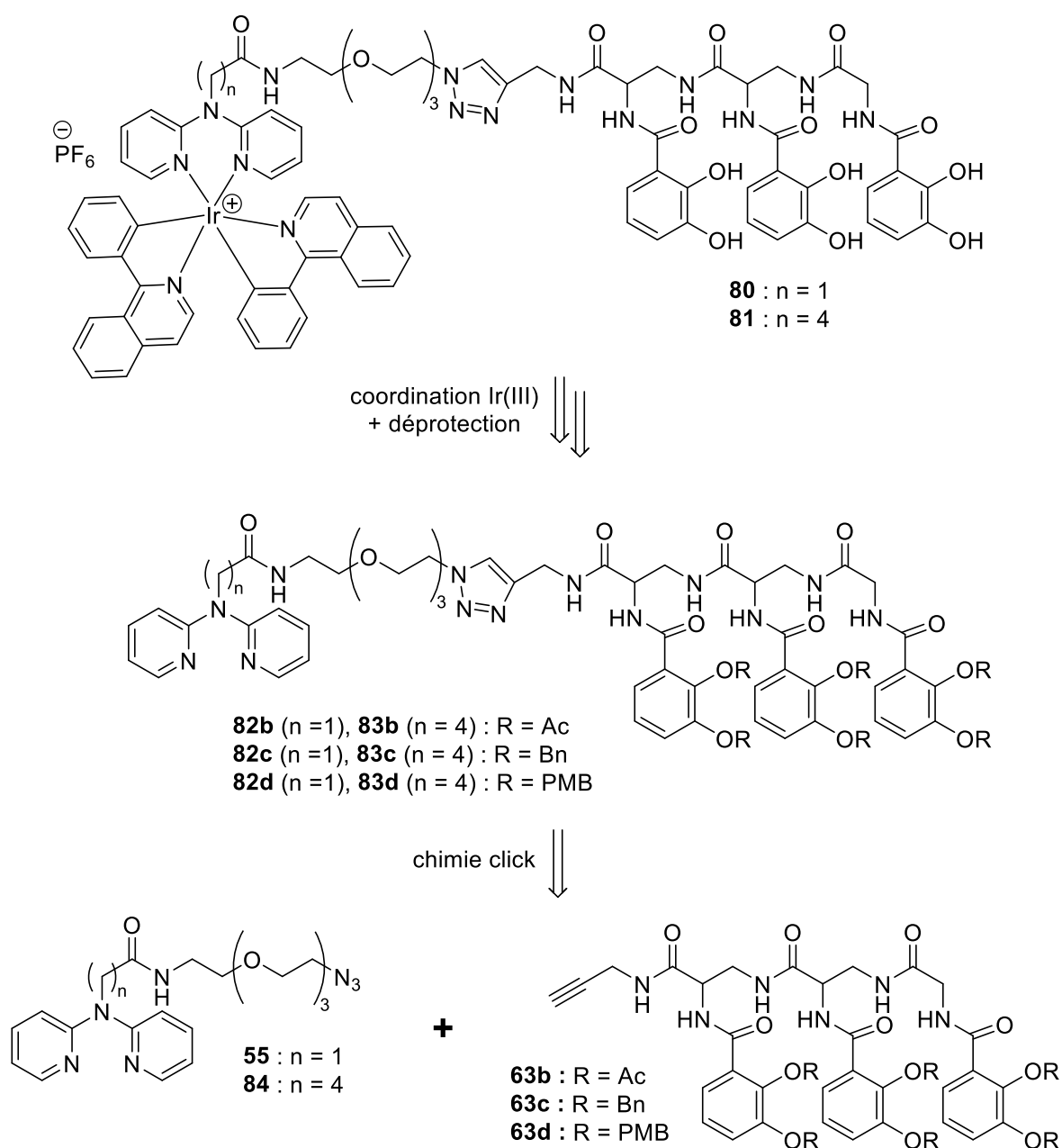


Schéma 14. Rétrosynthèse des conjugués **80** et **81** entre les TCV et un complexe d'Ir(III).

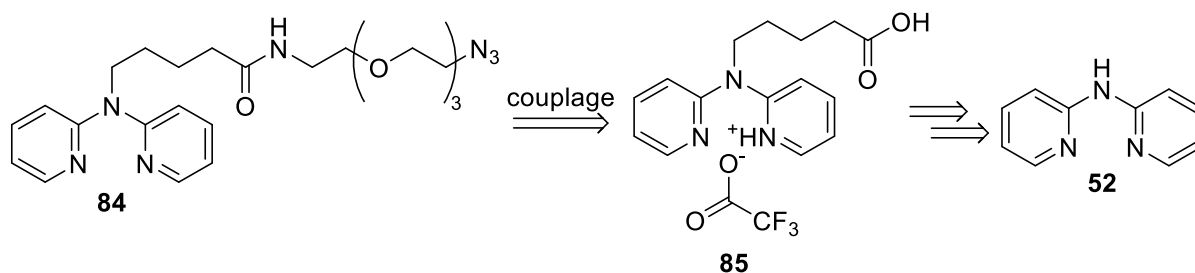


Schéma 15. Rétrosynthèse du ligand **84**.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le TCV **63** est composé de deux sous-parties : un synthon catéchol **70** et un châssis triamine **86**. Le synthon catéchol **70** est protégé par différents groupements protecteurs afin de faciliter les étapes de purification ainsi que d'éviter les réactions secondaires potentielles : acétyle (Ac), benzyle (Bn) et *para*-méthoxybenzyle (PMB).

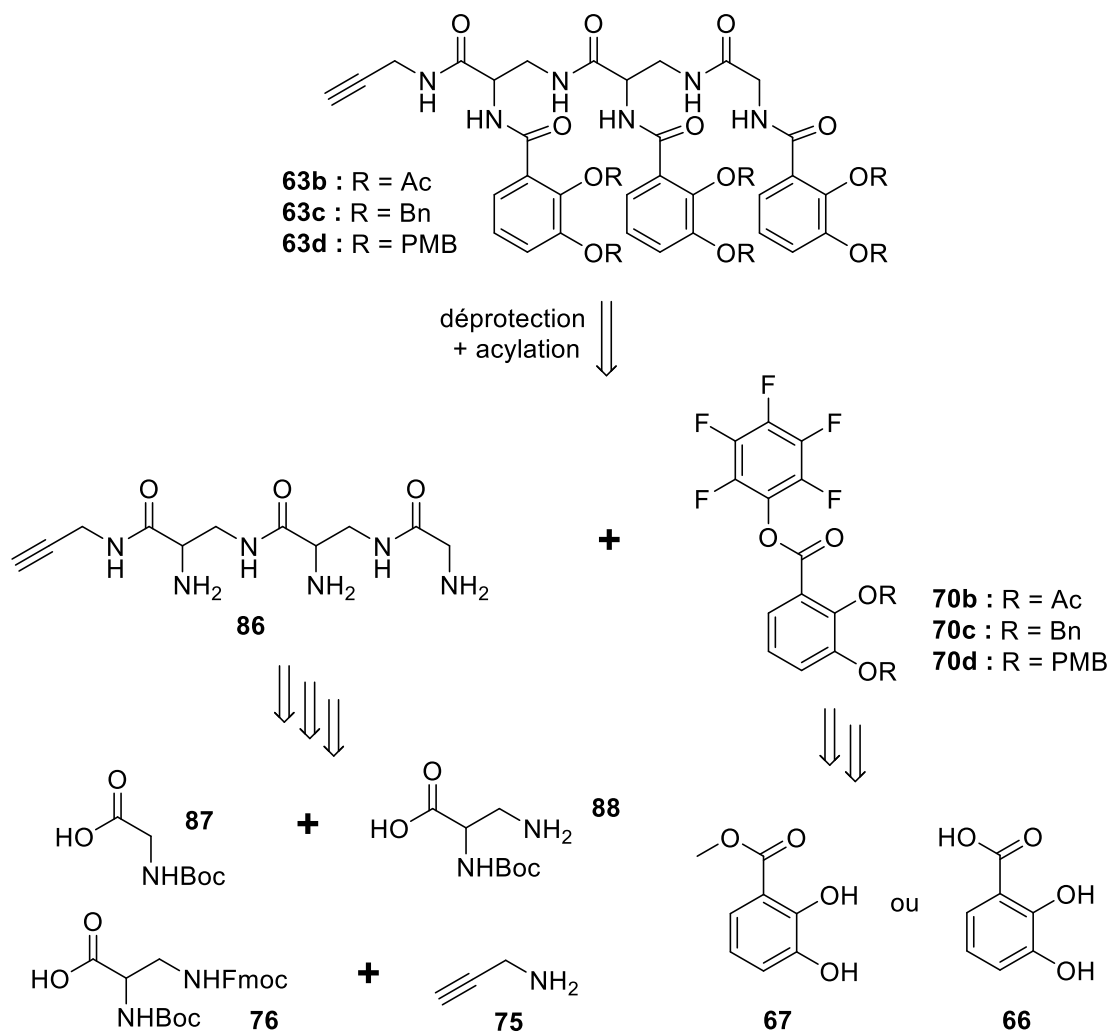


Schéma 16. Rétrosynthèse des TCV **63b**, **63c**, **63d** entre le châssis triamine **86** et les synthons catéchols **70b**, **70c**, **70d**.

Le châssis triamine **86** est synthétisé à partir d'un dérivé glycine **87**, de deux dérivés d'acide diaminopropionique (DAP) **88** et **76**, et de propargylamine **75** (**Schéma 16**). Il possède une fonction alcyne terminale nécessaire pour les réactions de chimie click. La synthèse de ce châssis **i** est inédite et optimisée par rapport à celle publiée par Baco *et al.*¹¹²

Les synthèses des différents synthons catéchols utilisent des stratégies similaires, la première étape étant toujours la protection de la fonction catéchol à partir de la molécule commerciale, soit sous forme ester **67**, soit sous forme acide **66** (**Schéma 16**).

D. Synthèse des synthons catéchols

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les synthons catéchols sont des éléments clés de cette stratégie en étant les fonctions permettant de chélater le fer(III). La première étape de synthèse consiste donc à protéger cette fonction pour éviter des réactions parasites durant la synthèse multi-étapes des conjugués et aussi éviter la chélation avec d'autres métaux dans les étapes de synthèse et de traitement. En outre, l'utilisation de chélateurs protégés tout au long de la synthèse facilite grandement les étapes de purification.

1. Synthèse du synthon catéchol **70b**

Le premier groupement protecteur choisi est l'acétyle (Ac). Cette fonction à l'avantage d'être clivable en milieu biologique et donc permettrait d'utiliser les conjugués cibles en tant que prodrogues. Son inconvénient principal est d'être sensible à de nombreuses conditions réactionnelles.

La première étape de cette synthèse utilise un protocole adapté de la littérature.¹¹⁵ L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque commercial **66** est mis en réaction avec de l'anhydride acétique et de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans une solution de triéthylamine. Après 1 heure à reflux (89 °C), le produit acétylé **69b** est obtenu avec 94 % de rendement.

L'étape suivante de synthèse est la formation d'un dérivé d'acide activé. PINKERT *et al.*¹¹⁵ ont utilisé un chlorure d'acyle. Nous n'avons pas été en mesure de reproduire le résultat publié. Nous nous sommes ainsi tournés vers un ester activé de pentafluorophénol, composé

stable, purifiable et pouvant être stocké sous forme de solide sur le long terme. L'acide **69b** est mis en réaction avec le pentafluorophénol, en présence de *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) dans du DCM selon des conditions décrites par notre équipe sur des composés similaires.¹¹² L'ester activé **70b** est ainsi obtenu avec 79 % de rendement (**Schéma 17**).

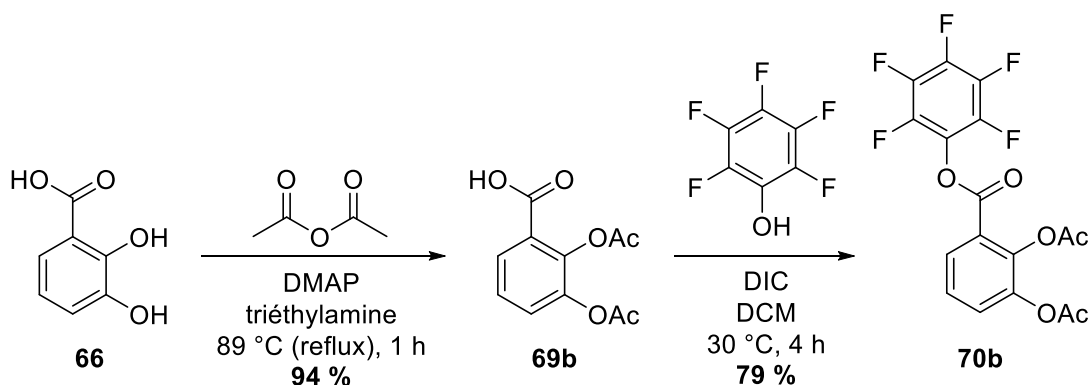


Schéma 17. Synthèse du synthon **70b**.

2. Synthèse du synthon catéchol **70d**

Pour la protection du catéchol par des groupes *para*-méthoxybenzyle (PMB), nous sommes partis du 2,3-dihydroxybenzoate de méthyle commercial **67** en utilisant un protocole adapté de la littérature.^{116,117} L'ester **67** est mis en réaction avec le chlorure de 4-méthoxybenzyle en présence d'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) et d'un excès de carbonate de potassium anhydre dans de l'acétone. Après 48 heures à reflux (56 °C), le produit **68d** est obtenu de manière quantitative. L'étape suivante consiste à saponifier l'ester en présence de triméthylsilanolate de potassium (TMSOK) dans du THF à reflux (65 °C).¹¹⁸ L'acide **69d** résultant est obtenu de manière quantitative. L'acide **69d** est ensuite traité avec du pentafluorophénol et du DIC dans du DCM pour conduire à l'ester activé **70d** avec 95 % de rendement (**Schéma 18**).

Lors des différentes étapes de synthèse utilisant des composés possédant des PMB, nous nous sommes rendu compte que ce groupement protecteur pouvait être sensible à l'acidité de la silice utilisée lors des purifications. Nous verrons que ce problème s'est malheureusement révélé récurrent dans nos synthèses utilisant ce précurseur, malgré l'ajout de 0,1 % de triéthylamine pour neutraliser la phase stationnaire.

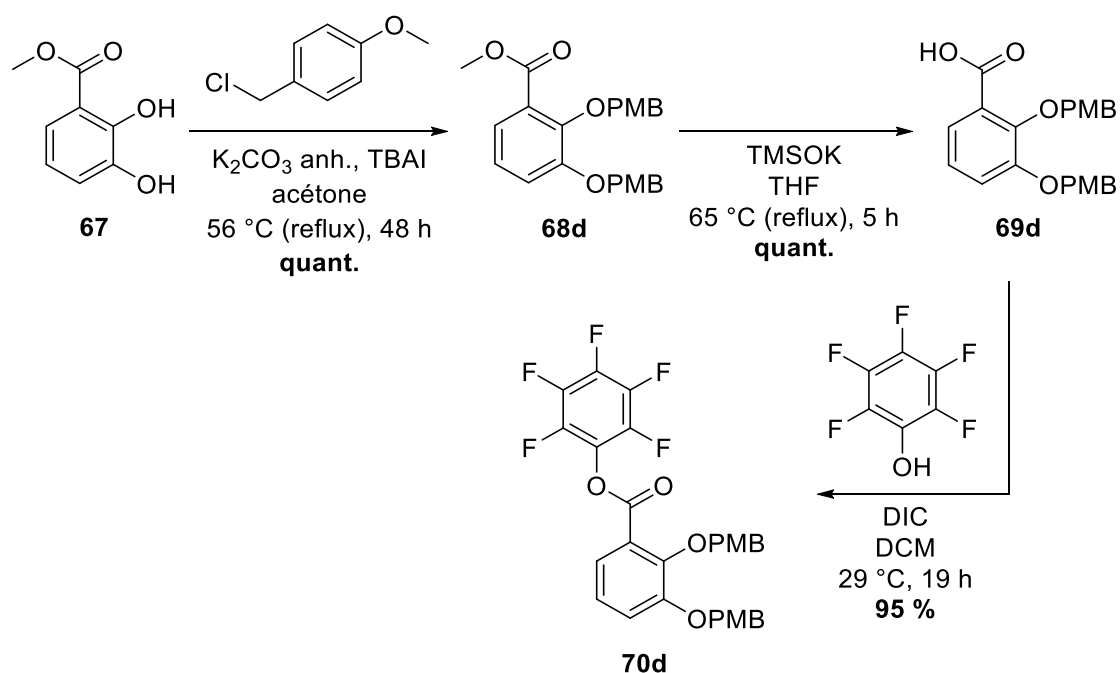


Schéma 18. Synthèse du synthon **70d**.

Il est intéressant de mentionner que, lors de la synthèse en grande quantité du composé **68d**, nous avons pu isoler un catéchol mono protégé. La position ortho ou méta, protégée au PMB, est en cours de confirmation.

3. Synthèse du synthon catéchol **70c**

La voie de synthèse du synthon **70c** est presque identique à celle de **70d**, seule la première étape est différente et adaptée de la littérature.^{119,120} Le produit commercial **67** est mis en réaction avec du bromure de benzyle et un excès de carbonate de potassium anhydre dans de l'acétone. Après 2 heures à reflux (56 °C), le produit **68c** est obtenu avec 81 % de rendement. La saponification de cet ester par le TMSOK conduit à l'acide **69c** obtenu quantitativement. Cet acide **69c** est ensuite activé sous la forme d'ester de pentafluorophénol **70c**, obtenu avec 96 % de rendement (**Schéma 19**).

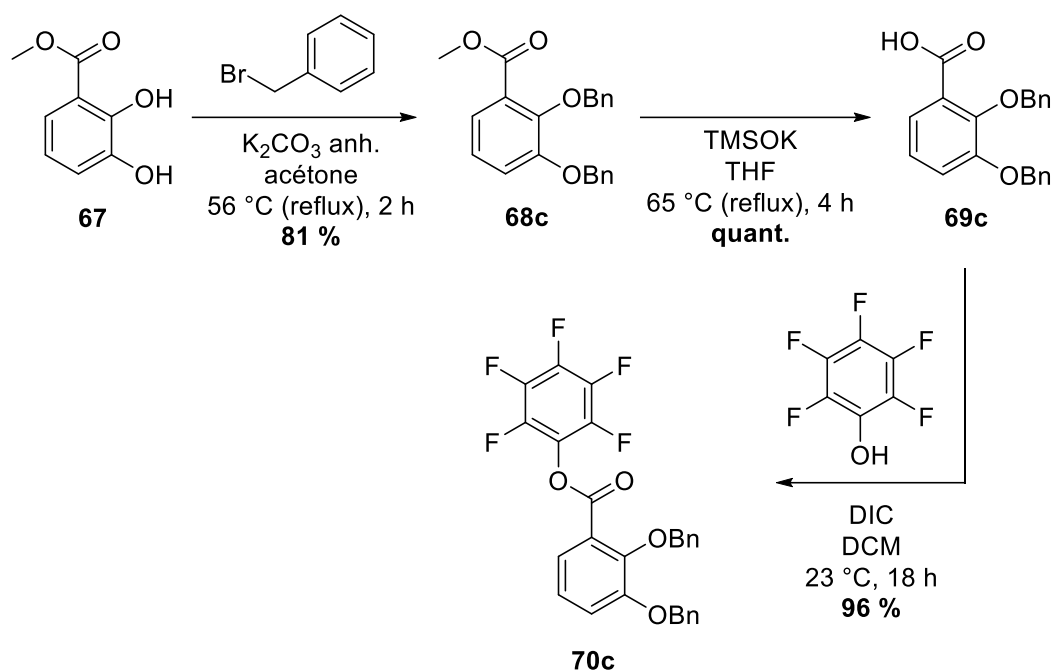


Schéma 19. Synthèse du synthon **70c**.

E. Tentatives de synthèse des vecteurs catéchols acétylés

Avant de débiter la synthèse du TCV **63** coûteuse en termes d'étapes et de précurseurs, nous avons décidé de tester la réaction d'acylation entre le synthon acétylé **70b** et un dérivé de la lysine commerciale afin d'obtenir le BCV acétylé **64b**.

La première étape de synthèse consiste à traiter la lysine commerciale **89** dont les fonctions amines sont protégées par des groupements Boc, en présence de propargylamine **75** et d'EDC.HCl dans du DCM, selon des conditions adaptées de la littérature.¹²¹ Après 3 jours à 26 °C, le dérivé lysinate **90** est obtenu avec 64 % de rendement (**Schéma 20**). Le produit **90** est ensuite traité par une solution de TFA dans du DCM (30 % v/v) et la diamine libre obtenue est directement engagée dans la réaction d'acylation avec **70b**. Deux voies de synthèse ont été testées pour cette étape. La voie n°1 (**Schéma 20**) utilise les conditions de PINKERT *et al.*¹¹⁵ : la diamine est dissoute dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (0,5 M), puis une solution de l'ester activé **70b** dans du 1,4-dioxane y est ajoutée goutte à goutte à 0 °C. Cependant, le produit attendu **64b**, bien que présent dans le brut réactionnel d'après la LC/MS, n'était pas majoritaire au sein d'un mélange complexe et difficilement purifiable. Nous

nous sommes ensuite inspirés de conditions décrites par notre équipe sur des molécules similaires (voie n°2, **Schéma 20**)¹¹² : la diamine est dissoute dans un mélange DIPEA/DCM/THF, puis une solution de l'estér activé **70b** dans du DCM y est ajoutée à 20 °C. Après 19 heures à 27 °C, le mélange réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice et deux fractions majoritaires ont été récupérées puis analysées par LC/MS. Les résultats de ces analyses montrent que le produit attendu **64b** est présent, mais seulement en quantité minoritaire dans un mélange complexe d'autres molécules acétylées ayant perdu un à deux acétyles sur les quatre présents.

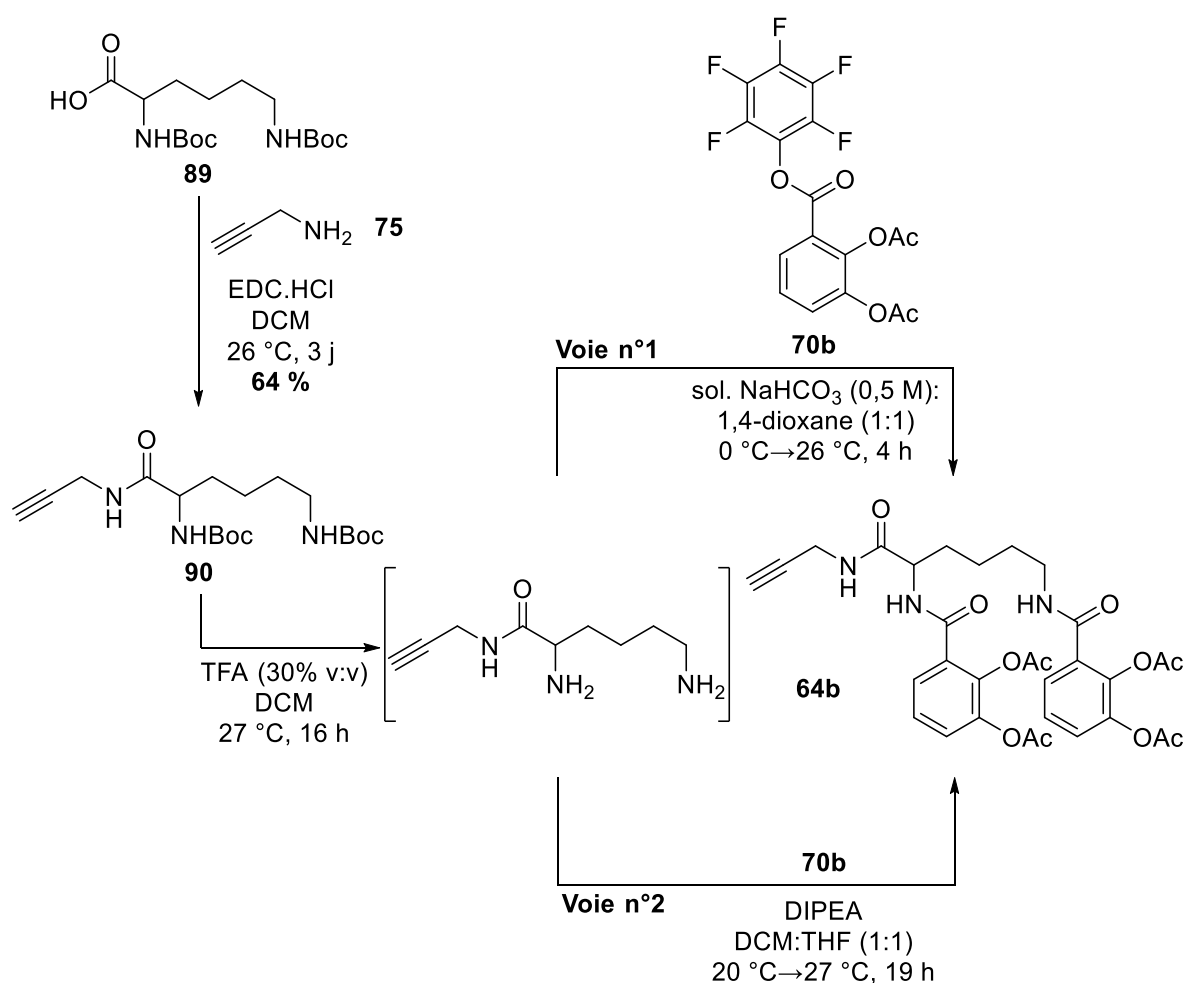


Schéma 20. Tentatives de synthèse du BCV acétylé **64b**.

Cette stratégie utilisant le synthon catéchol protégé par des Ac a donc été abandonnée précocement. Les problèmes rencontrés avec la lysine auraient probablement été encore plus importants dans la synthèse du TCV hexa-acétylé. Nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation des catéchols protégés par des groupements PMB.

F. Synthèse du TCV-dpa 82

1. Synthèse du châssis tris-carbamate 79

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le TCV a été synthétisé dans le cadre de ce projet grâce à une voie de synthèse alternative à celle décrite antérieurement par notre équipe.¹¹² Cette voie de synthèse, développée par Mathilde MUNIER (post-doc de notre équipe) et optimisée par mes soins, a été utilisée dans cette thèse.

Cette synthèse débute avec la molécule commerciale **76** qui est traitée avec de la propargylamine **75** en présence d'HOBt et EDC.HCl dans du DCM. Le produit **77** est ainsi obtenu avec 85 % de rendement (**Schéma 21**). Cette molécule a ses fonctions amines protégées par deux groupements protecteurs différents, orthogonaux entre eux, afin de pouvoir réaliser une déprotection spécifique d'une amine par rapport à l'autre. De plus, la fonction alcyne nouvellement introduite permettra de réaliser des réactions de chimie click dans la suite de la synthèse.

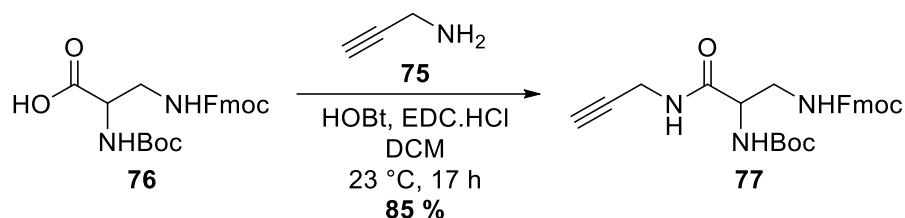


Schéma 21. Synthèse de la molécule **77**.

La deuxième partie du châssis **79** est synthétisée à partir de la glycine commerciale **87** mise en réaction avec du pentafluorophénol et du *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans du DCM. Après 18 heures à 23 °C, le produit **91** obtenu est directement traité avec le dérivé de DAP commercial **88** en présence de DIPEA dans du THF. Le bis-carbamate **92** est ainsi obtenu avec 73 % de rendement sur 2 étapes (**Schéma 22**).



Schéma 23. Synthèse du châssis tris-carbamate **79**.

Face aux problèmes rencontrés avec le synthon catéchol acétylé, nous avons choisi d'utiliser le catéchol **70d** protégé avec des groupes PMB et de le coupler au châssis **79** afin de pouvoir synthétiser le TCV **63d**. La première étape consiste à traiter la molécule **79** par une solution de TFA dans du DCM (30 % v/v) pendant 18 heures à 24 °C. La triamine résultante est ensuite mise en réaction avec le synthon catéchol **70d** en présence de DIPEA dans du THF. Après 3 jours à 24 °C, le TCV **63d** attendu est obtenu avec 77 % de rendement (**Schéma 24**).

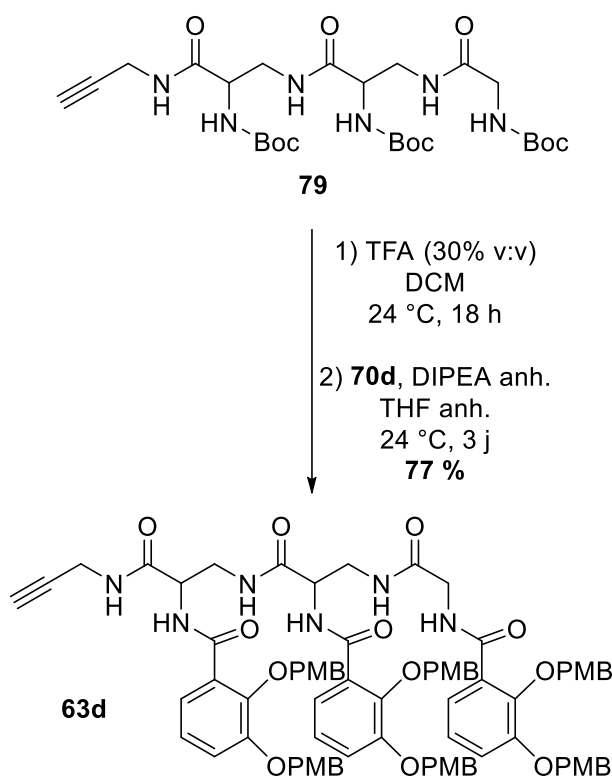


Schéma 24. Synthèse du TCV 63d.

Une fois le TCV **63d** synthétisé, nous avons réalisé une réaction de chimie click entre l'alkyne du TCV **63d** et l'azoture du ligand dpa **55** dont la synthèse a été décrite dans la Partie II – Chapitre I – C. 2. Ces deux molécules sont mises en réaction en présence d'un excès de Cu(II) (solution aqueuse de CuSO₄) et d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/H₂O. Après 21 heures à 28 °C, le conjugué TCV-dpa **82d** est obtenu avec 32 % de rendement (**Schéma 25**). Ce rendement perfectible est lié à une purification complexe qui nous a fait privilégier « la qualité à la quantité ».

Nous souhaitons vérifier que le conjugué puisse être déprotégé avant l'insertion de l'iridium(III). Les complexes d'iridium(III) et de dpa étant sensibles aux conditions acides drastiques, le produit **82d** est traité par une solution diluée de TFA dans du DCM (5 % v/v) en présence de triisopropylsilane (TIPS) pendant 23 heures à 29 °C. Cependant, une réaction surprenante a eu lieu : en plus du clivage des PMB, une hydrolyse de la fonction amide du ligand dpa a aussi eu lieu conduisant aux produits **93** et **94** (**Schéma 25, Figure 40**). Cela pose problème, car le ligand dpa est l'élément permettant de coordonner à l'iridium(III). Néanmoins, nous verrons plus tard que cette réactivité inattendue a pu être mise à profit dans un projet parallèle.

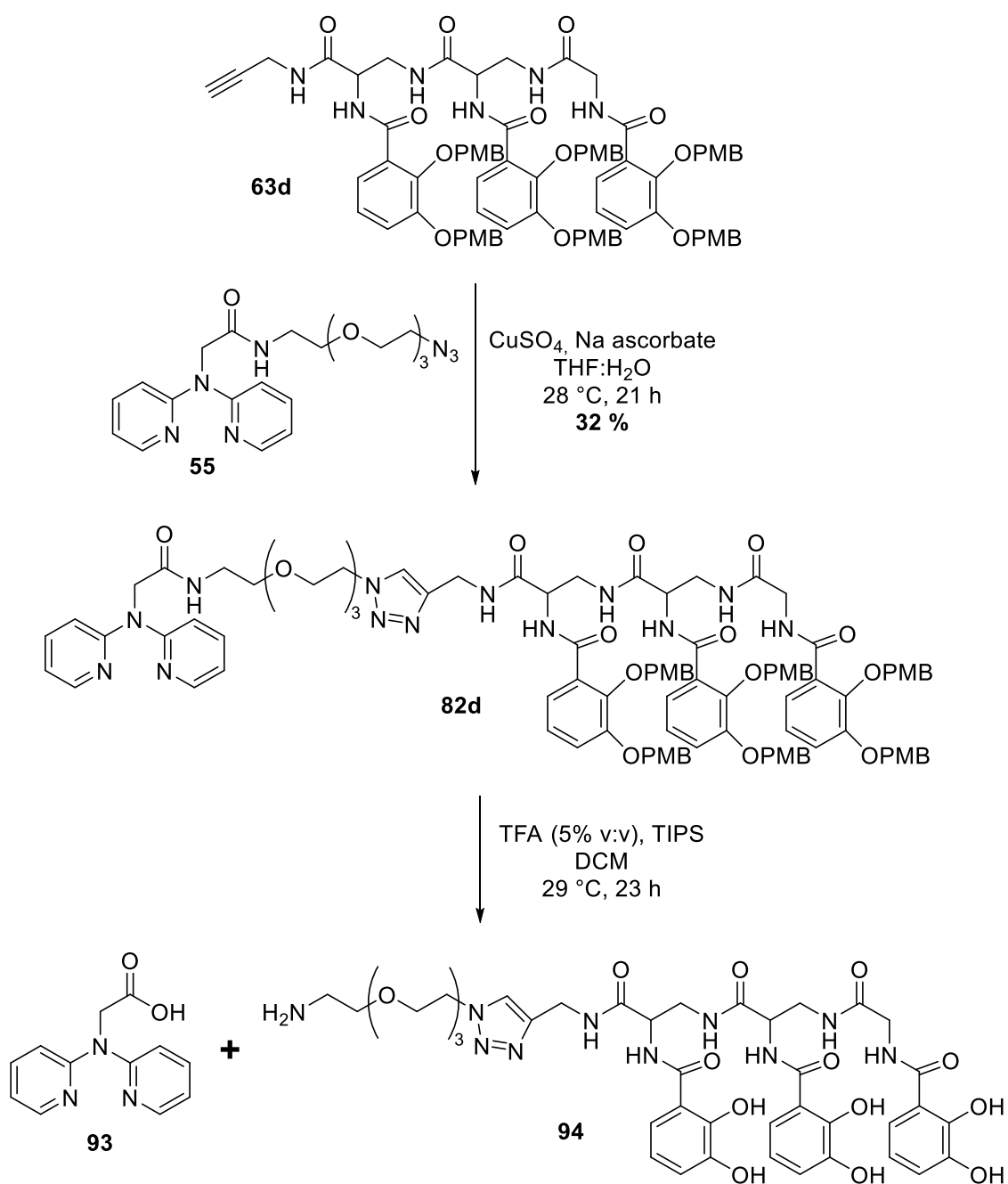


Schéma 25. Synthèse du conjugué TCV-dpa **82d** et tentative de déprotection des fonctions catéchols.

Ainsi, nous avons tenté de changer l'ordre des étapes de synthèse et commencé par la déprotection des catéchols en amont de la réaction de chimie click.

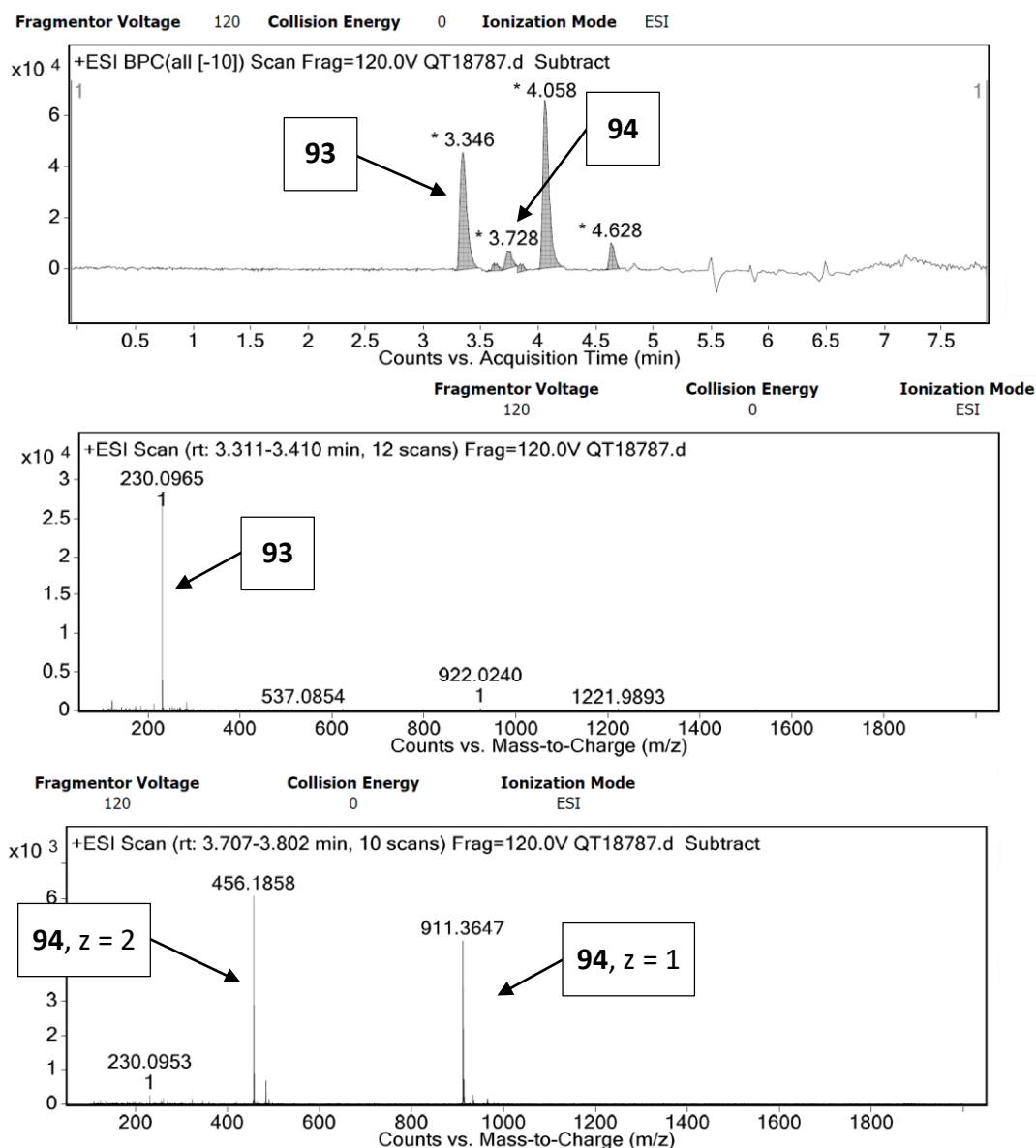


Figure 40. LC/MS-BR de la réaction de déprotection du conjugué **82d** ($M_{93} = 229,09 \text{ g.mol}^{-1}$; $M_{94} = 910,35 \text{ g.mol}^{-1}$).

Le TCV **63d** est traité par une solution de TFA dans du DCM (5 % v/v) en présence de TIPS pendant 22 heures à 23 °C. Le TCV déprotégé **63** obtenu avec 47 % de rendement est ensuite mis en réaction avec le ligand **55** en présence de $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$ et d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/ H_2O . Même après 8 jours à 24 °C, le produit attendu **82** n'a été détecté que minoritairement par LC/MS au sein d'un mélange réactionnel complexe (**Schéma 26**). Ce résultat pourrait être lié à la chélation du cuivre ionique par les fonctions catéchols libres. Ce résultat montre aussi l'importance de garder les fonctions chélatrices inertes jusqu'aux toutes dernières étapes des synthèses.

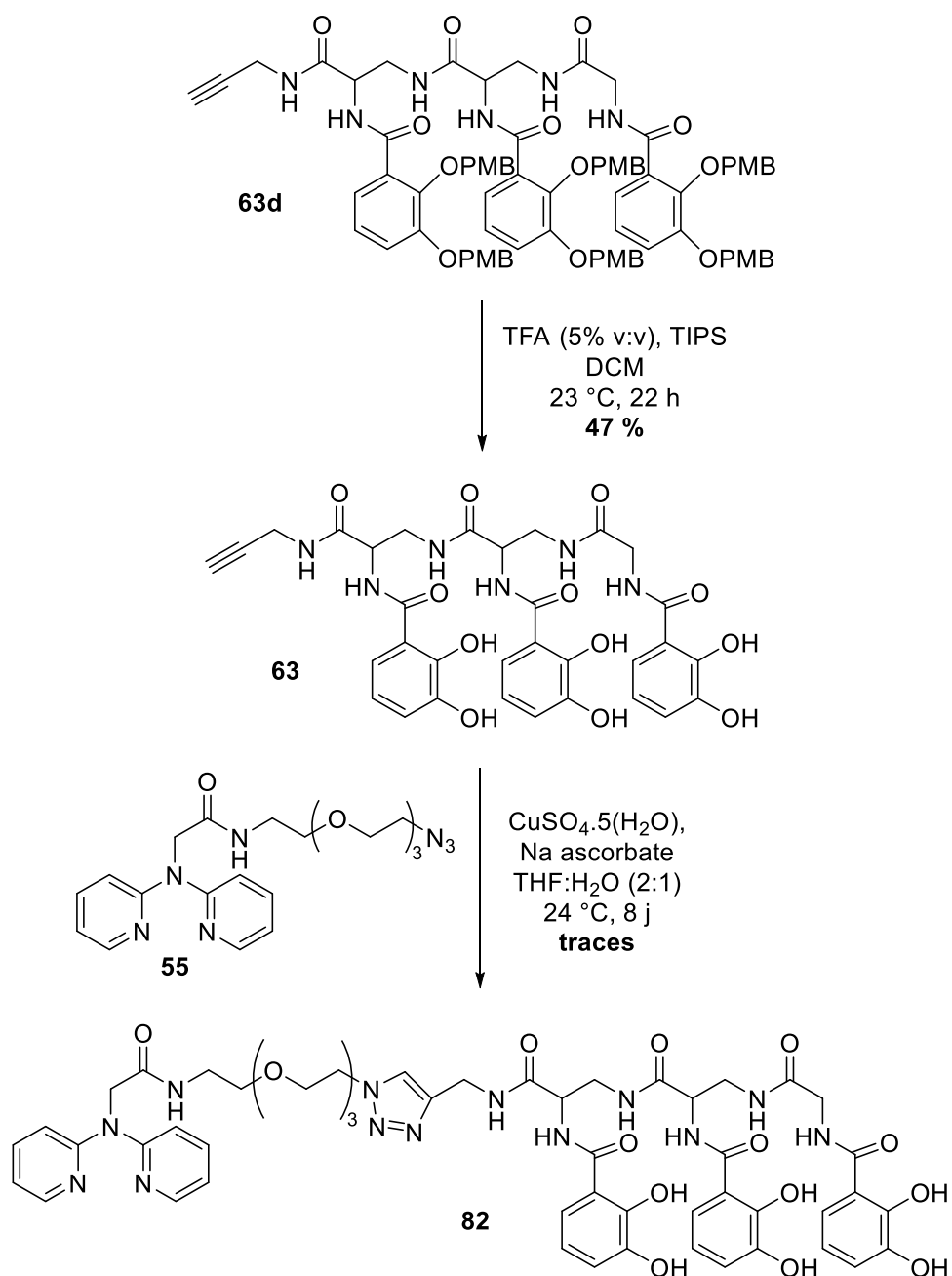


Schéma 26. Tentative de synthèse du conjugué TCV-dpa **82**.

Compte tenu de ce résultat, nous avons changé de stratégie en augmentant la longueur de la chaîne carbonée du ligand dpa afin d'éviter l'hydrolyse de la fonction amide en présence de TFA. Le ligand dpa muni d'une extension valérate a ainsi été choisi.

G. Synthèse des vecteurs catécholés munis d'un ligand dpa valérate

1. Synthèse du ligand dpa valérate **84**

Face aux problèmes rencontrés avec le ligand di(pyridin-2-yl)glycine, nous avons souhaité augmenter la longueur de la chaîne carbonée connectant la dpa. Nous nous sommes tournés vers le substituant valérate (5 atomes de carbone), en raison de la disponibilité d'un précurseur commercial bromé et sur la base d'une étude très poussée du mécanisme (voir Chapitre III).

La voie de synthèse du ligand dpa **84** reprend les protocoles utilisés pour la voie de synthèse du ligand dpa **55** décrite dans la Partie II – Chapitre I – C. 2. La première étape de synthèse consiste à alkyler l'amine de la dpa **52** grâce à un dérivé valérate bromé et en présence de KOH dans du DMSO. L'ajout du dérivé bromé est de nouveau réalisé goutte à goutte et à 13 °C afin d'éviter la saponification de l'ester. L'ester *t*-butylique **95** ainsi obtenu est ensuite traité par une solution de TFA dans du DCM (20 % v/v) afin d'obtenir la dpa acide **85**. Le ligand dpa **85** est mis en réaction avec le 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol-1-amine commercial **58** en présence de DIPEA et EDC.HCl dans du DCM pour conduire au ligand **84** attendu avec un rendement global de 66 % sur 3 étapes (**Schéma 27**).

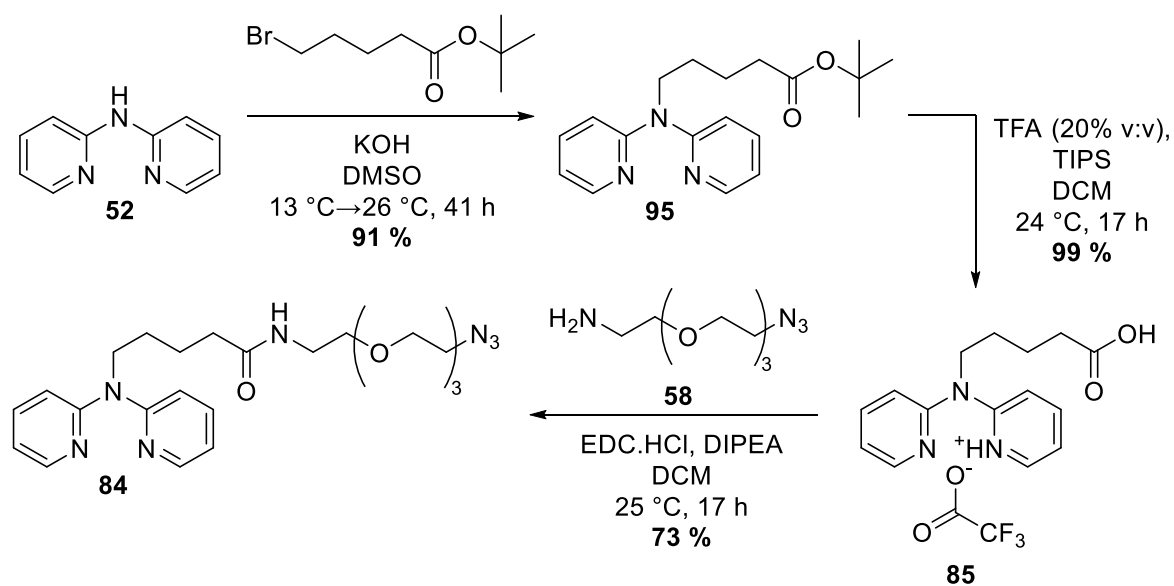


Schéma 27. Synthèse du ligand **84**.

Lors de la dernière étape de cette synthèse, un produit secondaire se forme et correspond au couplage de l'azoture commercial **58** avec du TFA (**Figure 41**). Ce sous-produit **96** est difficilement séparable du produit **84** par purification chromatographique ce qui explique un rendement perfectible. Le sous-produit équivalent n'est pas observé lors de la synthèse du ligand **55** (**Schéma 5**), car il n'est probablement pas co-élué lors de la purification de cette expérience.

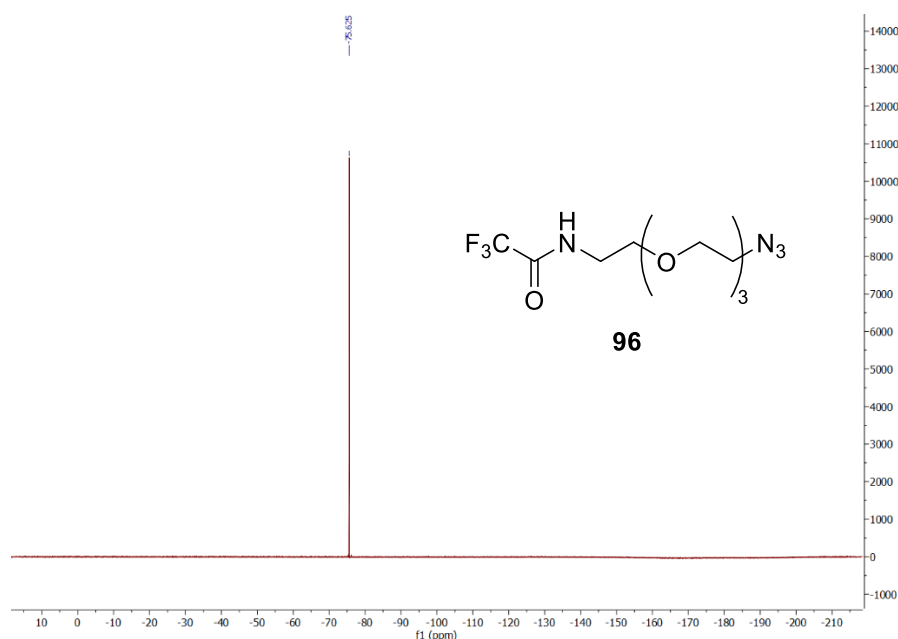


Figure 41. Spectre RMN ^{19}F du sous-produit fluoré **96** formé au cours de la synthèse de **84**.

2. Synthèse des conjugués non iridiés

La réaction de chimie click a ensuite été réalisée entre l'alcyne du TCV **63d** et l'azoture du ligand **84**. Ces deux molécules sont mises en réaction en présence d'un excès de Cu(II) (solution aqueuse de CuSO_4) et d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/ H_2O . Après 20 heures à 23 °C, le conjugué TCV-dpa **83d** est obtenu avec 46 % de rendement (**Schéma 28**). Une fois encore, nous avons privilégié « la qualité à la quantité ». Le rendement moyen de cette réaction est d'environ 70 % (estimation par RMN), mais une purification complexe (nombreux sous-produits) diminue sensiblement le rendement final. Les sous-produits correspondent à des molécules du produit **83d** dont des groupes PMB ont été clivés.

Le conjugué TCV-dpa **83d** est traité par une solution de TFA dans du DCM (5 % v/v) en présence de TIPS pendant 18 heures à 23 °C. Le conjugué déprotégé **83** est obtenu avec 90 % de rendement (**Schéma 28**), sans problème d'hydrolyse de la fonction amide cette fois-ci.

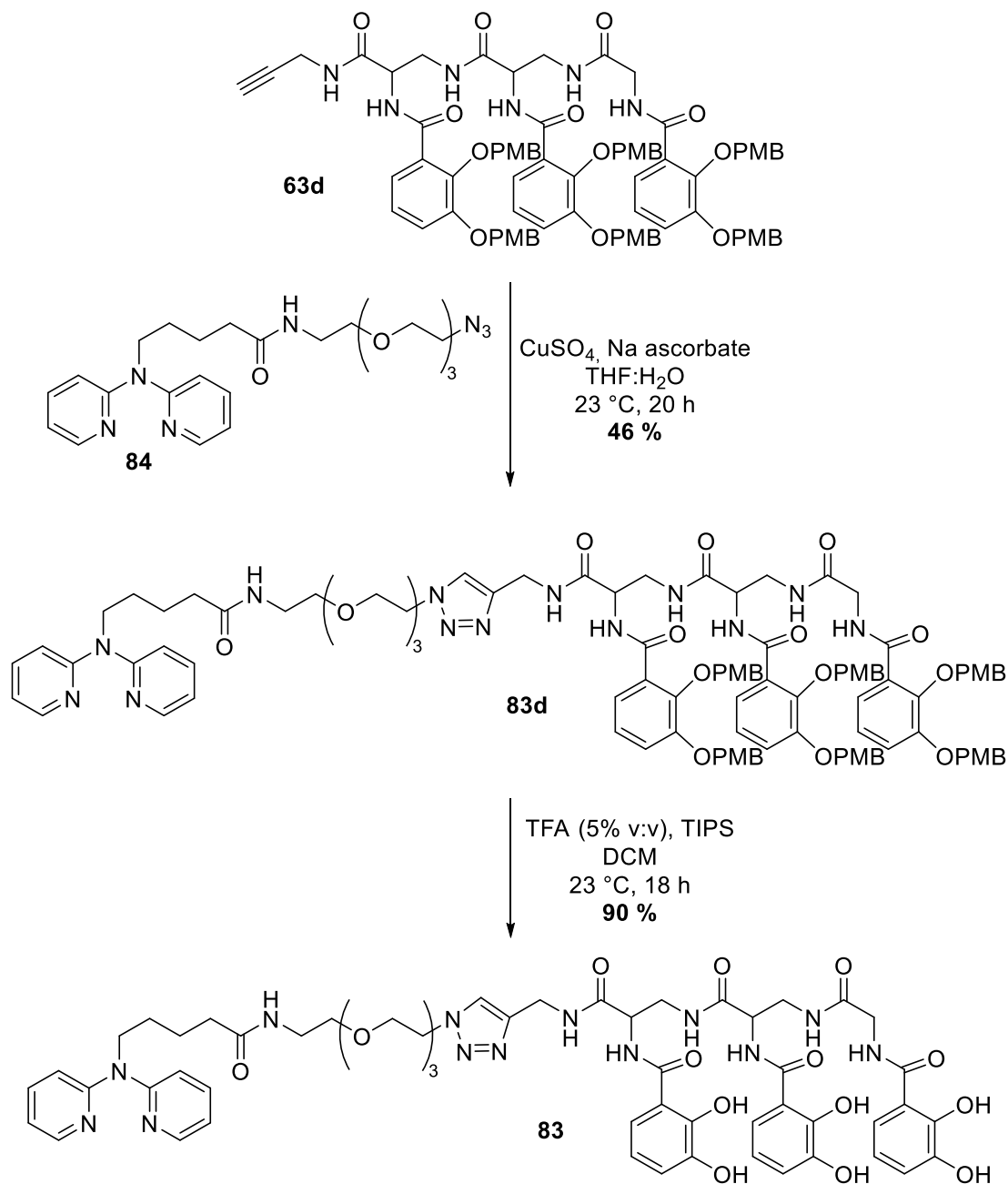


Schéma 28. Synthèse du conjugué TCV-dpa **83**.

Cette voie de synthèse ainsi validée a pu être élargie aux MCV-dpa **97d** et BCV-dpa **98d** (**Figure 42**) dont les synthèses ont été réalisées par d'autres membres de l'équipe (principalement Françoise HOEGY) à partir des synthons **70d** et **84** que j'ai synthétisés.

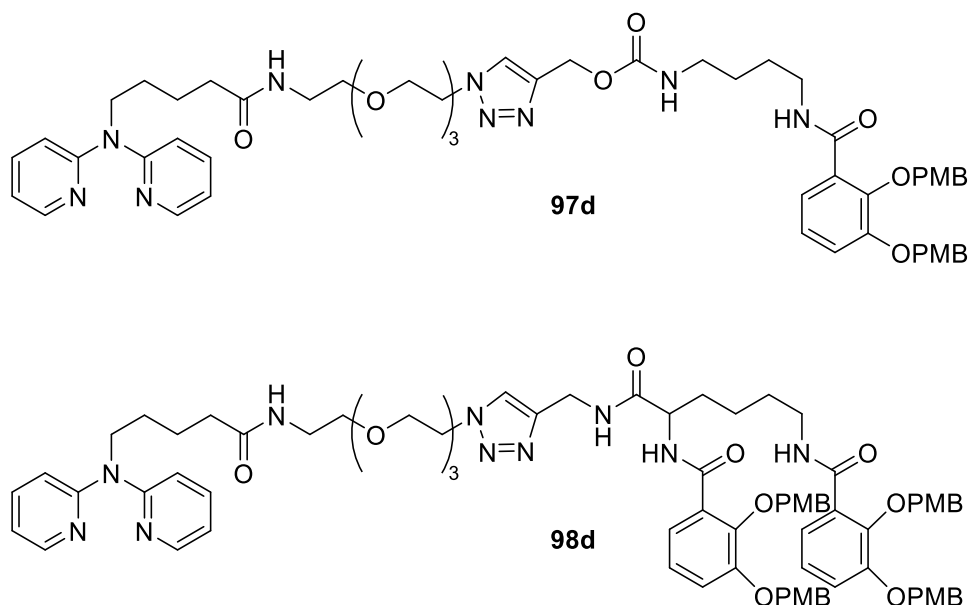


Figure 42. Conjugués MCV-dpa **97d** et BCV-dpa **98d** possédant une chaîne valérate et dont les catéchols sont protégés par des groupes PMB.

3. Tentatives de coordination à l'iridium(III)

La coordination à l'iridium(III) a été réalisée par nos collaborateurs à Caen selon le schéma général ci-dessous (**Schéma 29**) d'après la réaction de Nonoyama.¹⁰³

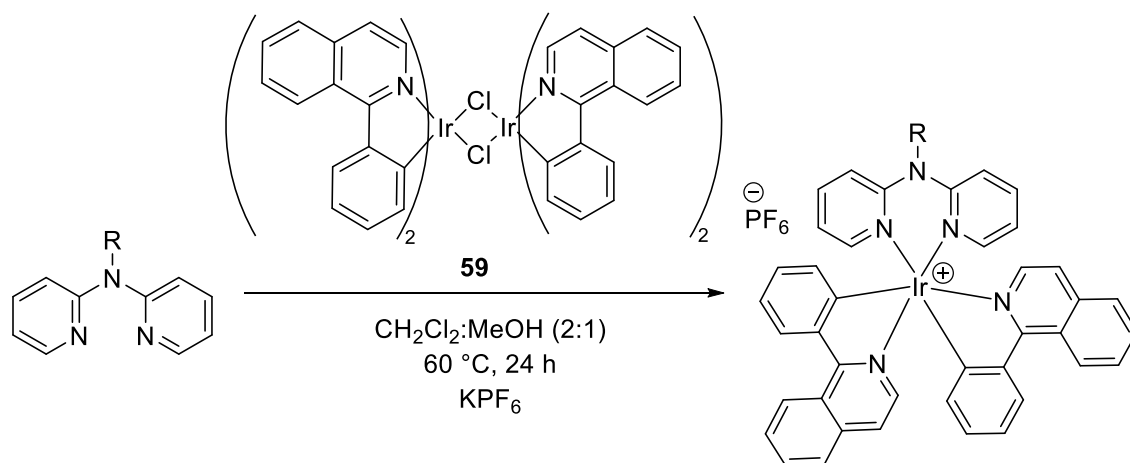


Schéma 29. Réaction de coordination entre un ligand dpa *N*-substitué et le dimère d'iridium(III) **59**.

La synthèse du TCV étant, comme nous l'avons mentionné précédemment, longue et consommatrice de produits de départ onéreux, nous avons voulu tester dans un premier temps la coordination à l'iridium(III) sur le MCV-dpa **97d** et le BCV-dpa **98d**, accessibles en plus grande quantité par des voies de synthèse plus courtes. Les conjugués iridiés **99d** et **100d**

Chemical structures of Ir(III) complexes **99d** and **100d** are shown. Both complexes feature an Ir(III) center coordinated by two 1,2-phenanthroline ligands and a 4,4'-bipyridine ligand. The 4,4'-bipyridine ligand is substituted with a long alkyl chain containing a triazole ring and a terminal amide group. The amide group is linked to a 2,6-dimethoxyphenyl group. The counterion is PF₆⁻.

Les groupes PMB peuvent aussi être éliminés par l'action du TFA. Malheureusement, de façon prévisible, ces conditions n'étaient pas compatibles avec les complexes azotés de l'iridium(III). Nous avons donc dû reprendre ces synthèses en utilisant un autre groupement protecteur : le groupe benzyle (Bn), réputé plus facile à éliminer par hydrogénolyse que le groupe PMB.¹²²

H. Synthèse des vecteurs catéchols benzylés munis d'un ligand dpa valérate et de leurs dérivés iridiés

1. Synthèse des ligands sidérophore-dpa

La nouvelle stratégie de synthèse des conjugués sidérophore-dpa consiste à protéger les fonctions catéchols par des groupements protecteurs Bn puis de réaliser une réaction de chimie click entre la fonction alcyne du sidérophore et l'azoture du ligand dpa **84**.

Dans un premier temps, le conjugué MCV-dpa **97c** a été synthétisé en s'inspirant d'une procédure décrite par notre équipe.⁵⁸ Une solution de l'ester activé **70c** est ajoutée goutte à goutte à une solution diluée de 1,4-diaminobutane afin de favoriser la mono-fonctionnalisation de cette amine. Le produit **71c** obtenu avec 98 % de rendement est ensuite mis en réaction avec le chloroformiate de propargyle en présence de DIPEA. Après 6 heures à 24 °C, le MCV **65c** est obtenu avec 98 % de rendement. Puis la réaction de chimie click est réalisée entre **65c** et le ligand dpa **84** en présence d'un excès de Cu(II) (solution aqueuse de CuSO₄) et d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/H₂O conduisant au conjugué MCV-dpa **97c** obtenu avec 73 % de rendement (**Schéma 30**).

Dans le cas du ligand BCV-dpa **98c**, une partie de la synthèse a été réalisée par d'autres membres de l'équipe (Françoise HOEGY et Élise CHARRIER). Le produit **64c** fourni a été mis en réaction avec le ligand **84** en présence d'un excès de Cu(II) (solution aqueuse de CuSO₄) et d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/H₂O. Après 2 jours à 25 °C, le produit **98c** attendu est obtenu avec 52 % de rendement (**Schéma 31**).

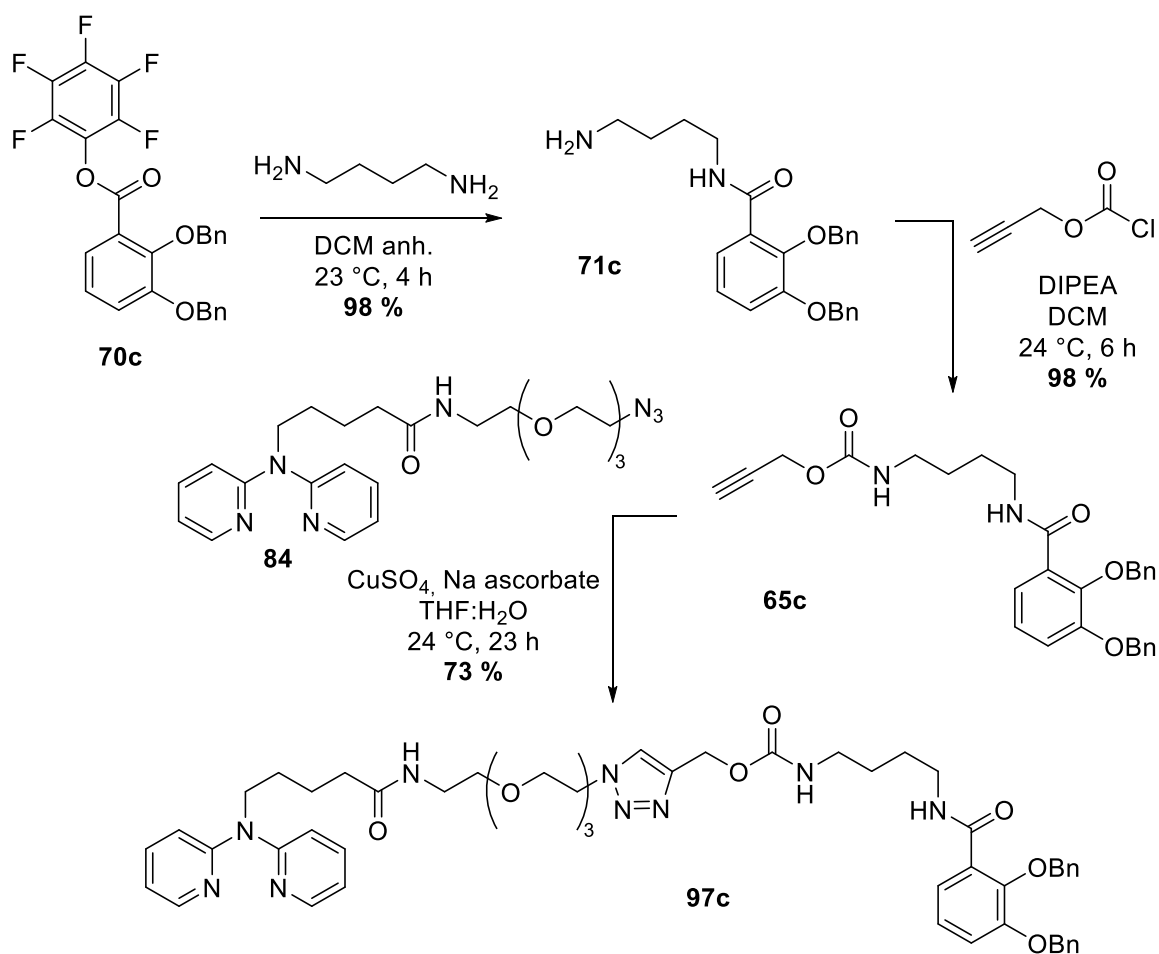


Schéma 30. Synthèse du conjugué MCV-dpa **97c**.

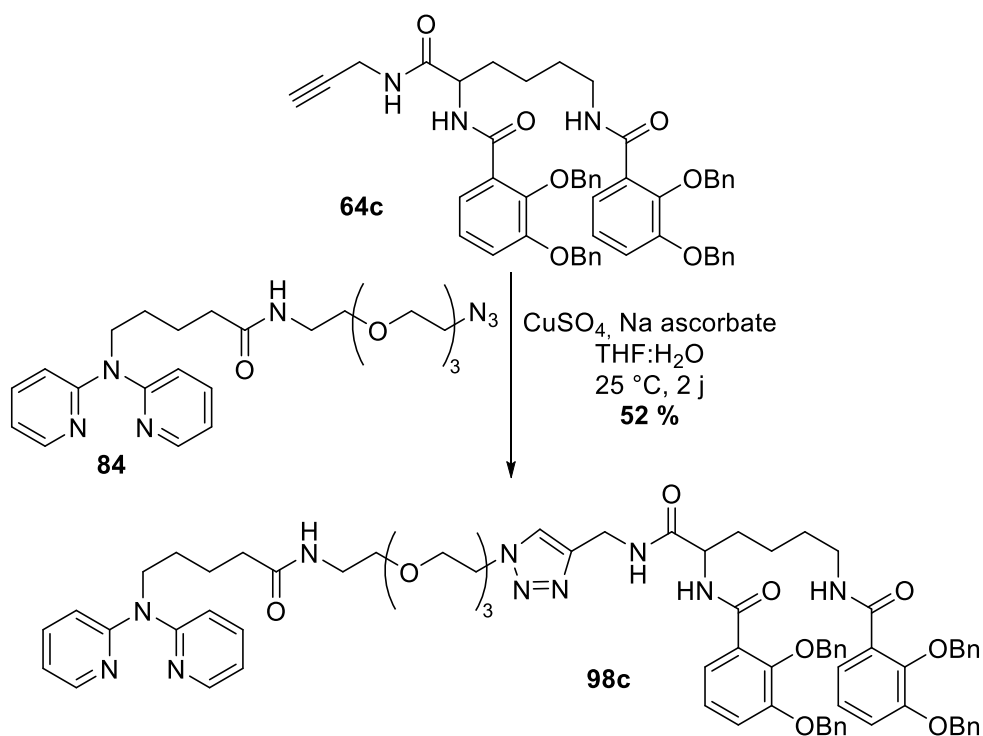


Schéma 31. Synthèse du conjugué BCV-dpa **98c**.

Enfin, la synthèse du ligand TCV-dpa **83c** commence par le traitement du châssis tris-carbamate **79** par une solution de TFA dans du DCM (30 % v/v) pendant 23 heures à 31 °C. La triamine résultante est ensuite mise en réaction avec le synthon catéchol **70c** en présence de DIPEA. Après 3 jours à 31 °C, le TCV **63c** est obtenu avec 69 % de rendement. La réaction de chimie click entre cette molécule et le ligand **84** est réalisée en présence d'un excès de Cu(II) (solution aqueuse de CuSO₄) et d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/H₂O pour conduire au conjugué TCV-dpa **83c** obtenu avec 73 % de rendement (**Schéma 32**).

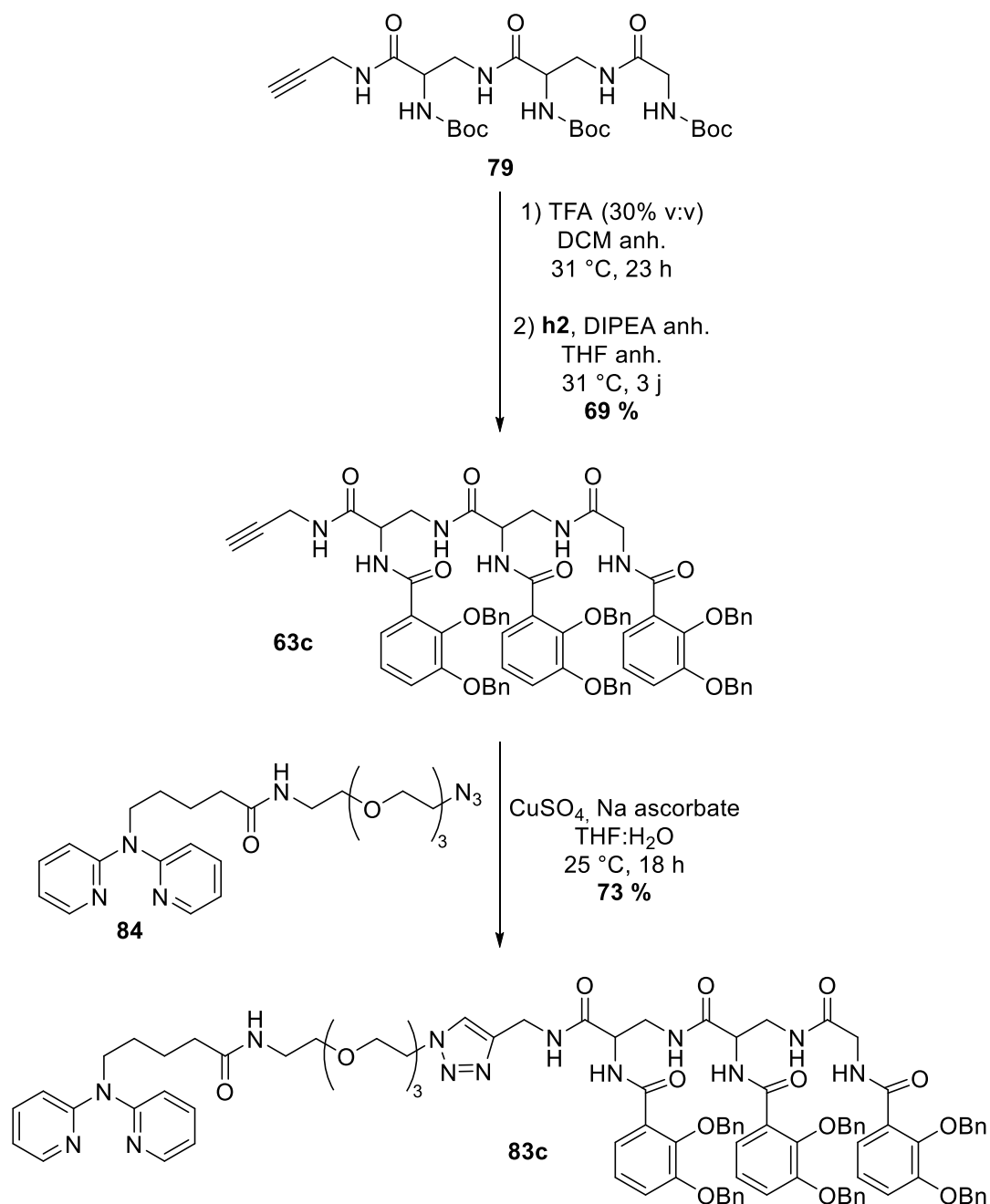


Schéma 32. Synthèse du conjugué TCV-dpa **83c**.

Nous avons ainsi pu obtenir nos trois ligands sidérophore-dpa possédant des catéchols protégés par des groupes Bn, qui seront ensuite coordonnés à l'iridium(III).

2. Coordination à l'iridium(III)

La coordination à l'iridium(III) a été réalisée par nos collaborateurs à Caen selon la réaction du **Schéma 29** et a d'abord été testée sur le MCV-dpa **97c** et le BCV-dpa **98c** pour déterminer les conditions de coordination ainsi que de déprotection optimales afin d'épargner le TCV **83c** dans un premier temps.

Les conjugués MCV-Ir(III) **99c** et BCV-Ir(III) **100c** ont ainsi été synthétisés (**Figure 44**) et leur formation confirmée par spectrométrie de masse. À l'heure de rédiger ce manuscrit, ils sont en cours de purification chez nos collaborateurs caennais.

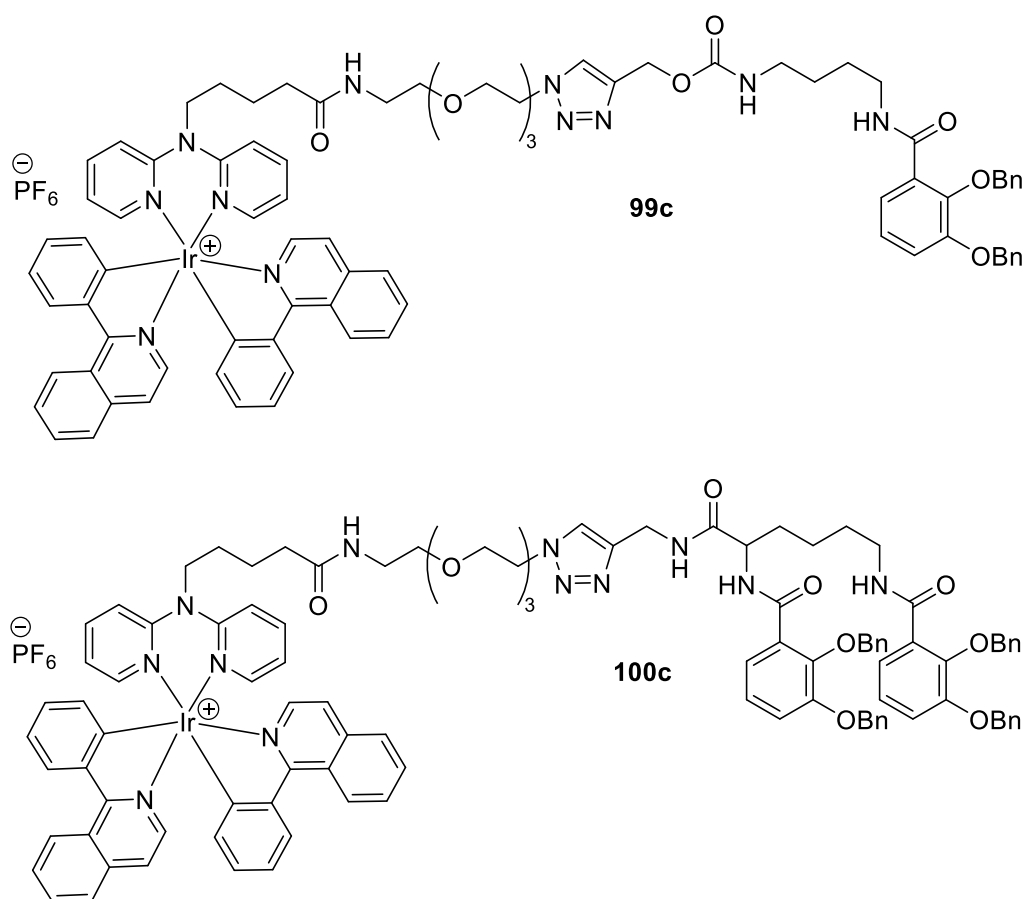


Figure 44. Structures des conjugués MCV-Ir(III) **99c** et BCV-Ir(III) **100c**.

Les conjugués **99c** et **100c** seront ensuite soumis à une hydrogénolyse pour libérer les fonctions catéchols. En cas de succès, la procédure sera étendue au TCV **83c**.

Afin de s'assurer de l'obtention de conjugués entre des sidérophores catécholés et des complexes d'iridium(III), une dernière stratégie de synthèse a été développée en parallèle.

I. Stratégie alternative pour la synthèse des conjugués sidérophore catéchol-Ir(III)

1. Rétrosynthèse

Cette nouvelle stratégie pourrait permettre de synthétiser nos conjugués cibles en s'appuyant sur la rétrosynthèse détaillée dans le **Schéma 33** pour le TCV. Une démarche identique est applicable au MCV et au BCV.

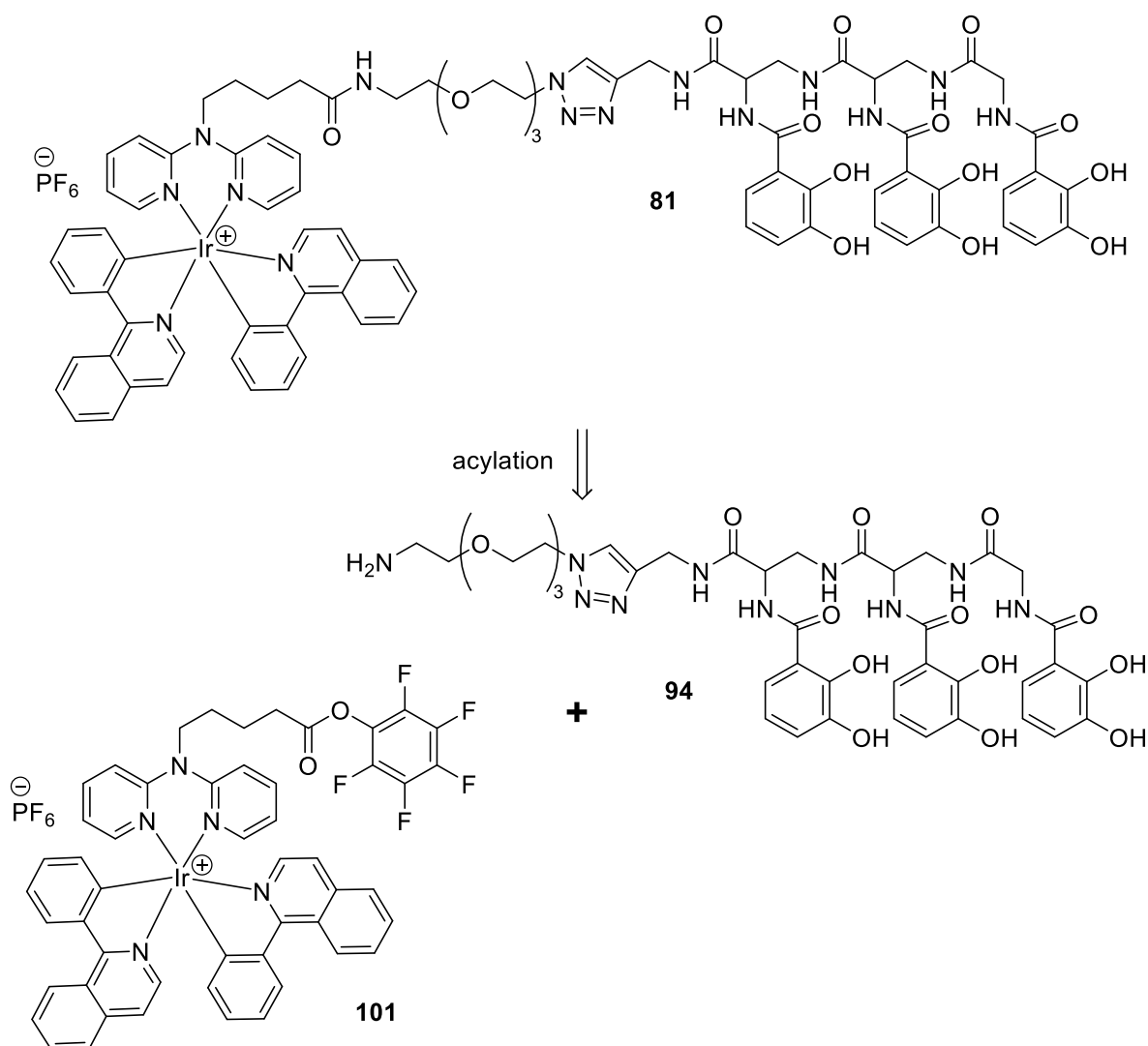


Schéma 33. Rétrosynthèse du conjugué **81** entre le TCV **94** et le complexe d'Ir(III) **101**.

Le conjugué cible **81** pourrait aussi être le résultat de la réaction d'acylation entre le TCV déprotégé **94** possédant une amine terminale au bout du bras espaceur et l'ester activé **101** de pentafluorophénol du complexe d'iridium (**Schéma 33**).

Le complexe d'iridium(III) **101** peut être synthétisé à partir du ligand dpa acide **104** en passant par deux étapes principales : la coordination à l'iridium(III) et l'activation de l'acide en ester activé de pentafluorophénol. Nous verrons que ces deux étapes ont nécessité le passage par les esters benzylés **105/103** du ligand dpa (**Schéma 34**).

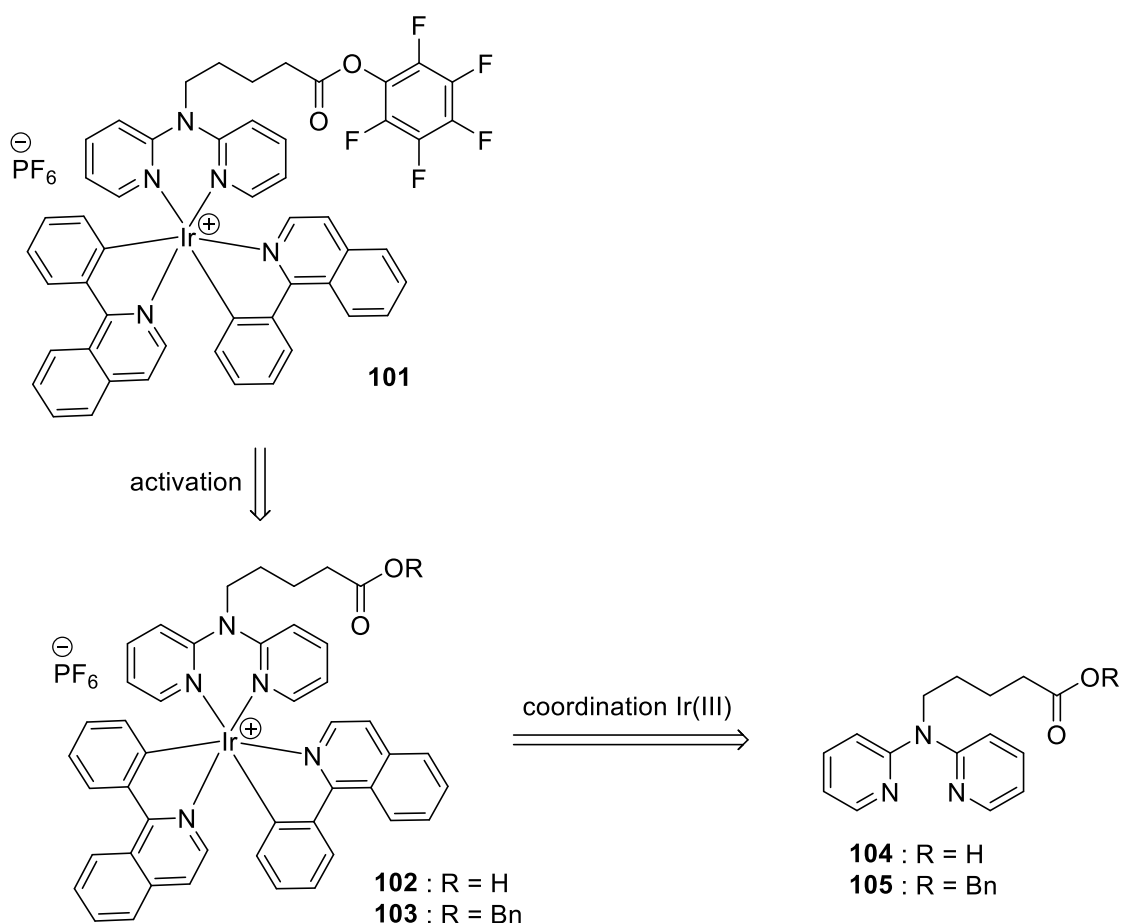


Schéma 34. Rétrosynthèse du complexe d'Ir(III) **101**.

Le TCV **94** est composé de deux fragments : le TCV protégé par des groupes Bn **63c** dont la synthèse a été décrite précédemment, et l'azoture **107** possédant une amine terminale protégée par un groupement Cbz. L'avantage d'utiliser ces deux groupements protecteurs sur une même molécule est lié à l'étape de déprotection. En effet, les groupes Bn et Cbz peuvent être clivés dans les mêmes conditions d'hydrogénolyse et donc obtenir la molécule recherchée **94** en une étape après la réaction de clivage (**Schéma 35**). L'azoture **107**

provient de la réaction de protection de l'amine de la molécule commerciale **58** et déjà utilisée précédemment dans ce projet.

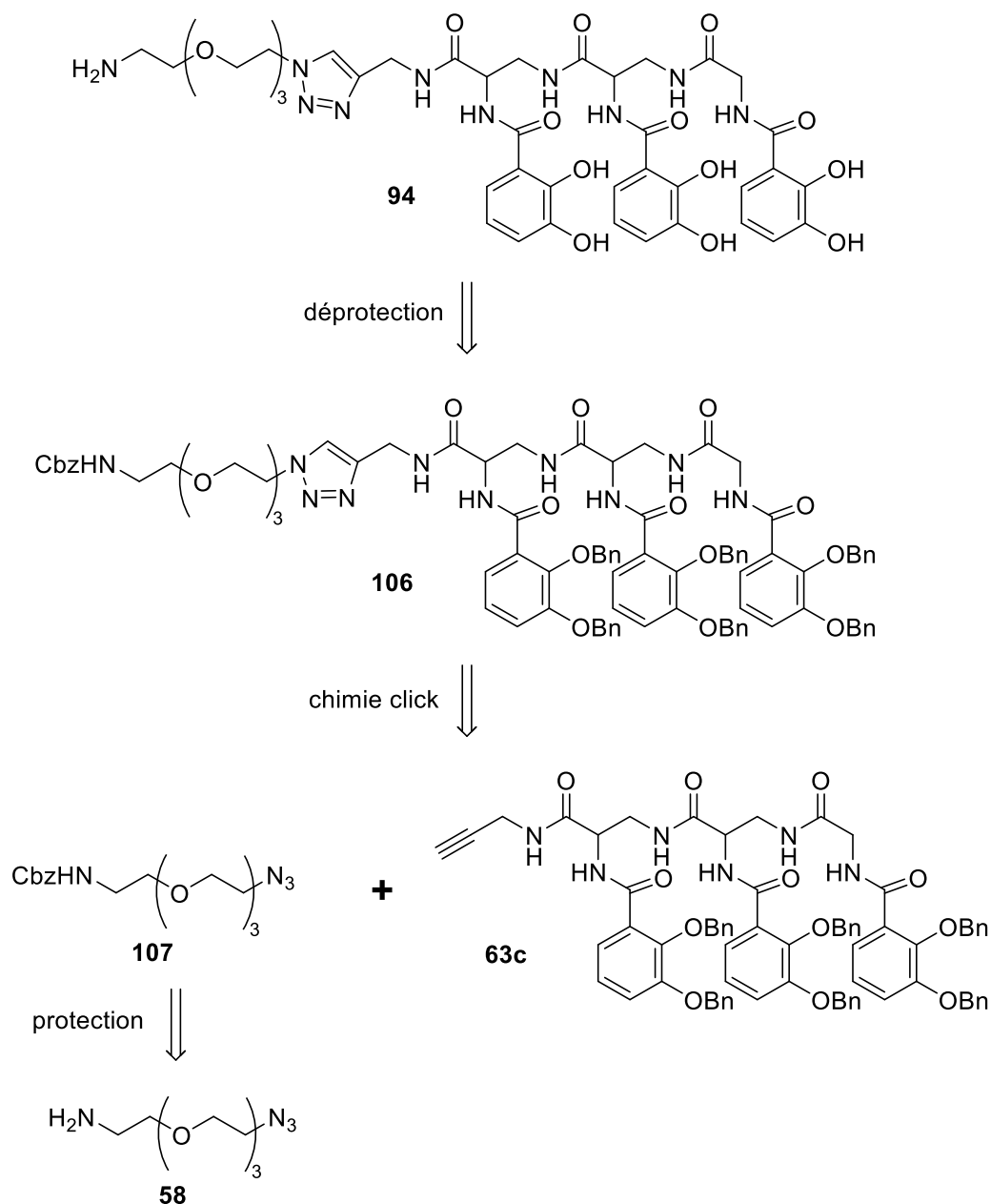


Schéma 35. Rétrosynthèse du conjugué **94** entre le TCV **63c** et l'azoture **107**.

2. Synthèse de l'azoture **107** et réactions de chimie click sur des vecteurs catécholés

Comme nous l'avons mentionné dans la partie précédente, le clivage des groupements protecteurs lorsque l'iridium(III) coordonné à la dpa est présent sur la molécule est

problématique. Ainsi, nous avons envisagé une voie de synthèse où l'ajout de la dpa et de l'iridium(III) est réalisé lors de l'ultime étape.

L'amine commerciale **58** est mise en réaction avec le chloroformiate de benzyle en présence de DIPEA dans du DCM. Après 2 jours à 25 °C, le produit **107** est obtenu avec 89 % de rendement (**Schéma 36**).

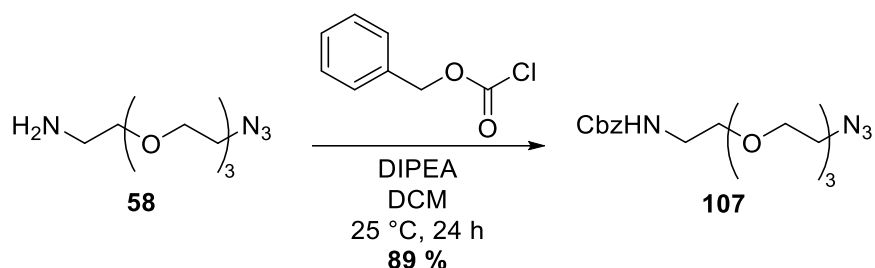


Schéma 36. Synthèse de l'azoture **107**.

L'étape suivante est la réaction de chimie click entre l'azoture de **107** et la fonction alcyne du TCV **63c** suivant le protocole habituel de notre équipe : excès de Cu(II) (solution aqueuse de CuSO₄) et d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/H₂O. Après 2 jours à 27 °C, le produit de click **106** est obtenu avec 86 % de rendement (**Schéma 37**).

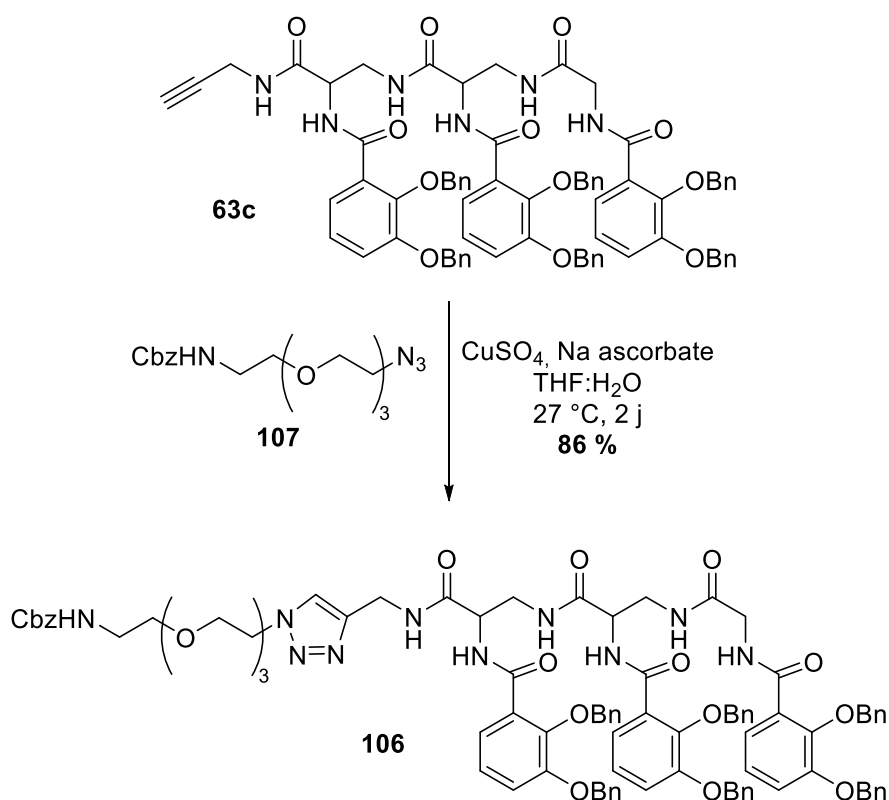


Schéma 37. Synthèse du TCV **106**.

Cette réaction de chimie click a aussi été effectuée sur le MCV **65c** pour former le composé **108** (Schéma 38).

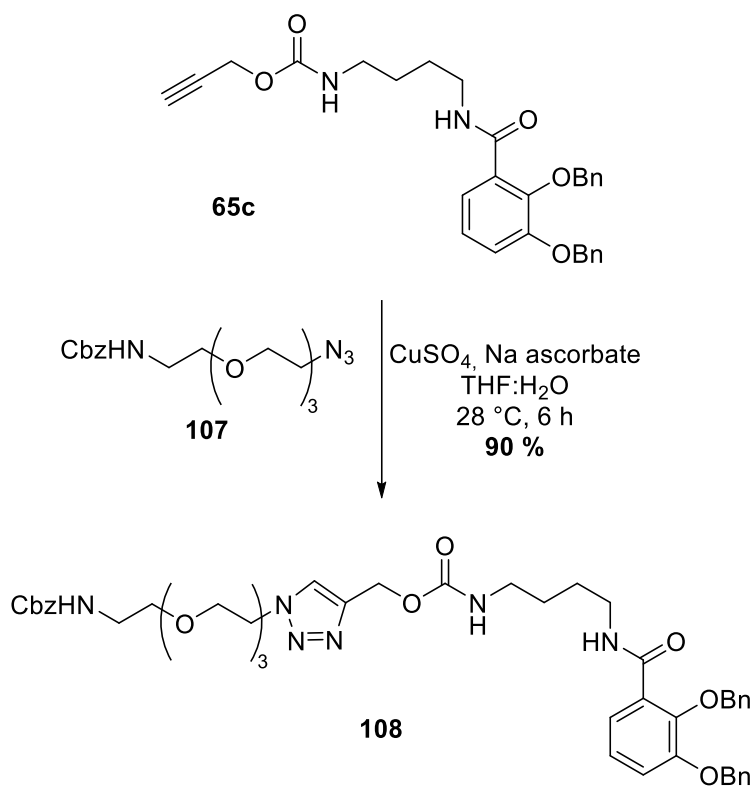


Schéma 38. Synthèse du MCV **108**.

De la même manière, le BCV composé **109** (Figure 45) a été synthétisé par Françoise HOEGY de notre équipe à partir de l'azoture **107** que nous lui avons fourni.

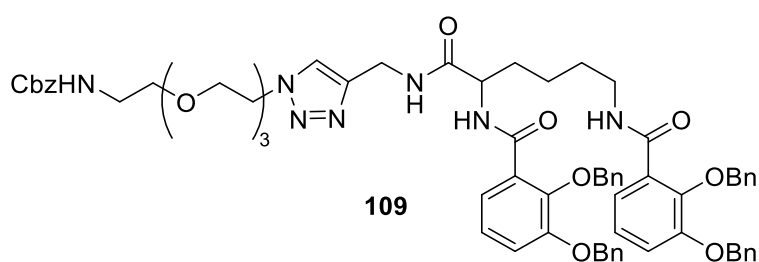


Figure 45. Structure du conjugué BCV **109**.

3. Synthèse de l'ester activé de dpa coordonné à l'iridium(III)

L'étape suivante dans cette stratégie de synthèse consiste à préparer l'ester activé **101** de pentafluorophénol du complexe d'iridium(III). Dans ce contexte, deux approches ont été testées, soit la coordination du métal par l'ester activé, soit l'activation du complexe dpa-Ir(III)

déjà formé. Pour la première approche, plusieurs essais ont été réalisés, inspirés par un protocole déjà décrit dans l'équipe¹¹² et récapitulés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Différents essais de formation du ligand dpa **110**.

Essai	Conditions	Agent de couplage	Solvant	Produit attendu
N°1	25 °C, 5 j	EDC.HCl	DCM	Non détecté par CCM
N°2	25 °C, 3 j	EDC.HCl	DMF	Formation d'un produit minoritaire détecté par CCM
N°3	23 °C, 23 h	DIC	DMF	Formation d'un produit majoritaire détecté par CCM et LC/MS

Les meilleures conditions consistent à traiter le produit **85** avec du pentafluorophénol et du DIC dans de la DMF pour conduire à l'ester activé **110** (**Schéma 39**). Ce ligand a été détecté *in situ* par LC/MS, mais n'a pas pu être purifié sur colonne de silice (dégradation du produit).

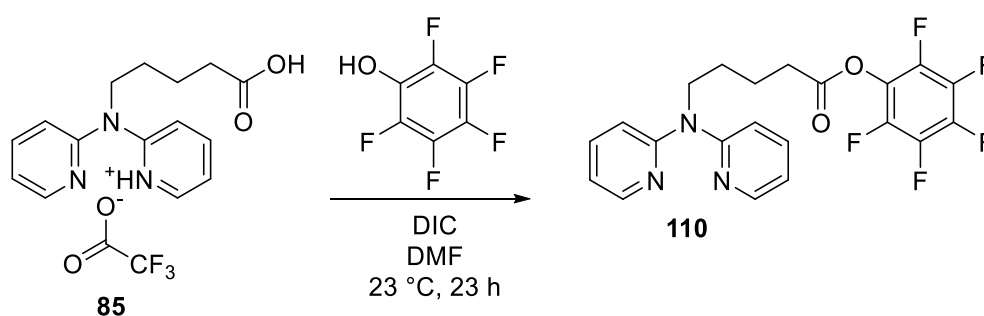


Schéma 39. Synthèse du ligand **110**.

Cet ester activé n'étant pas isolable dans nos conditions, nos collaborateurs à Caen ont essayé de coordonner le ligand dpa **85** au dimère d'iridium(III) selon les conditions de réaction habituelles (**Schéma 40**). Cependant, le complexe **102** ne se forme pas comme cela avait déjà été le cas lors de l'essai sur le ligand dpa **51** avec un espaceur plus court (Partie II – Chapitre I – C. 3). L'hypothèse que la dpa est sous une forme saline et donc peu disponible pour se coordiner à l'iridium(III), reste notre hypothèse principale.

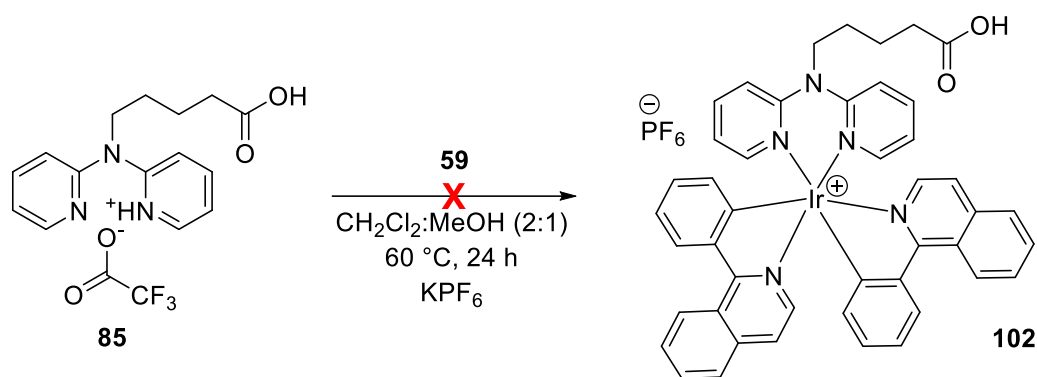


Schéma 40. Tentative de synthèse du complexe d'iridium(III) **102**.

Par conséquent, nous avons cherché à obtenir le ligand dpa **85** sous sa forme neutre **104**. Pour cela, nous avons synthétisé le ligand dpa **105** dont l'acide est protégé par un groupe Bn. La voie de synthèse n°1 (**Schéma 41**) consiste à alkyler l'amine de la dpa **52** grâce au dérivé bromé commercial possédant l'ester benzylé et en présence d'une base forte dans du DMSO. Le produit **105** a été obtenu en mélange avec la dpa **52** de départ. Ces composés n'étant pas aisément séparables, nous avons opté pour une voie alternative.

Nous avons réalisé la protection de l'acide **85** (voie n°2, **Schéma 41**) : cette molécule est mise en réaction avec du bromure de benzyle et d'un excès de carbonate de potassium anhydre dans de l'acétone. Après 29 heures à reflux (56 °C), le ligand **105** recherché a pu être purifié sans problème et obtenu avec 86 % de rendement.

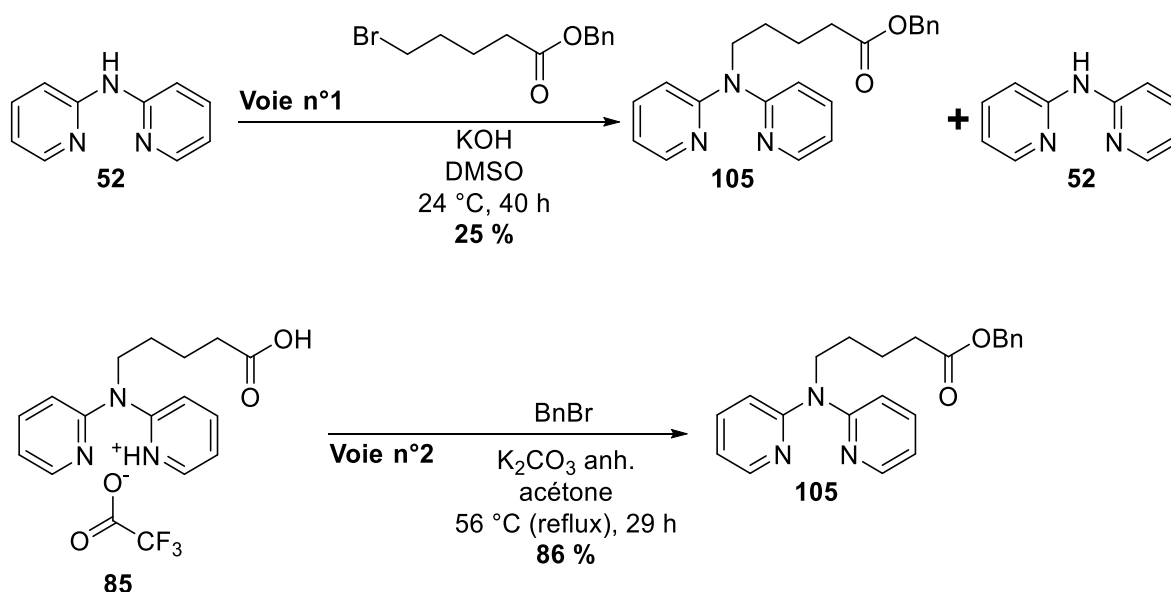


Schéma 41. Voies de synthèse du ligand dpa **105**.

La voie n°2 a certes un nombre d'étapes supérieur à celle de la voie n°1, mais les avantages l'emportent sur les inconvénients, en termes de pureté et de rendement. Nous avons donc décidé de se focaliser uniquement sur cette voie n°2 pour produire **105**.

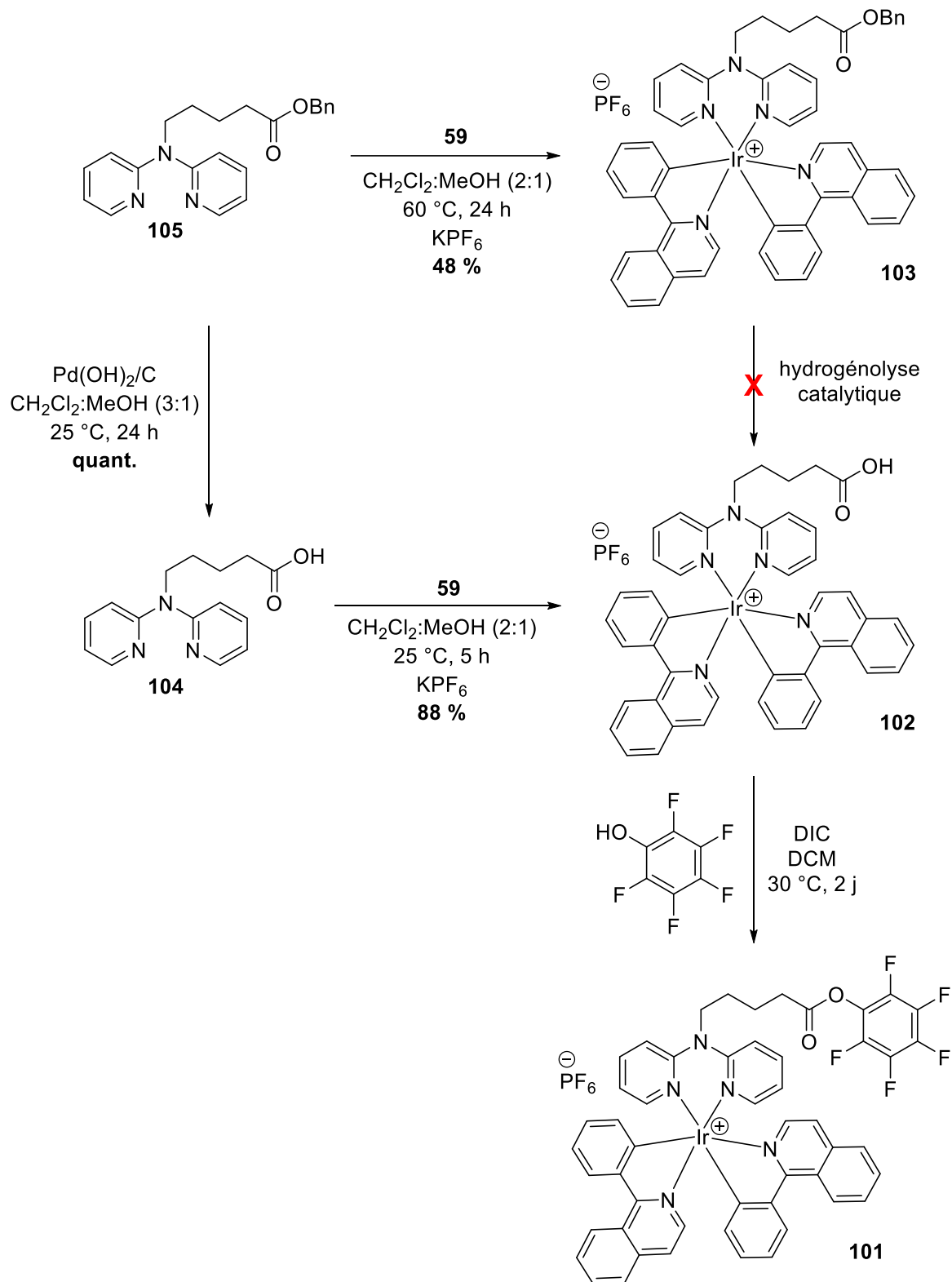


Schéma 42. Synthèse des complexes d'iridium(III) **102** et **101**.

Le ligand **105** est ensuite coordonné à l'iridium(III) par l'équipe collaboratrice à Caen pour conduire au complexe **103**. L'étape suivante de la synthèse est une hydrogénolyse du groupement protecteur Bn, mais cette réaction de clivage ne fonctionne pas malgré de nombreuses tentatives et conditions testées (catalyseurs, pressions, solvants), et le complexe **102** n'a pas pu être obtenu (**Schéma 42**).

Le ligand **105** est cette fois-ci hydrogénolysé dès la première étape de synthèse par notre équipe collaboratrice à Caen, en présence de catalyseur de Pearlman dans un mélange DCM/MeOH à 60 °C. Le ligand dpa **104** est obtenu de manière quantitative. Il peut apparaître étrange d'utiliser un procédé aussi complexe pour obtenir la molécule **104** à partir de **85**. Il faut mentionner à ce stade que la neutralisation directe du sel **85** pour obtenir **104** a été tentée, mais conduit à des milieux aqueux dont il est difficile d'extraire de façon substantielle l'acide **104**. Le composé **85** est ensuite coordonné au dimère d'iridium(III) **59** par nos collaborateurs caennais. Le complexe **102** est obtenu avec 88 % de rendement (**Schéma 42**). Ce complexe **102** est ensuite mis en réaction avec du pentafluorophénol et du DIC dans du DCM pour conduire à l'ester activé **101** (**Schéma 42**). Cette molécule est détectée par LC/MS (**Figure 46**) et la CCM montre que le produit attendu semble majoritaire. Nos tentatives pour le purifier s'étant révélées vaines, nous avons donc choisi d'utiliser l'ester activé **101** tel quel pour la suite de notre approche. Il convient de mentionner, qu'à notre connaissance dans la littérature, il existe peu d'exemples d'esters activés de complexes métalliques. Ce type d'entités chimiques pourraient trouver de nombreuses applications dans l'avenir (fonctionnalisation de support, modification de biomolécules, etc.) après optimisation de son protocole de synthèse et de purification.

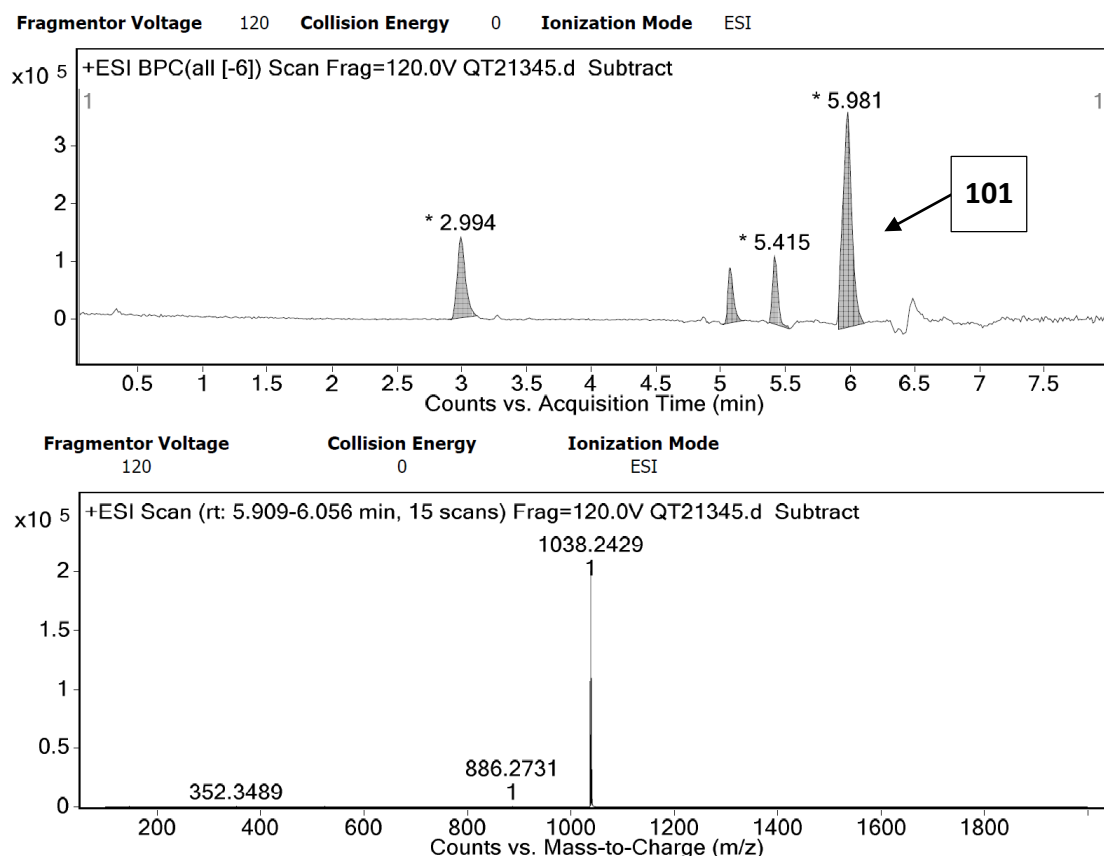


Figure 46. LC/MS-BR de la réaction de formation de **101** ($M_{\text{cation } 101} = 1038,24 \text{ g.mol}^{-1}$).

4. Couplage des sidérophores au complexe d'Ir(III) **101**

Maintenant que nous sommes en mesure d'obtenir notre ester activé d'un complexe d'iridium(III) **101**, nous avons poursuivi la synthèse des conjugués TCV-Ir(III) **81**, BCV-Ir(III) **100** et MCV-Ir(III) **99**.

Le conjugué **106** est traité par un mélange de palladium sur charbon et de catalyseur de Pearlman en présence de dihydrogène dans de l'EtOH pour un premier essai, d'après un protocole inspiré de la littérature.¹²³ La LC/MS du brut réactionnel montre la co-élution de deux produits : le composé **94** attendu ainsi qu'un composé ayant une différence de 28 g.mol^{-1} avec **94** (**Figure 47**). Cela pourrait correspondre à un éthyle supplémentaire sur notre molécule bien que nous n'arrivons pas à expliquer ce résultat au moment de rédiger ce manuscrit.

Nous avons donc changé le solvant de réaction et utilisé du MeOH au lieu de l'EtOH, tout en gardant les autres conditions de réaction. Le conjugué **94** totalement déprotégé a

ainsi pu être obtenu (**Schéma 43**). N'étant pas purifiable, le TCV **94** sera utilisé tel quel dans l'étape suivante de synthèse mettant en jeu le couplage entre l'amine terminale du TCV **94** et l'ester activé du complexe **101**. Cette étape n'a pas encore pu être mise en œuvre au moment de rédiger ce manuscrit.

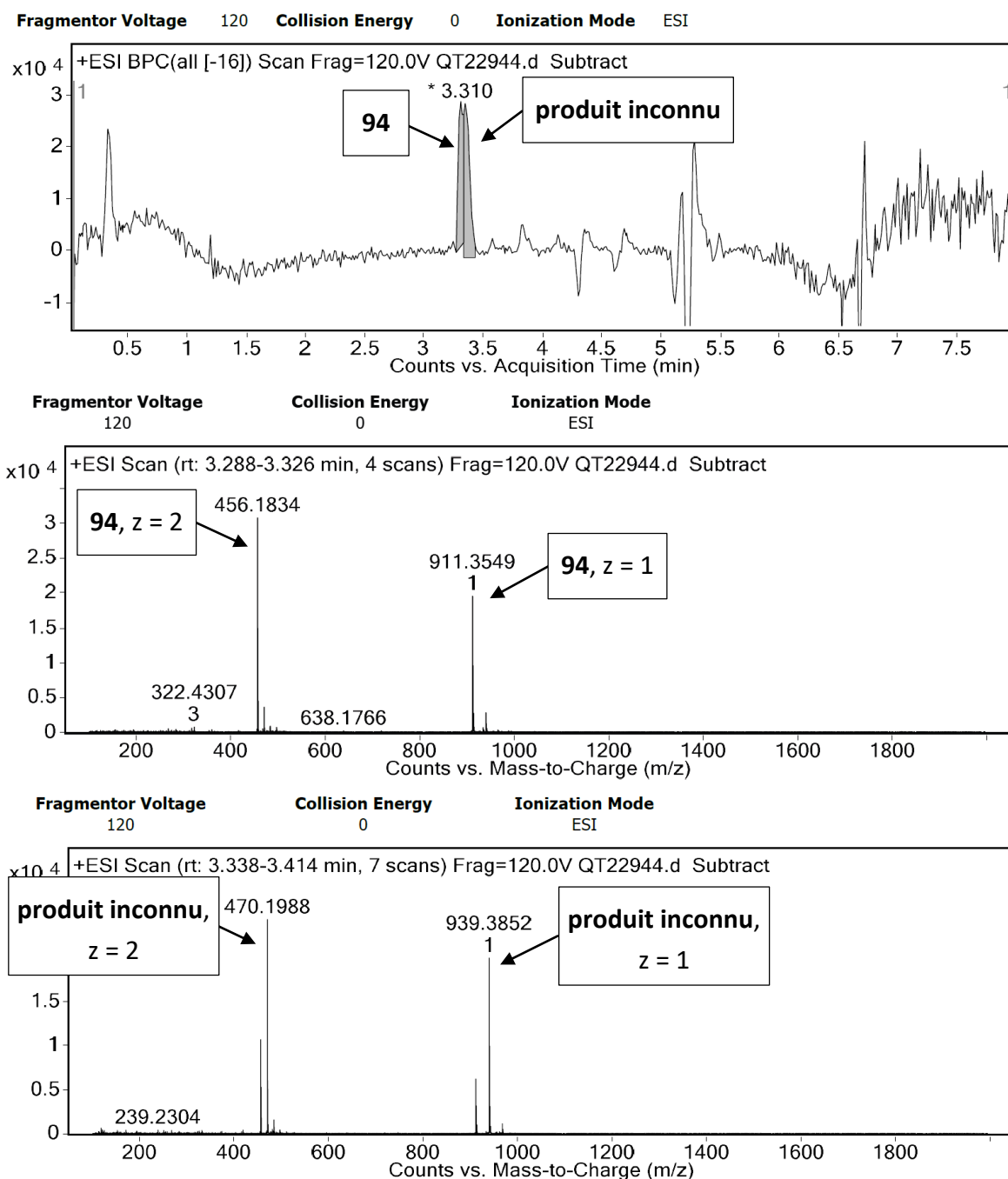


Figure 47. LC/MS-BR de la réaction de formation du TCV **94** ($M_{94} = 910,35 \text{ g.mol}^{-1}$).

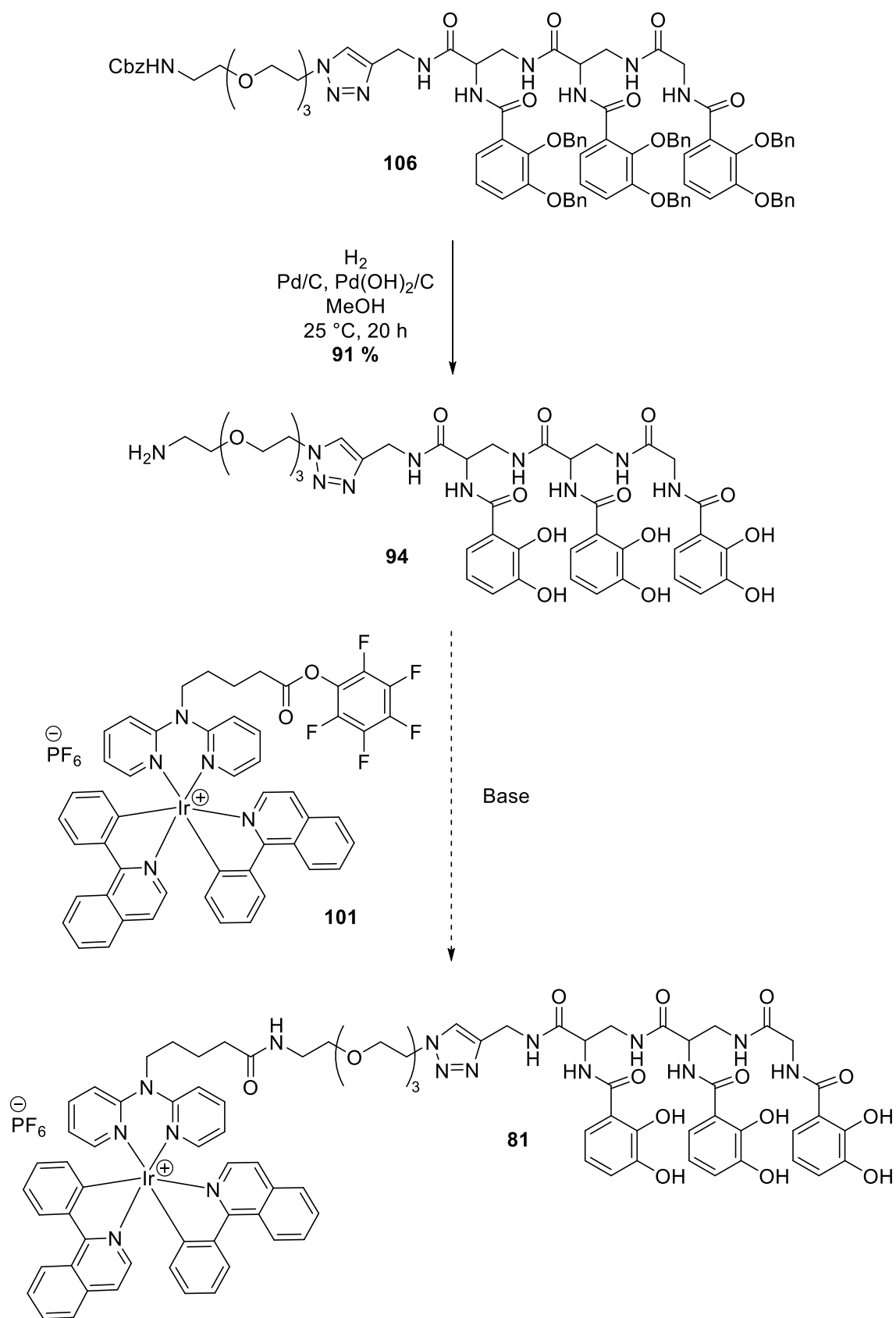


Schéma 43. Voie de synthèse du conjugué TCV-Ir(III) **81**.

J. Conclusions et perspectives du chapitre

Les conjugués entre des sidérophores catécholés et un complexe d'iridium(III) n'ont pas pu être obtenus à ce jour malgré le nombre important de stratégies tentées. Nos expériences se sont heurtées à des problèmes de stabilité (trop faible/trop grande) des groupes choisis pour protéger les fonctions catéchols, mais aussi à la difficulté de purifier efficacement ces composés inédits.

Dans ce contexte, les stratégies les plus récentes basées sur une protection des fonctions catéchols par des groupes Bn et la mise au point des purifications par chromatographie d'exclusion stérique, devraient permettre d'atteindre les structures cibles que ce soit prioritairement avec le TCV **63**, mais aussi les autres mimétiques de l'Ent **5** : le BCV **64** et le MCV **65**.

Des données préliminaires obtenues par nos collaborateurs caennais montrent en outre que la nature du contre-ion PF_6^- pour les approches décrites ici, n'est probablement pas la meilleure option pour atteindre efficacement les conjugués recherchés.

Enfin, certaines des molécules décrites dans ce chapitre et synthétisées par mes soins ont été utilisées par d'autres membres de l'équipe pour la synthèse de TCV et de BCV conjugués à des antibiotiques de la famille des oxazolidinones ce qui explique que je sois co-auteur de l'article Moynié, L.; Hoegy, F.; Milenkovic, S.; Munier, M.; Paulen, A.; Gasser, V.; Faucon, A. L.; Zill, N.; Naismith, J. H.; Ceccarelli, M.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Hijacking of the Enterobactin Pathway by a Synthetic Catechol Vector Designed for Oxazolidinone Antibiotic Delivery in *Pseudomonas Aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **2022**, 8 (9), 1894–1904.⁵⁹ Ces conjugués ont permis de montrer que les vecteurs TCV et BCV, chargés par un antibiotique, restent capables d'interagir avec le transporteur et d'être importés jusque dans le périplasme de *P. aeruginosa*. Ces données contribuent à nous rassurer sur le fait qu'une fois obtenus, nos conjugués entre des vecteurs catécholés et les complexes d'iridium(III) devraient avoir des propriétés très similaires.

Chapitre III – Propriétés particulières des ligands di(pyridin-2-yl)glycine

A. Origine de la découverte

Comme nous l'avons décrit dans la Partie II – Chapitre II – F. 2, une réactivité surprenante de la di(pyridin-2-yl)glycine a été découverte : l'hydrolyse acide de la fonction dipyridylamine-acétamide (Dpaa) lors de la réaction de déprotection des groupes PMB sur le conjugué TCV-dpa **82d** par une solution à 5 % de TFA dans du DCM (**Schéma 25**). Cette hydrolyse acide est très surprenante. En effet, la fonction amide est décrite comme pouvant être clivée dans des conditions acides ou basiques beaucoup plus drastiques^{124,125} alors que nos conditions d'expérience n'utilisaient qu'une solution peu concentrée de TFA à température ambiante. Nous avons donc décidé d'étudier cette réactivité sur différents ligands dpa en présence des acides formique et acétique. Ces deux acides ont des pKa plus élevés que celui du TFA et devraient donc avoir un impact moins important sur la liaison amide en fonction du mécanisme impliqué.

B. Hydrolyse acide

1. Synthèse des ligands

Dans un premier temps, nous avons synthétisé les différents composés **55**, **84**, **112**, **114** et **116** présentant la fonction Dpaa et qui seront utilisés dans les réactions d'hydrolyse. Les synthèses des molécules **55** et **84** (**Schéma 44**) ont été décrites dans la Partie II – Chapitre I – C. 2 et la Partie II – Chapitre II – G. 1 respectivement. Pour la synthèse des molécules **112**, **114** et **116**, les amines de départ **111** et **113** sont commerciales et l'amine **115** a été synthétisée par une stagiaire de Master 2 de l'équipe (Noémie WERLE) à partir d'une référence de la littérature.¹²⁶ Ces amines ont été choisies pour la diversité des fonctions

chimiques qu'elles présentent, notamment les groupements protecteurs Boc et *t*-butylester, eux aussi sensibles aux acides.

Nous avons souhaité dans un premier temps mettre au point un réactif d'installation du groupe Dpaa, facile d'utilisation, à l'image du Boc₂O pour le Boc. Malheureusement, malgré de nombreuses conditions testées, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir ni l'ester activé de pentafluorophénol, ni le chlorure d'acide correspondant.

Les amines **111**, **113** et **115** ont donc été mises en réaction avec le ligand dpa acide **51** en présence de DIPEA et EDC.HCl dans du DCM selon le même protocole que pour les molécules **55** et **84**. Les ligands dpa **112**, **114** et **116** sont ainsi obtenus avec 89 %, 78 % et 58 % de rendement respectivement (**Schéma 44**).

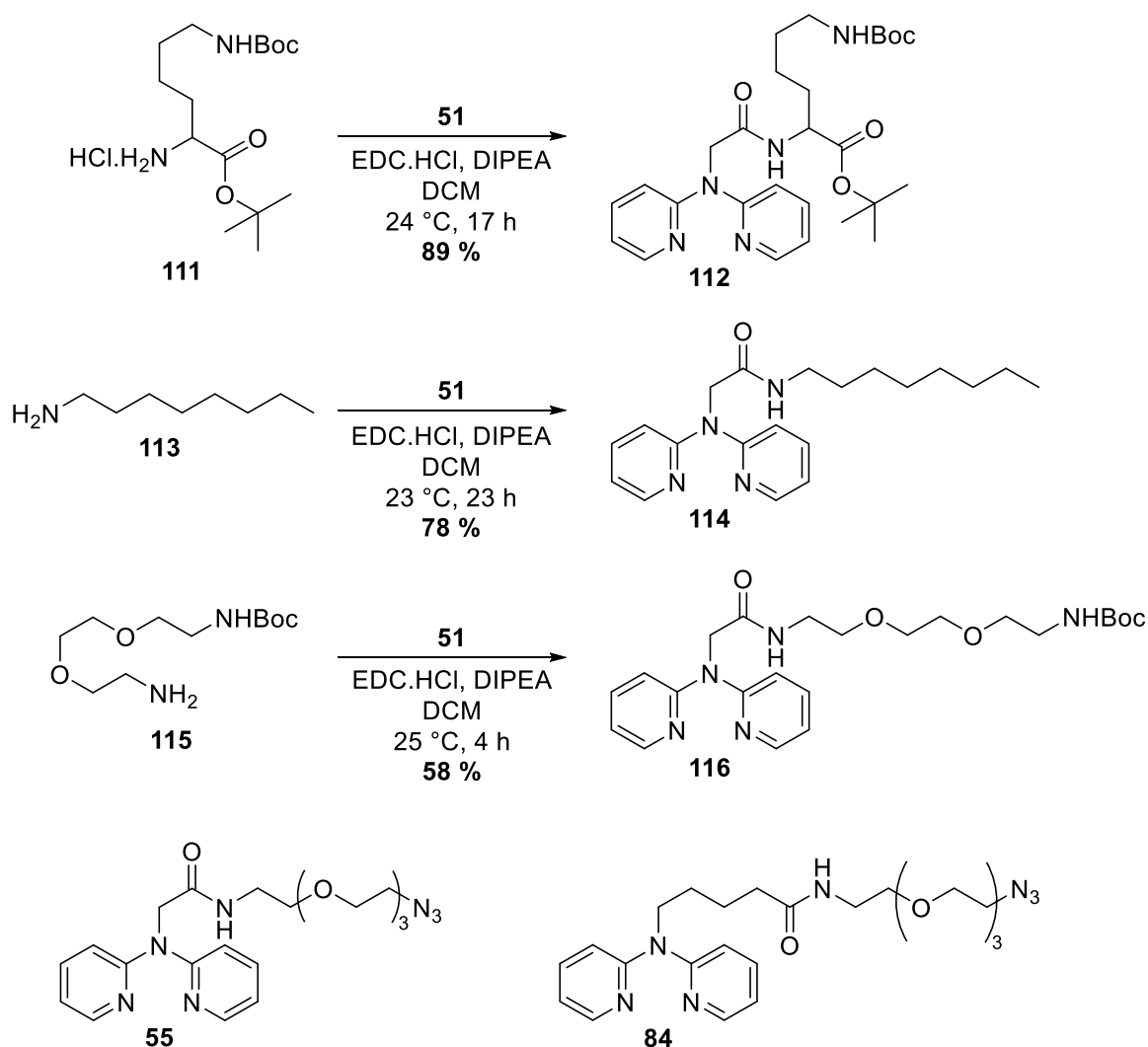


Schéma 44. Synthèse des ligands dpa **112**, **114** et **116** et rappel des structures des ligands **55** et **84**.

2. Clivage et cinétique

Les composés **55**, **84**, **112**, **114** et **116** ainsi synthétisés ont été traités par une solution de 30 % d'acide formique ou 30 % d'acide acétique dans du DCM à 20 °C pendant 24 h. Les produits isolés ainsi que leurs rendements sont indiqués dans le **Tableau 3**.

Il est remarquable de constater que le dérivé valérate **84** ne subit pas d'hydrolyse en présence d'acide formique ni d'acide acétique (entrée n°2, **Tableau 3**). Par contre, les dérivés Dpaa **55**, **112**, **114** et **116** sont partiellement ou totalement clivés par ces deux acides (entrées n°1, 3, 4 et 5, **Tableau 3**). Les autres groupements protecteurs Boc et *t*-butylester n'ont pas subi de modification et sont donc orthogonaux au groupe Dpaa. Il devrait être possible d'utiliser le groupe Dpaa comme groupement protecteur des amines primaires.

Tableau 3. Tests de clivage dans des conditions acides des composés **55**, **84**, **112**, **114** et **116**.

^a Rendement basé sur l'analyse LC/MS due à la volatilité de l'amine libre **113** pendant le traitement.

Entrée	Réactif de départ	Produit (rendement)	
		HCOOH/DCM (30 % v/v)	AcOH/DCM (30 % v/v)
N°1	55	58 (95 %)	58 (30 %)
N°2	84	84 (92 %)	84 (96 %)
N°3	112	111 (91 %)	111 (42 %)
N°4	114	113 (100 %) ^a	113 (28 %) ^a
N°5	116	115 (93 %)	115 (23 %)

Nous avons réalisé des essais de cinétique sur les composés **55**, **112** et **114** en présence de 30 % d'acide formique ou 30 % d'acide acétique dans du DCM et prélevé des échantillons à *t* = 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h et 24 h pour les analyser par LC/MS (**Figure 48**). L'acide formique est plus efficace que l'acide acétique peu importe le composé Dpaa testé. Ainsi, la valeur du pKa de l'acide aurait un rôle dans la réactivité de la réaction et la rapidité du clivage.

De plus, cette réactivité semble être augmentée avec la présence d'eau dans les acides commerciaux utilisés. Nous avons réalisé des tests de clivage sur les composés **55** et **112**, dans les mêmes conditions que précédemment, mais en rajoutant un pourcentage variable d'eau : 0 %, 2 % ou 10 % (milieu biphasique dans ce cas précis). Des échantillons du milieu réactionnel

sont prélevés à $t = 8$ h et 24 h pour être analysé par LC/MS. Les valeurs obtenues sont indiquées dans les tableaux **Tableau 4** et **Tableau 5**.

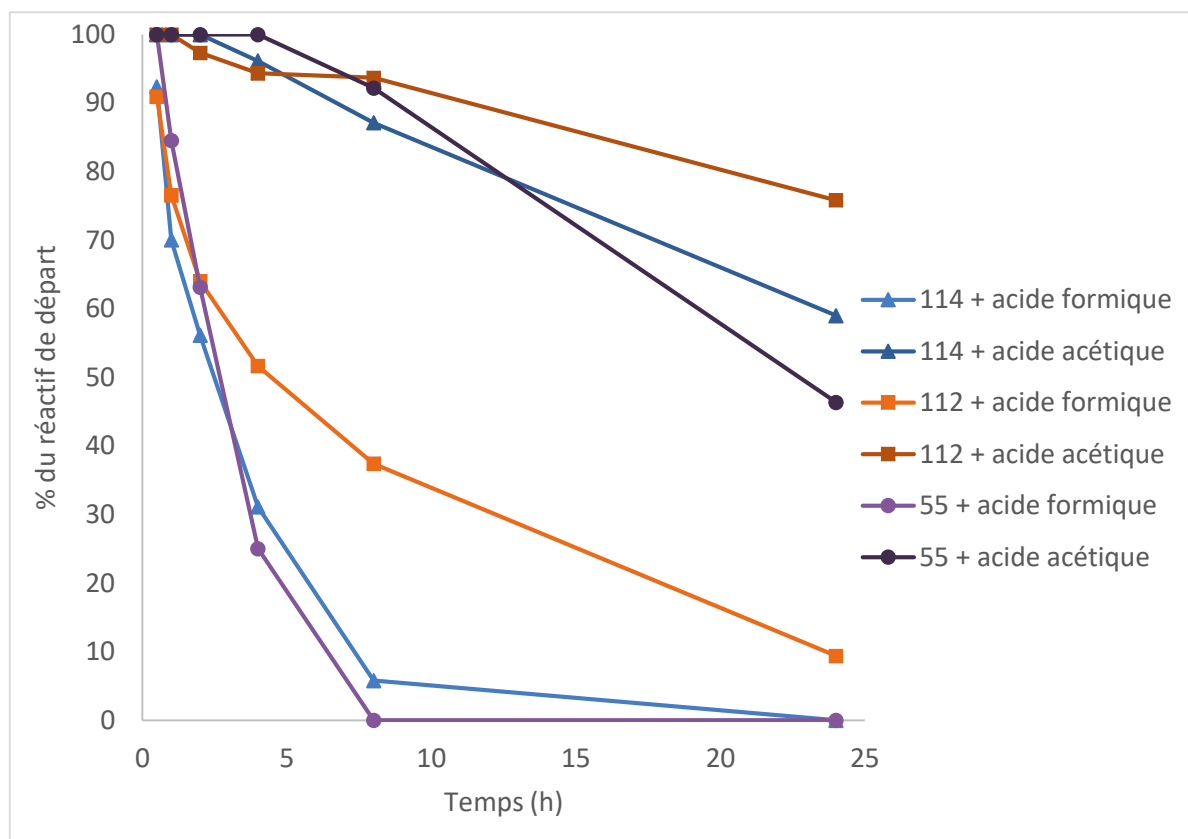


Figure 48. Réactivité des composés **55** (rond violets), **112** (carrés orange) et **114** (triangles bleus) traités avec 30 % d'acide formique ou 30 % d'acide acétique dans du DCM. Le milieu réactionnel est analysé par LC/MS à $t = 30$ min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h et 24 h.

Tableau 4. Tests de clivage dans des conditions acides avec différents % de H_2O sur le composé **55**. Les entrées correspondent au % de réactif de départ restant. ^a LC/MS.

Entrée	% H_2O	Acide formique/DCM 30 %		Acide acétique/DCM 30 %	
		8h	24h	8h	24h
N°1	0	0 % ^a	0 % ^a	92 % ^a	46 % ^a
N°2	2	0 % ^a	0 % ^a	33 % ^a	2 % ^a
N°3	10	0 % ^a	0 % ^a	13 % ^a	0 % ^a

Tableau 5. Tests de clivage dans des conditions acides avec différents % de H₂O sur le composé **112**. Les entrées correspondent au % de réactif de départ restant. ^a LC/MS.

Entrée	% H ₂ O	Acide formique/DCM 30%		Acide acétique/DCM 30%	
		8h	24h	8h	24h
N°1	0	37 % ^a	9 % ^a	94 % ^a	76 % ^a
N°2	2	34 % ^a	10 % ^a	88 % ^a	69 % ^a

L'ajout d'eau ne semble pas entraîner de modifications sur la réaction d'hydrolyse dans le cas des tests avec acide formique. Il a cependant un impact sur le clivage des autres groupements protecteurs. En effet, pour le composé **112**, en présence de 2 % de H₂O dans une solution de 30 % d'acide formique dans du DCM, des traces de composés dont les groupes Boc et *t*-butylester ont été clivés, sont détectables par LC/MS. En revanche, la réaction d'hydrolyse est plus efficace lors d'ajout d'eau à l'acide acétique sans clivage des autres groupements protecteurs. Dans tous les cas de figure, l'acide formique reste plus efficace que l'acide acétique dans le clivage du groupe Dpaa.

3. Mécanisme

La réactivité du groupe Dpaa en milieu acide nous ayant fort surpris, nous nous sommes tournés vers la modélisation afin d'expliquer ces résultats expérimentaux. Notre collaborateur, le Dr Christophe GOURLAOUEN (LCQ, Strasbourg), a modélisé nos molécules **55**, **84**, **112** et **114** et calculé les énergies des états de transitions (ET) pour ces modèles. Seules les données obtenues pour les modèles **m55** et **m114** (**Figure 49**) seront mentionnés dans cette thèse.

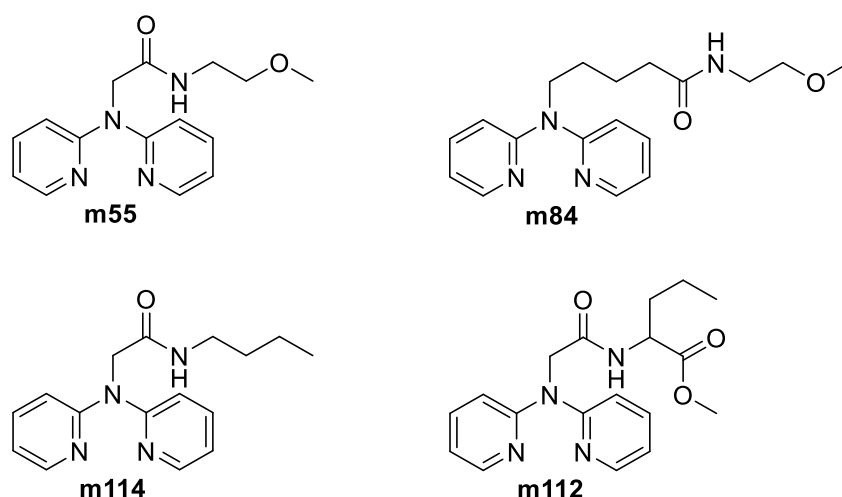


Figure 49. Modèles **m55**, **m84**, **m114** et **m112** des molécules **55**, **84**, **114** et **112** respectivement.

Le mécanisme général proposé de cette hydrolyse acide a été décrit pour le modèle **m114** qui est le modèle le plus simple de nos différents composés dpa (**Schéma 45**). L'ajout d'un motif PEG (**m55**, **m84**) ou d'une autre fonction (**m112**) sur la chaîne de l'amine ne fait que modifier les barrières énergiques sans changer le mécanisme. Ce dernier confirme que la présence d'une molécule d'eau en plus de l'acide est nécessaire pour le clivage de la Dpaa. Ce premier état de transition de cette réaction est l'étape cinétiquement déterminante. De plus, cette réaction de clivage de la Dpaa repose sur la catalyse acide/base liée aux azotes de la dipyrroldiamine.

Le produit de la dernière étape (dissociation) **18** est plus stable que l'adduit initial **11** pour le cas du modèle **m55** (**Figure 50**) ainsi que **m112** et **m114** alors que ce n'est pas le cas pour **m84**. Cela expliquerait aussi pourquoi la réaction de clivage n'a pas lieu dans le cas du dérivé valérate **84**.

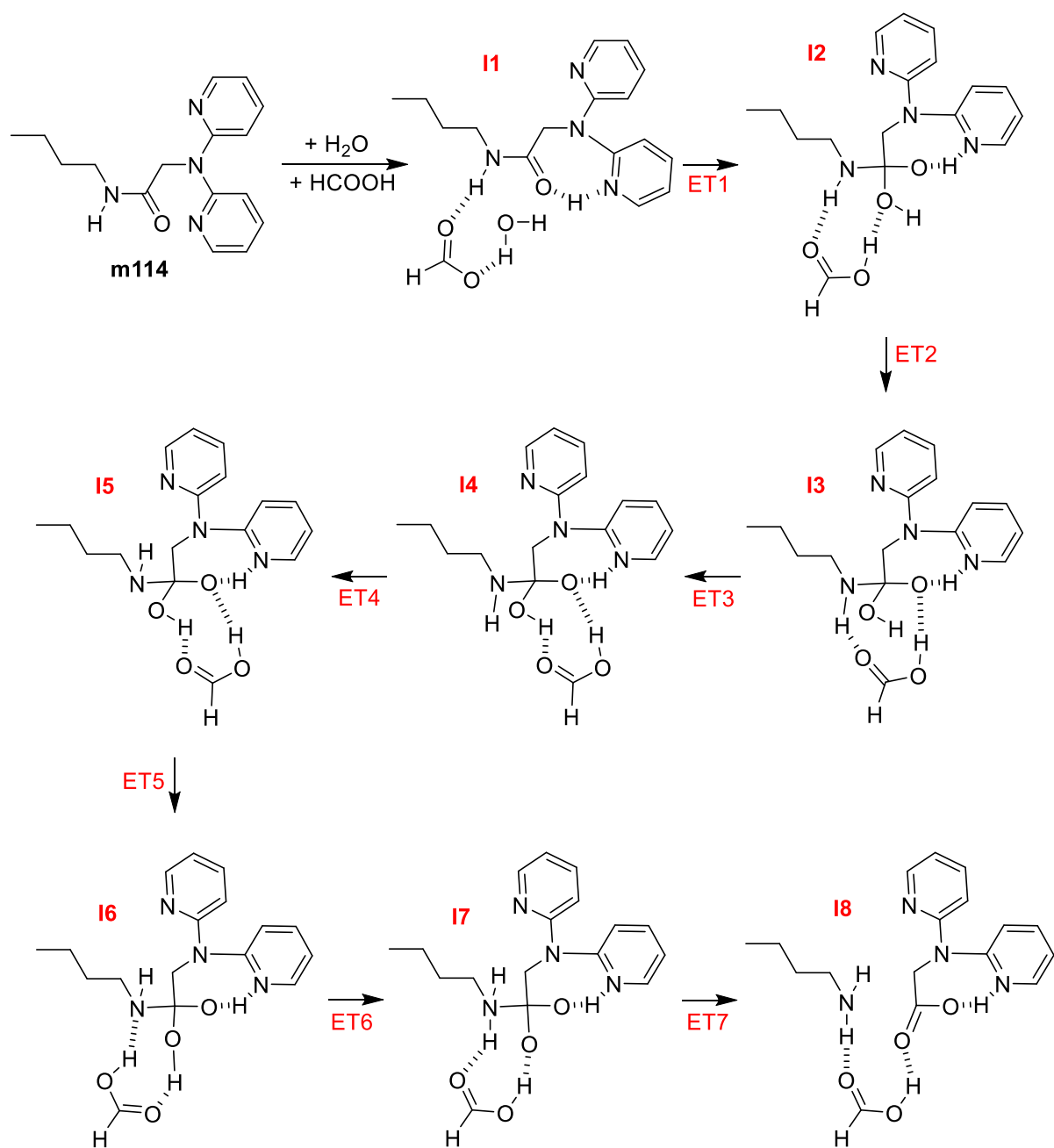


Schéma 45. Mécanisme proposé de l'hydrolyse de la Dpaa avec catalyse acide pour **m114**.

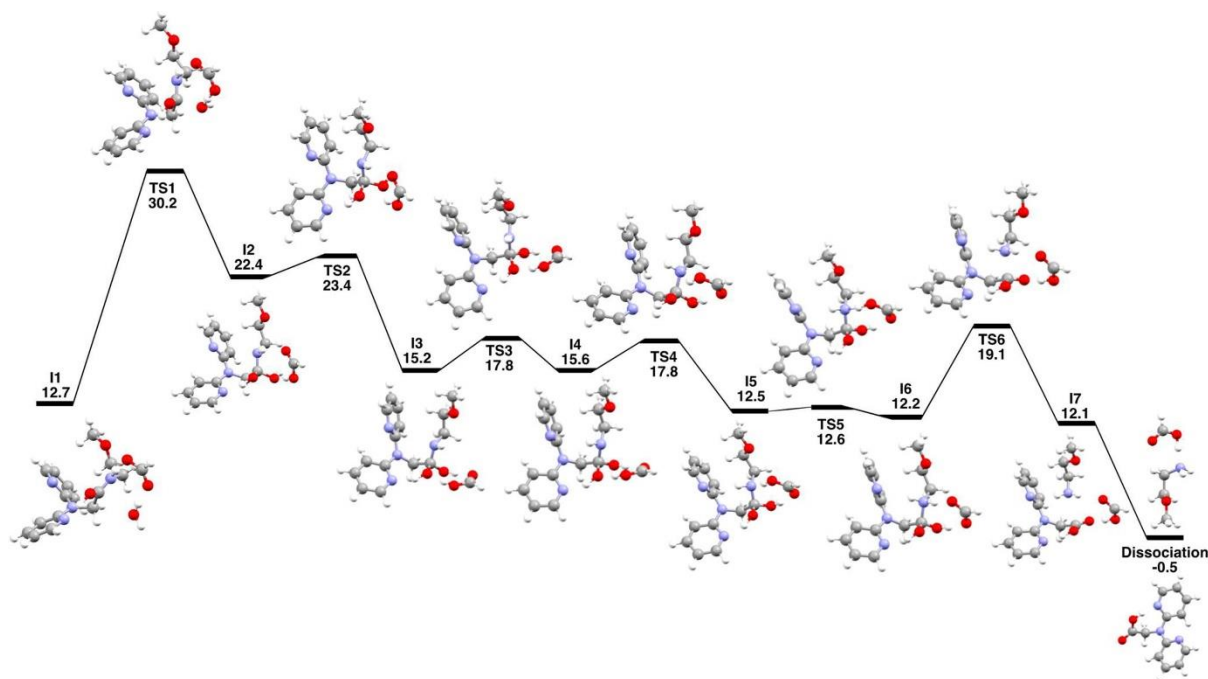


Figure 50. Diagramme énergétique du clivage de **m55** en présence d'acide formique. Les énergies sont données relativement par rapport aux réactifs séparés (molécule d'eau, acide formique, dpa) en kcal mol⁻¹. Extrait de Faucon, A. L et al., *Tetrahedron Letters* **2022**, 96, 153758.¹²⁷

C. Conclusions et perspectives du chapitre

Cette courte étude méthodologique a permis de comprendre pourquoi un clivage inexpliqué pouvait avoir lieu lors d'un traitement acide (TFA) d'une molécule présentant un groupe Dpaa (Partie II – Chapitre II – F. 2). Ce travail a permis d'orienter l'ensemble du projet vers des dpa substituées par un espaceur valérate ne présentant pas cette susceptibilité aux acides.

Nous avons montré que le Dpaa peut être utilisé comme groupement protecteur des amines primaires. Ce groupe est facile à coupler à une amine dans des conditions classiques de couplage et peut aussi être facilement clivé en présence d'une solution de 30 % d'acide formique dans du DCM et de façon orthogonale à d'autres groupements protecteurs labiles plus classiques que sont le Boc et le *t*-butylester.

Cette découverte a fait l'objet d'un article : Faucon, A. L.; Hoegy, F.; Werle, N.; Gourlaouen, C.; Mislin, G. L. A. Dipyrindylamine-Acetamide (Dpaa): A Primary Amine Protecting

Group Orthogonally Cleavable under Acidic Conditions in the Presence of *t*-Butyloxycarbonyl (Boc) and *t*-Butylester. *Tetrahedron Letters* **2022**, 96, 153758.¹²⁷

Une étude est en cours pour vérifier si le groupe Dpaa pourrait aussi avoir un intérêt pour la protection des amines secondaires. En outre, l'équipe souhaite confronter ce groupe à d'autres conditions de déprotection, même si les réactions dans lesquelles il a été utilisé durant cette thèse suggère d'emblée une bonne stabilité vis-à-vis des conditions basiques et d'hydrogénolyse.

De plus, une étude préliminaire a montré que la présence de substituants en *para* des azotes pyridiniques du groupe Dpaa permet de jouer sur la sensibilité de ce motif aux acides, et ces travaux doivent être poursuivis afin de mettre en évidence la portée, mais aussi les limitations de ce nouveau groupement protecteur.

Enfin, des essais préliminaires menés au cours de la thèse montre que la catalyse acide-base qui peut s'opérer dans le motif Dpaa pourrait avoir un intérêt plus large en synthèse organique.

Partie III – Conclusions et perspectives générales

Face à la résistance croissante des bactéries vis-à-vis des antibiotiques, la recherche de nouvelles stratégies est une urgence. Les antibiotiques actuels sont très majoritairement fondés sur un nombre restreint d'éléments des trois premières périodes du tableau de Mendeleïev. Les métaux, à cause de leur toxicité pour les cellules eucaryotes, ont été réservés à la mise au point d'anticancéreux. Néanmoins, la toxicité des antibiotiques de dernier recours rend désormais les complexes métalliques compétitifs pour définir l'arsenal antibactérien du futur.^{9,61,128} De plus, l'optimisation des propriétés biologiques des ligands entourant le métal peut permettre d'améliorer significativement le potentiel thérapeutique de ces complexes.⁹ En plus de leurs propriétés antibactériennes intrinsèques, certains complexes métalliques peuvent présenter une toxicité photoinduite, principalement par la production de radicaux à l'image des photosensibilisateurs purement organiques utilisés en thérapie photodynamique (PDT).⁷⁰ Ces complexes pénètrent par contre très mal au travers des membranes bactériennes, en particulier chez les bactéries à Gram négatif. Leur vectorisation par les sidérophores et l'utilisation des voies de transport dédiées pour transférer les complexes dans l'espace intra-bactérien, par une stratégie de type cheval de Troie, est une option qui a été peu étudiée jusqu'ici. Les conjugués entre des sidérophores et des complexes métalliques n'ont été décrits qu'à trois reprises et qu'avec des composés inutilisables en PDT.^{64,66}

Le but de notre projet, à savoir la synthèse de conjugués entre des sidérophores et des complexes d'iridium(III) luminescents pour de potentielles applications thérapeutiques en PDT antibactérienne, était donc, en 2019, date du début de ce travail de thèse, un domaine restant à explorer. Une pandémie plus tard et beaucoup d'aléas expérimentaux n'ont pas permis d'atteindre tous les objectifs fixés initialement. Néanmoins, nous avons, en quelques années, démarré une nouvelle thématique dans l'équipe et fermé autant de portes qu'ouvert de nouvelles perspectives sur ce sujet. Nous sommes, dans le cadre de cette thèse, les premiers à décrire des conjugués entre des sidérophores et des complexes d'iridium(III). Ces molécules inédites **47a** et **48a** sont fondées sur le sidérophore desferrioxamine (DFO) relié à un motif dipyridyl-amine (dpa) coordinant l'iridium(III) cyclométallé par deux ligands 1-phénylisoquinoline (piq) (**Figure 51**). Au moment de rédiger cette conclusion, les composés **47b** et **48b** dont le contre-ion PF_6^- a été modifié pour Cl^- sont venus se rajouter à la liste des composés obtenus (**Figure 51**). Il faut mentionner aussi que, pour la purification finale des

conjugués DFO-Ir(III), la chromatographie d'exclusion stérique a été progressivement préférée à la chromatographie sur silice. Ces résultats valident donc notre approche du point de vue de la chimie de synthèse organique et organométallique.

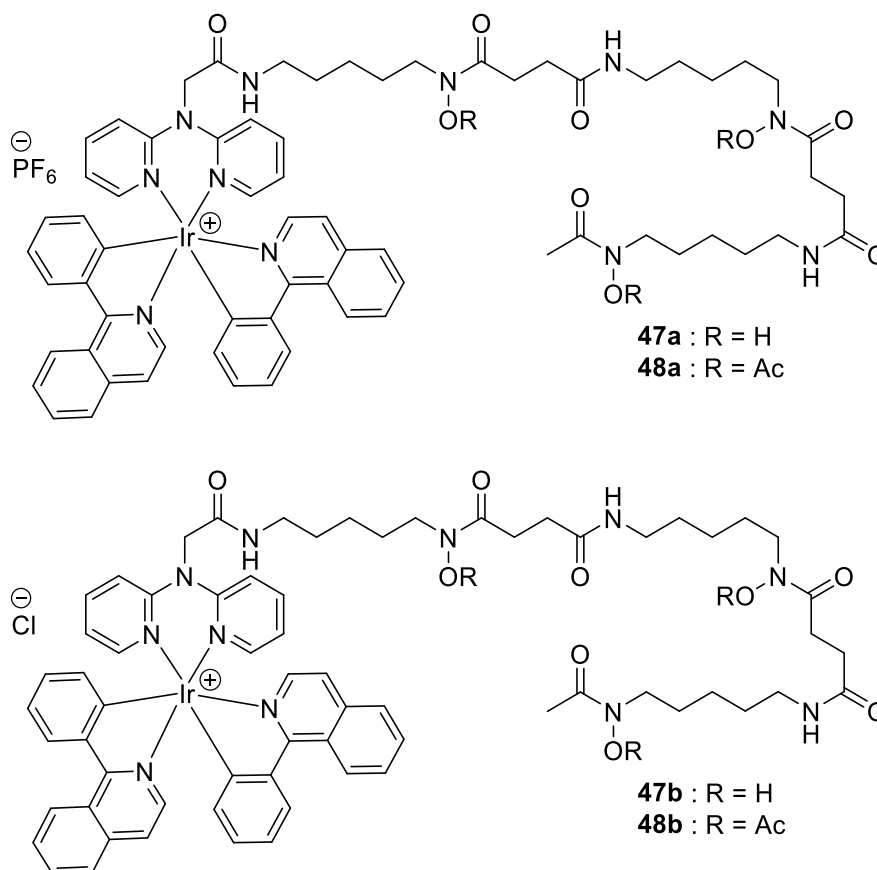


Figure 51. Structures des conjugués DFO-Ir(III) obtenus à l'heure de rédiger ces conclusions.

Les évaluations biologiques préliminaires menées jusqu'ici sur les seuls complexes d'iridium(III) **60**, **61** et **62** montrent que ces derniers présentent une activité importante sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et cela uniquement en présence de lumière bleue ou verte. Ces molécules ne sont par contre pas antibactériennes quand elles sont irradiées par de la lumière rouge, conformément à leur spectre d'absorption. En l'absence de lumière, ces complexes sont inactifs. Dans tous les cas, les conjugués DFO-Ir(III) évalués jusqu'ici sont aussi, voire moins, actifs que les complexes d'iridium(III) non vectorisés, ne mettant pas en évidence une plus-value de la conjugaison avec le vecteur sidérophore. Il s'agit néanmoins de données préliminaires qui, en outre, n'intègrent pas encore les nouveaux conjugués **47b** et **48b** dont les propriétés en milieu biologique pourraient-être sensiblement

différentes (effet prodroge lié aux groupes Ac, meilleure solubilité des espèces avec un contre-ion chlorure).

Ces expériences seront reproduites avec une induction préalable à la nocardamine, ce dernier composé ayant montré une capacité à induire l'expression du transporteur de membrane externe (OMT) FoxA transportant la DFO **46**.⁹⁷ L'utilisation des mutants dans les voies de transport de sidérophores hydroxamates, disponibles actuellement dans l'équipe, devraient permettre de conclure définitivement sur la validité, ou non, de notre approche d'un point de vue biologique. Enfin, il est prévu de résoudre la structure du complexe ternaire entre le conjugué ferrique **47b** et l'OMT FoxA, et de déterminer l'affinité de ce conjugué pour ce transporteur, afin de vérifier que l'encombrement stérique du complexe d'iridium(III) n'impacte pas la liaison du vecteur sidérophore à FoxA (collaboration avec le Pr Henning TIDOW, Université de Hamburg, Allemagne). En toute fin, malgré l'absence évidente de plus-value par la vectorisation, l'activité très importante de nos conjugués DFO-Ir(III) en présence de lumière devrait tout de même être expliquée. Une accumulation dans la membrane externe et la destruction progressive de l'enveloppe bactérienne est une hypothèse qu'il conviendra d'étudier par différentes techniques de fractionnement cellulaire et de microscopie. Dans cette étude, les propriétés de luminescence que les complexes d'iridium(III) confèrent à l'ensemble du conjugué seront un atout.

Les sidérophores hydroxamates dont la DFO **46** et le ferrichrome **6** sont des archétypes, ne sont pas les seuls à présenter un intérêt dans le cadre d'une stratégie de vectorisation de type cheval de Troie. En effet, si la DFO **46** était intéressante pour valider l'approche de synthèse organique et organométallique à cause de sa disponibilité commerciale à faible coût, elle présente un désavantage majeur : son affinité pour le fer(III). Confrontés à la compétition extracellulaire des sidérophores catécholés, dont l'affinité pour le Fe(III) est bien supérieure, les sidérophores hydroxamates sont moins utilisés par les bactéries dans de nombreuses conditions.¹²⁹

Très récemment, cette supériorité des sidérophores catécholés vs hydroxamates dans le cadre de la stratégie du cheval de Troie a été confirmée chez *P. aeruginosa* dans un modèle d'infection de cellules pulmonaires.¹³⁰ Nous avons donc étudié en parallèle la possibilité de vectoriser les complexes d'iridium(III) grâce à des analogues du sidérophore entérobactine **5** archétype des sidérophores catécholés. L'entérobactine **5** naturelle n'est pas

fonctionnalisable et son squelette trilactone central est sensible aux hydrolyses enzymatiques et aux milieux basiques. En outre, un grand nombre des analogues de synthèse de l'entérobactine décrits à ce jour reprennent ce motif labile et ne parviennent à introduire une fonctionnalité permettant la conjugaison qu'au prix de synthèses lourdes aux faibles rendements.^{66,131,132}

Dans ce contexte, le laboratoire MMBCA a développé avant mon arrivée trois vecteurs pour mimer l'entérobactine **5** : un vecteur mono-catéchol (MCV **65**), un vecteur bis-catéchol (BCV **64**) et un vecteur tris-catéchol (TCV **63**). J'ai d'ailleurs contribué à l'optimisation de la synthèse du TCV **63** et à la production de quantités appréciables de synthons utiles à cette synthèse, ce qui a conduit à mon premier article en tant que co-auteur.⁵⁹ Les groupes catéchols de ces analogues peuvent poser des problèmes au cours des synthèses (réactions parasites, problèmes de solubilité organique, purification complexe, chélation des métaux dans les phases stationnaires, etc.) aussi cette fonction chélatrice a été systématiquement masquée par un groupe protecteur dans nos premières approches. Les groupes protecteurs acétyles (Ac), *p*-méthoxybenzyle (PMB) et benzyle (Bn) ont été successivement testés. Ac bien qu'utilisé par un groupe concurrent sur des systèmes catécholés très similaires,¹¹⁵ s'est montré peu stable dans nos conditions, à la fois au cours des synthèses, mais aussi des purifications. Le groupe PMB s'est révélé plus stable au cours des réactions, mais les fonctions catéchols peuvent être partiellement déprotégées durant les purifications sur gel de silice. Enfin le groupe Bn a permis d'obtenir les conjugués attendus et de les purifier dans de bonnes conditions sous forme protégés. Malheureusement, l'hydrogénolyse de ces groupements protecteurs s'est révélée incomplète. À l'heure de rédiger cette conclusion, de nouveaux résultats venus de nos collaborateurs caennais viennent tempérer cette déception : comme dans le cas de la DFO, l'utilisation du contre-ion chlorure (au lieu de l'hexafluorophosphate) et des purifications par chromatographie d'exclusion stérique ont permis d'isoler les complexes attendus **117** et **118** basés sur le MCV et le BCV respectivement (**Figure 52**), même si des problèmes de purification restent d'actualité.

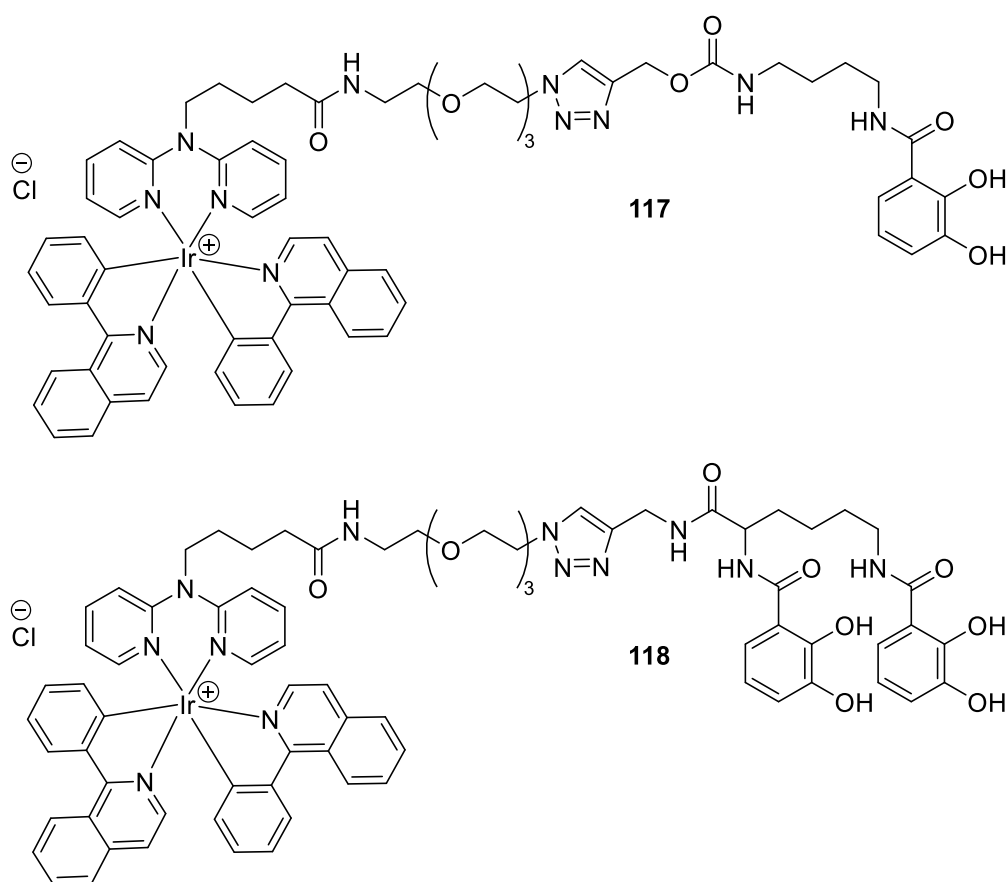


Figure 52. Structures des conjugués MCV-Ir(III) **117** et BCV-Ir(III) **118**.

Ces données récentes laissent espérer que nous serons en mesure d'obtenir les conjugués TCV-Ir(III) attendus si les réactions d'hydrogénolyse des fonctions Bn vont à leur terme comme sur les analogues simplifiés MCV et BCV. À défaut, une dernière stratégie basée sur l'ester activé iridié **101** pourrait être une solution (**Schéma 46**, **Schéma 47**). Cette molécule inédite a été obtenue en toute fin du travail expérimental et l'acylation d'un TCV déjà déprotégé et fonctionnalisé **94** pourrait conduire enfin au premier conjugué TCV-Ir(III) espéré **81**. En outre, l'obtention de l'ester activé **101** ouvre aussi de nouvelles perspectives. Jusqu'ici, soit pour des raisons d'accessibilité synthétique dans le cas de la DFO **46**, soit par le fait de développements préexistants dans le cas des MCV **65**, BCV **64** et TCV **63** mimant l'entérobactine **5**, nous nous sommes focalisés sur les voies d'assimilation du fer dépendantes de sidérophores exogènes de *P. aeruginosa*.

En effet, rappelons que si la DFO **46** et l'Ent **5** peuvent être utilisées par *P. aeruginosa*, cette bactérie ne produit pas ces sidérophores et l'expression des protéines des voies dédiées est stimulée par la présence des sidérophores exogènes dans le milieu extracellulaire. *P.*

aeruginosa synthétise par contre des sidérophores dits endogènes, la pyoverdine (Pvd) **4** et la pyochéline (Pch) **3**, qui pourraient aussi être utilisés comme vecteurs dans notre approche, mais ils ne sont pas fonctionnalisés sous leur forme naturelle. Néanmoins, la pyoverdine **119** produite par *P. fluorescens* est transportée dans *P. aeruginosa* et est naturellement fonctionnalisée par l'amine terminale d'une lysine.¹³³ De même, il y a une dizaine d'années, l'équipe a décrit la synthèse d'un analogue **121** de la pyochéline fonctionnalisée en position N3" par un espaceur propylamine.¹³⁴ Les vecteurs **119** et **121** seraient donc en mesure de réagir avec notre ester activé iridié **101** pour conduire aux conjugués **120** et **122** respectivement. Une fois isolés, les conjugués iridiés de TCV **81**, de Pvd **120** et de Pch **122** seront testés sur *P. aeruginosa* PAO1 pour valider notre approche.

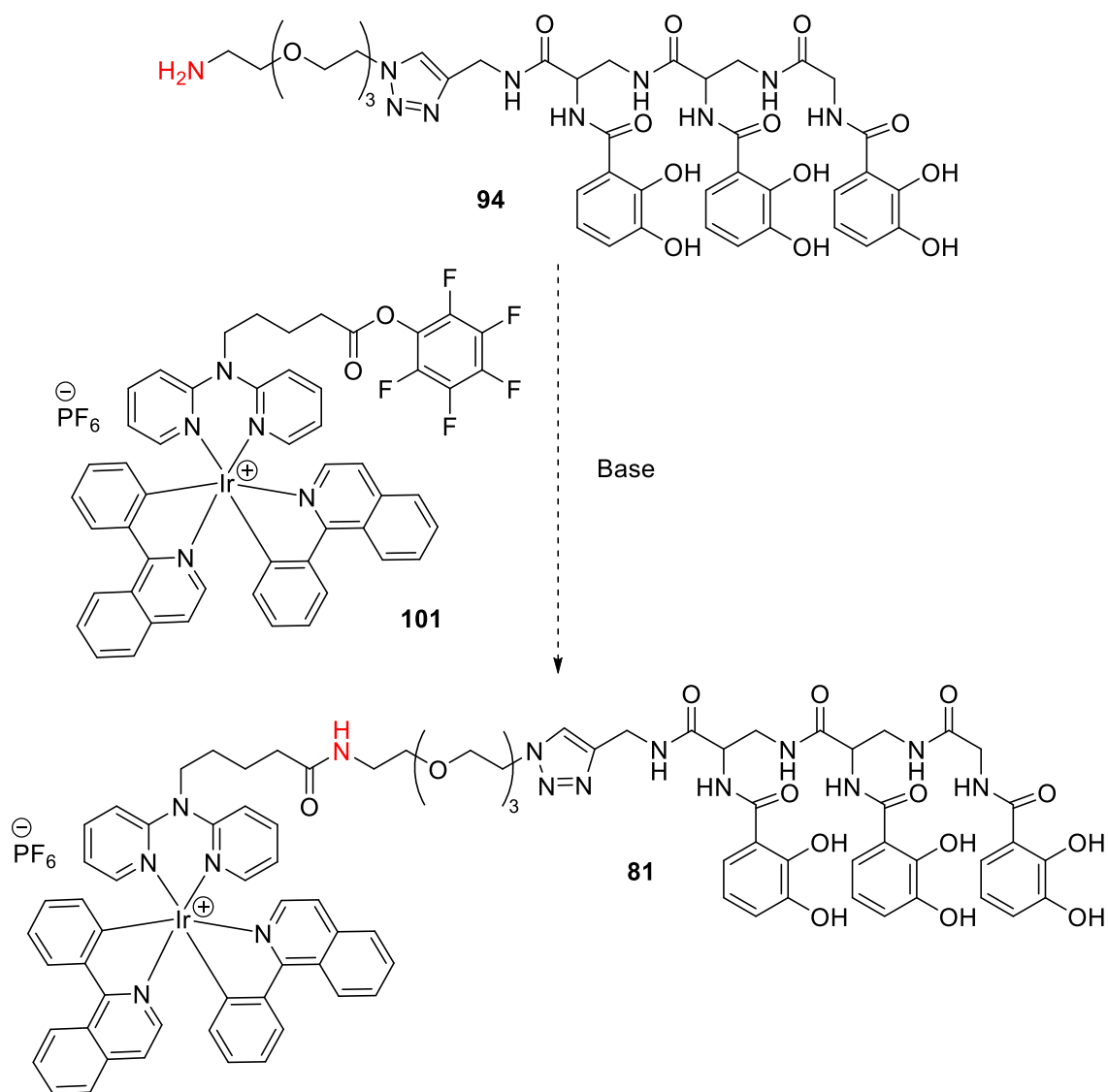


Schéma 46. Synthèse du conjugué **81** entre le vecteur sidérophore **94** et l'ester activé iridié **101**.
La fonction amine réactive est colorée en rouge.

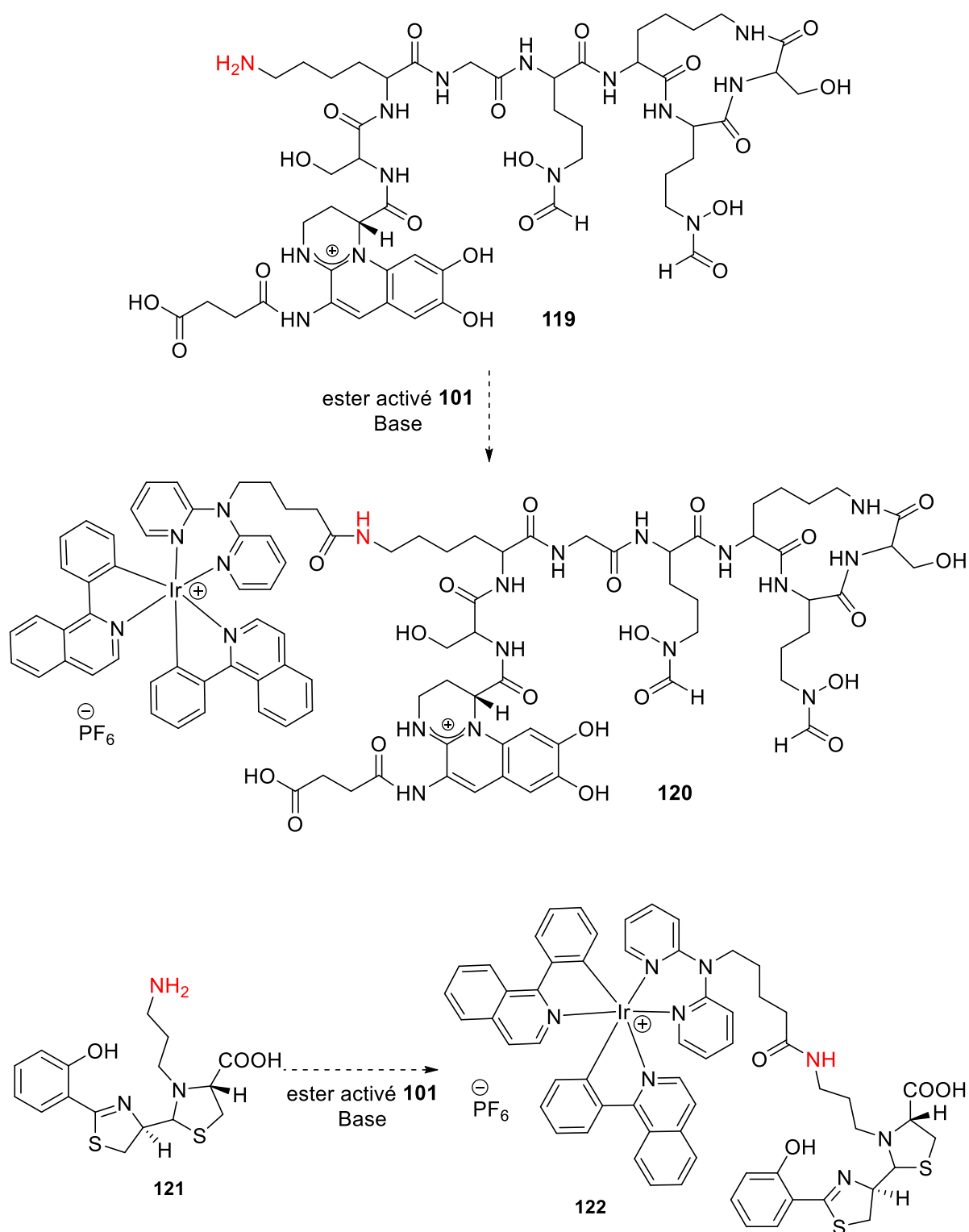


Schéma 47. Synthèse des conjugués entre les vecteurs sidérophores **119** et **121**, et l'ester activé iridié **101**. La fonction amine réactive est colorée en rouge.

Les conjugués ciblés prioritairement par ce projet sont connectés à un complexe d'iridium(III) absorbant dans le bleu majoritairement. La littérature suggère que l'utilisation de la lumière bleue, si elle est moins dangereuse que les UV, n'est pas sans danger pour les

cellules eucaryotes^{135,136} et que des photosensibilisateurs activés dans les longueurs d'ondes rouges sont globalement plus adaptées dans le cadre de la PDT antibactérienne.⁷⁴ Nos collaborateurs à Caen ont ainsi développé des complexes d'iridium(III) activables dans ces longueurs d'ondes, grâce notamment à la PDT à 2 photons qui permet aux complexes d'iridium(III) d'absorber dans le rouge (700-800 nm) au lieu du bleu (~400 nm).^{80,137}

Ainsi, une fois nos approches validées sur l'ensemble des vecteurs, des conjugués avec ces nouveaux complexes seront synthétisés. Ces composés seront testés à la fois sur des bactéries planctoniques, mais aussi sur des biofilms et des cellules hépatiques en culture, afin de déterminer à la fois l'efficacité antibactérienne et la toxicité pour les eucaryotes en présence ou en absence de lumière rouge.

Nous avons vu au cours de ce manuscrit que la Recherche demande des efforts et de la persévérance pour faire face aux nombreuses déconvenues et aléas expérimentaux. Ce que l'on appelle désormais la sérendipité peut trouver sa source dans l'échec et être à l'origine de découvertes. C'est ce qui s'est passé avec la réaction de clivage inattendu du motif dipyridylamine-acétamide (Dpaa) en présence de TFA. Nous avons mis en évidence un mécanisme nouveau et, par certains aspects, « *enzyme-like* » par la catalyse acide-base mise en jeu dans l'hydrolyse du groupe Dpaa. Il paraissait évident de vérifier que le Dpaa pouvait devenir un groupement protecteur de la fonction amine clivable de façon orthogonale à d'autres groupes protecteurs acido-labiles. Ces travaux ont conduit à la publication d'un article.¹²⁷ Une étude est en cours pour vérifier si le groupe Dpaa pourrait aussi servir à protéger des amines secondaires et si le Dpaa résiste de façon plus générale à d'autres modes de déprotection (orthogonalité potentielle avec d'autres groupes protecteurs). Enfin, nous avons mené quelques expériences préliminaires dans le but d'utiliser le motif hydrolysable découvert en intra-chaîne pour générer notamment de nouveaux espaceurs clivables *in vivo*, un Graal de la vectorisation basée sur les sidérophores. Des calculs menés par notre collaborateur, le Dr Christophe GOURLAOUEN (LCQ, Strasbourg), ont montré que la présence de substituants électrodonneurs en *para* des azotes pyridiniques du groupe Dpaa devrait permettre d'augmenter le pH d'hydrolyse aux alentours de pH 4-5 soit l'acidité du périplasma bactérien (**Figure 53**).

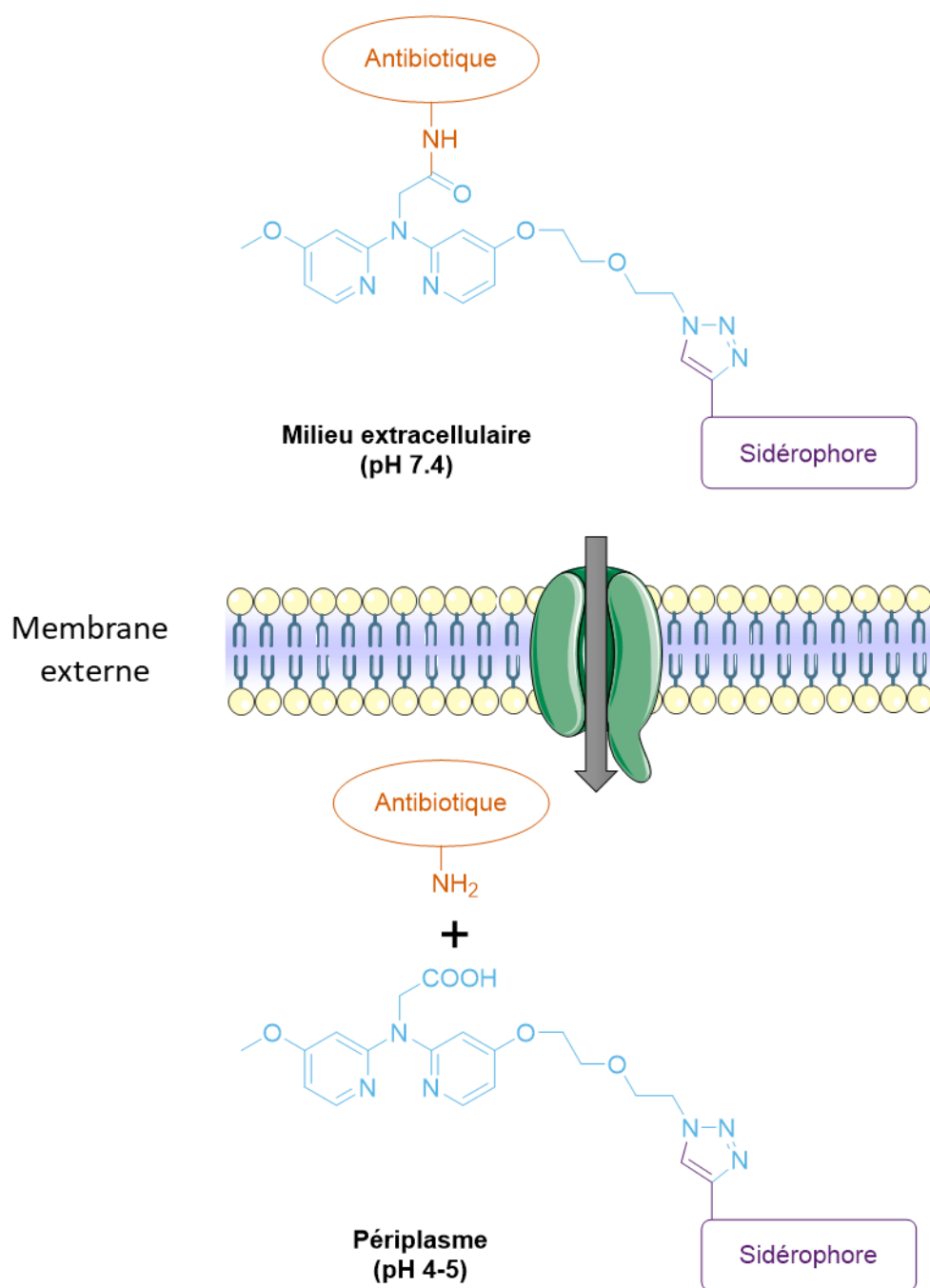


Figure 53. Projet d'utilisation du motif Dpaa en tant qu'espaceur hydrolysable dans une stratégie de cheval de Troie. Le sidérophore est coloré en violet, l'antibiotique en orange et le bras-espaceur en bleu.

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

A. Solvants et réactifs

Toutes les réactions ont été réalisées sous argon. Tous les solvants de réaction ont été utilisés avec une pureté supérieure ou égale à 99,8 % ou bien ont été achetés anhydres pour les expériences nécessitant des conditions anhydres. Tous les réactifs ont été fournis par Acros Organics, Sigma-Aldrich, FluoroChem, VWR, Alfa Aesar, Carlo Erba et TCI, et ont été utilisés sans distillation préalable.

B. Chromatographie sur Couche Mince

Les réactions ont été suivies par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) sur plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ (0,25 mm), Merck. Les plaques CCM ont été révélées sous UV (à $\lambda = 254$ nm et 365 nm), par une solution de KMnO₄, par une solution de ninhydrine, ou par une solution méthanolique de FeCl₃ dans le cas des composés chélatant le fer.

Les purifications des produits obtenus ont été réalisées sur des appareils automatisés de chromatographie Reveleris (Grace Davison, Columbia, USA) ou Selekt (Biotage, Uppsala, Sweden) utilisant des colonnes de silice prépackées puriFlash (Interchim, Montluçon, France).

C. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

Les spectres de masse basse résolution et haute résolution ont été effectués au Service Commun d'Analyse de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg (PACSI) par la technique de l'électrospray ESI⁺, sur un appareil Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS System avec Agilent 1200 Series HPLC.

D. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ont été effectués sur des spectromètres Bruker Avance 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, ^{19}F : 376 MHz) et Bruker Avance 500 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz, ^{19}F : 471 MHz), situés au PACSI. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant deutéré utilisé comme référence interne de l'échantillon. L'analyse des spectres est faite par détermination des δ , de la multiplicité (s = singulet, sl = singulet large, d = doublet, dl = doublet large, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, dt = doublet de triplet, ddd = doublet de doublet dédoublé), de l'intégration et de la constante de couplage (J) exprimée en Hertz (Hz).

E. Procédures générales

1. Détermination de CMI

Toutes les expériences de CMI ont été réalisées par Julie COUCHOT (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Service de Bactériologie, CHU de Besançon).

a. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont listées dans le **Tableau 6**. Les souches bactériennes ont été cultivées sur gélose Mueller-Hinton agar (MHA) (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD, United States) à 35 ± 2 °C pendant 18 heures. Les cultures bactériennes ont été incubées dans du milieu Mueller-Hinton (MHB) ajusté en cations (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD, États-Unis) à 35 ± 2 °C pendant 18 heures.

Tableau 6. Souches bactériennes.

Souches	Description
ATCC 27853	Souche de référence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAO1	Souche sauvage de référence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , sensible aux antibiotiques
ATCC 25922	Souche de référence de <i>Escherichia coli</i>
CIP 70.10	Souche de référence de <i>Acinetobacter baumannii</i>
ATCC 29213	Souche de référence de <i>Staphylococcus aureus</i>

b. Molécules chimiques

Pour toutes les molécules, les poudres ont été stockées à l'obscurité à -4 °C et les solutions mères préparées dans du DMSO à 10,2 mg/mL ont été stockées à l'obscurité à -20 °C. Dans chaque test, les molécules ont été testées pour des concentrations ≤ 128 mg/L, portant ainsi le DMSO à des concentrations finales qui ne dépassaient pas 5 %.

c. Dispositif d'éclairage et procédure de traitement par la lumière

Les traitements d'illumination ont été effectués à l'aide d'un projecteur RVB (B04-10M-RGB Meikee Lighting, Guandong, Chine). Ce dispositif d'illumination a été utilisé pour effectuer une illumination latérale à l'aide de LED bleues (452 nm, 387,8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$), vertes (525 nm, 238,2 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) ou rouges (631 nm, 320 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) à l'intensité lumineuse minimale. Le dispositif LED a été placé à 1 cm de l'incubateur à parois transparentes (Type U3/8, Julabo, Seelbach, Allemagne). Le chauffage résultant de l'émission de lumière a été tempéré par le bain-marie. Les bactéries ont été exposées à un traitement lumineux pendant une durée spécifique en fonction de l'expérience réalisée. L'effet de ce traitement a été évalué en comparant les échantillons soumis à la lumière avec les mêmes échantillons conservés dans l'obscurité (bain-marie ordinaire ; T100-ST5, Dominique Dutscher, Bernolsheim, France).

d. Tests de sensibilité aux molécules chimiques

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des molécules ont été déterminées par la méthode standard de microdilution en série, telle que recommandée par le CLSI

(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020).¹³⁸ Des gammes de 0,06 à 128 mg/L de molécules diluées dans du DMSO ont été réalisées en MHB dans des tubes de microcentrifugation transparents de 1,5 mL. Les colonies bactériennes d'une culture d'une nuit sur des géloses MHA ont été ajustées à 108 UFC/mL dans de l'eau distillée et diluées pour obtenir une concentration finale de 103 UFC/mL dans chaque tube. Les cultures bactériennes ont été incubées à $35 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 18 heures avec ou sans irradiation lumineuse comme présenté ci-dessus.

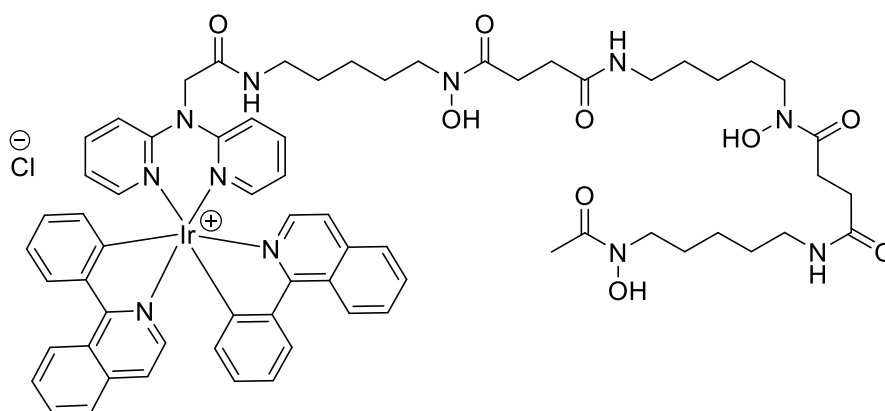
2. Coordination à l'Ir(III)

Toutes les réactions de coordination à l'iridium(III) ont été réalisées par Julien RENAULT (LCMT, ENSICAen).

Dans un tube de Schlenk sous atmosphère inerte, le ligand dpa (2,4 éq.) et le dimère d'iridium(III) **59** (1 éq.) sont dissous dans un mélange de DCM/MeOH (2/1) dégazé. Le milieu réactionnel est agité à 60°C pendant une nuit, concentré sous pression réduite, puis purifié par SEC (*Size Exclusion Chromatography*) sur des billes *Bio-Beads*® S-X3 dans le DCM.

II. Protocoles et données analytiques et spectrales

[Ir(Piq)₂ N-DFO dpa]Cl **47b**



Formule brute : C₆₇H₇₇ClIrN₁₁O₉

MM : 1408,09 g.mol⁻¹

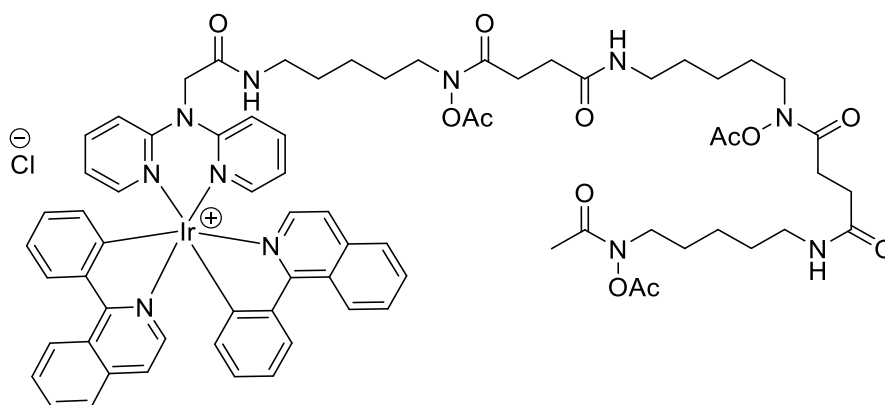
47b est synthétisé à l'aide de la procédure générale n°2 à partir de **49** (20 mg, 25,9 μmoles, 2,4 éq.) dans un mélange DCM/MeOH (1 mL/0,5 mL) à température ambiante. **47b** est obtenu sous la forme d'une poudre orange (27 mg, 9,6 μmoles, rdt : 89 %).

RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) : δ 10.00 (sl, 1H), 9.84 (sl, 1H), 9.69 (sl, 1H), 8.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.73 (sl, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.11 (s, 2H), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.74 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H), 7.63 – 7.52 (m, 8H), 7.02 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.78 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.74 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 6.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.90 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 3.75 – 3.53 (m, 6H), 3.34 – 3.22 (m, 2H), 3.21 – 3.11 (m, 4H), 2.93 – 2.77 (m, 4H), 2.66 – 2.47 (m, 4H), 2.09 (s, *J* = 15.5 Hz, 3H), 1.74 – 1.54 (m, 8H), 1.53 – 1.42 (m, 6H), 1.35 – 1.18 (m, 4H).

RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃) : δ 174.0, 173.3, 173.1, 172.3, 169.0, 168.0, 156.0, 153.0, 150.4, 145.6, 142.0, 140.3, 137.3, 132.4, 131.8, 130.8, 128.7, 127.8, 126.9, 126.5, 122.4, 121.5, 121.2, 118.1, 57.5, 47.4, 46.7, 39.3, 39.1, 38.9, 31.9, 31.6, 28.9, 28.6, 28.5, 28.4, 28.0, 26.2, 26.1, 25.5, 23.9, 23.5, 22.7, 20.9.

MS-HR : calculée pour C₆₇H₇₇N₁₁O₉¹⁹³Ir ([M-Cl]⁺) : 1372.5525 ; trouvée : 1372.5535.

$[\text{Ir}(\text{Piq})_2 \text{N-DFO}(\text{Ac}) \text{dpa}]\text{Cl}$ **48b**



Formule brute : $\text{C}_{73}\text{H}_{83}\text{ClIrN}_{11}\text{O}_{12}$

MM : $1534,20 \text{ g.mol}^{-1}$

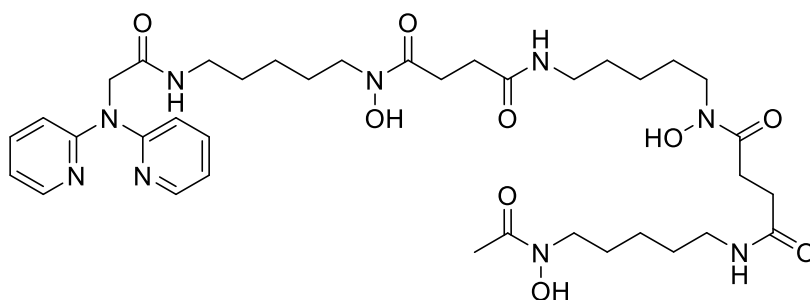
48b est synthétisé à l'aide de la procédure générale n°2 à partir de **50** (20 mg, 22,3 μmoles , 2,4 éq.) dans un mélange DCM/MeOH (2 mL/1 mL). **48b** est obtenu sous la forme d'un solide orange (37 mg, 7,1 μmoles , rdt : 77 %).

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) : δ 9.31 (sl, 1H), 8.87 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 8.19 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 2H), 8.12 (sl, 2H), 8.00 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H), 7.77 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H), 7.72 (dd, $J = 15.3, 7.8 \text{ Hz}$, 4H), 7.65 – 7.52 (m, 6H), 7.01 (t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H), 6.84 (sl, 1H), 6.77 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H), 6.70 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 2H), 6.49 (sl, 1H), 6.28 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H), 4.98 (d, $J = 17.0 \text{ Hz}$, 1H), 4.65 (d, $J = 17.0 \text{ Hz}$, 1H), 3.74 – 3.59 (m, 6H), 3.33 – 3.12 (m, 6H), 2.68 – 2.40 (m, 6H), 2.19 (s, 12H), 1.98 (s, 2H), 1.65 – 1.44 (m, 12H), 1.42 – 1.22 (m, 6H).

RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) : δ 172.8, 172.2, 172.0, 168.9, 168.7, 168.2, 156.1, 153.1, 150.2, 145.6, 142.1, 140.3, 137.3, 132.4, 131.7, 130.7, 130.3, 128.6, 127.9, 126.9, 126.4, 122.3, 121.5, 121.0, 118.2, 57.6, 47.5, 39.6, 39.3, 39.2, 30.9, 30.5, 29.8, 29.0, 28.9, 28.3, 27.9, 26.6, 26.4, 24.1, 23.8, 23.6, 20.4, 18.6.

MS-HR : calculée pour $\text{C}_{73}\text{H}_{83}\text{N}_{11}\text{O}_{12}^{193}\text{Ir}$ ($[\text{M}-\text{Cl}]^+$) : 1498.5852 ; trouvée : 1498.5870.

*N*¹-(5-(2-(di(pyridin-2-yl)amino)acétamido)pentyl)-*N*¹-hydroxy-*N*⁴-(5-(*N*-hydroxy-4-((5-(*N*-hydroxyacétamido)pentyl)amino)-4-oxobutan amido)pentyl)succinamide **49**



Formule brute : C₃₇H₅₇N₉O₉

MM : 771,92 g.mol⁻¹

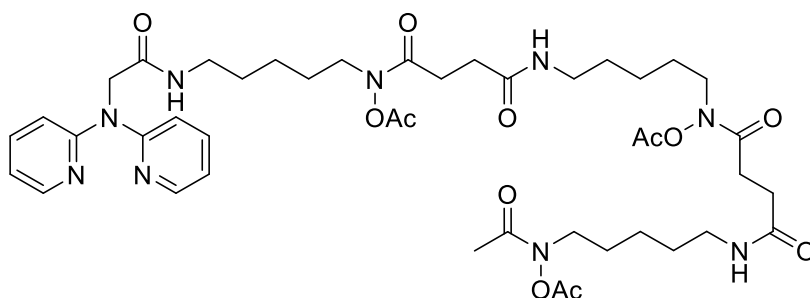
À une solution des composés **46** (405 mg, 0,58 mmole, 1 éq.) et **51** (200 mg, 0,58 mmole, 1 éq.) dans de la DMF (6 mL), est ajoutée la DIPEA (151 mg, 0,19 mL, 1,17 mmole, 2 éq.). Le mélange est chauffé à 70 °C pendant 30 minutes, puis l'EDC.HCl (236 mg, 1,24 mmole, 2,1 éq.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à 70 °C pendant 5 heures. Le mélange réactionnel est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient MeOH avec 0,5 % H₂O dans DCM, 0 % à 30 %) pour conduire au composé **49** sous la forme d'un solide blanc (401 mg, 0,52 mmole, rdt : 91 %).

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6) : δ 9.66 (s, 1H), 9.61 (s, 2H), 8.27 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H), 7.82 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.77 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 7.65 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.96 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.51 – 3.39 (m, 6H), 3.06 – 2.95 (m, 6H), 2.56 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H), 2.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 1.96 (s, 3H), 1.56 – 1.42 (m, 6H), 1.42 – 1.30 (m, 6H), 1.30 – 1.17 (m, 6H).

RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*6) : δ 172.0, 171.3, 170.2, 169.1, 156.4, 147.7, 137.5, 117.4, 114.2, 50.7, 47.1, 46.8, 38.4, 38.3, 29.9, 28.8, 28.8, 27.6, 26.0, 23.5, 23.3, 20.4.

MS-HR : calculée pour C₃₇H₅₇N₉O₉ : 771.4279 ; trouvée : 771.4283.

*N*¹-acétoxy-*N*¹-(5-(4-(acétoxy(5-(2-(di(pyridin-2-yl)amino)acétamido)pentyl)amino)-4-oxobutanamido)pentyl)-*N*⁴-(5-(*N*-acétoxyacétamido)pentyl)succinamide **50**



Formule brute : C₄₃H₆₃N₉O₁₂

MM : 898,03 g.mol⁻¹

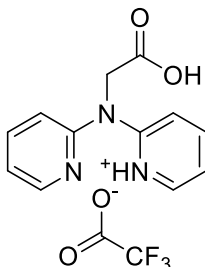
À une solution du composé **49** (140 mg, 0,18 mmole, 1 éq.) dans de l'acétone (40 mL), sont ajoutés successivement le carbonate d'argent (239 mg, 0,87 mmole, 4,8 éq.) et l'anhydride acétique (188 mg, 173 µL, 1,84 mmole, 10 éq.). Le milieu réactionnel est agité à reflux (56 °C) pendant 5 heures jusqu'à l'apparition d'un précipité noir, puis est dilué à l'acétone (50 mL). Le précipité noir est éliminé par décantation et le surnageant est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 20 %) pour conduire au composé **50** sous la forme d'une huile jaune (115 mg, 0,13 mmole, rdt : 71 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.29 (dd, *J* = 5.3, 1.9 Hz, 2H), 7.56 (ddd, *J* = 8.9, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.23 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.91 (dd, *J* = 7.2, 4.0 Hz, 2H), 6.47 (sl, 1H), 6.39 (sl, 1H), 4.66 (s, 2H), 3.70 – 3.57 (m, 4H), 3.53 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.15 (p, *J* = 6.7 Hz, 6H), 2.53 (s, 4H), 2.48 – 2.37 (m, 4H), 2.16 (s, 6H), 2.15 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.58 – 1.24 (m, 18H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 171.8, 170.8, 156.6, 148.4, 137.9, 118.1, 114.7, 53.0, 47.5, 39.3, 39.2, 38.9, 30.5, 29.0, 27.9, 27.8, 26.4, 23.8, 23.6, 23.5, 20.3, 18.6, 18.5.

MS-HR : calculée pour C₄₃H₆₃N₉O₁₂ : 897.4596 ; trouvée : 897.4613.

2-((carboxyméthyl)(pyridin-2-yl)amino)pyridin-1-ium 2,2,2-trifluoroacétate **51**



Formule brute : C₁₄H₁₂F₃N₃O₄

MM : 343,26 g.mol⁻¹

À une solution du composé **57** (1,0 g, 3,5 mmoles, 1 éq.) dans du DCM (11 mL), sont ajoutés le TIPS (428 mg, 0,55 mL, 2,7 mmoles, 0,8 éq.) et le TFA (4,2 g, 2,75 mL, 37,0 mmoles, 10 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 24 °C pendant 16 heures, puis est concentré sous pression réduite. De l'éther froid (-20 °C) est ajouté au brut réactionnel. Après 1 heure à -20 °C, le précipité est récupéré par filtration sur papier filtre sous pression réduite pour conduire au composé **51** sous la forme d'un solide blanc (990 mg, 2,9 mmoles, rdt : 82 %).

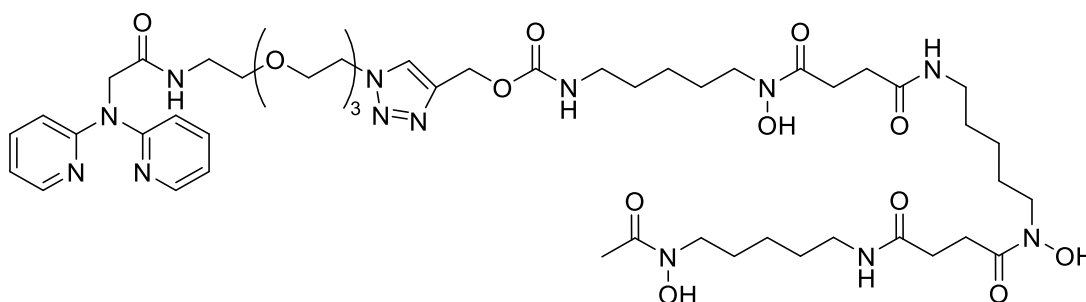
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) : δ 8.32 (ddd, *J* = 5.0, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.73 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.30 (dt, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 2H), 7.03 (ddd, *J* = 7.2, 5.0, 0.9 Hz, 2H), 4.83 (s, 2H).

RMN ¹⁹F (376 MHz, DMSO-*d*6) : δ -74.9.

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*6) : δ 171.3, 155.6, 147.2, 138.3, 117.7, 114.1, 49.3.

MS (ESI⁺) : *m/z* 230.1 [M+H]⁺.

(1-(1-(di(pyridin-2-yl)amino)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatétradécan-14-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl (3,14,25-trihydroxy-2,10,13,21,24-penta oxo-3,9,14,20,25-pentaazatriacontan-30-yl)carbamate **54**



Formule brute : $C_{49}H_{77}N_{13}O_{14}$

MM : 1072,23 g.mol⁻¹

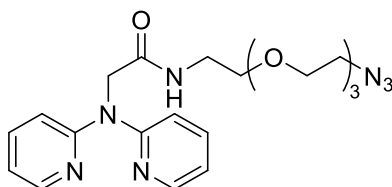
À une solution du composé **56** (153 mg, 0,24 mmole, 0,96 éq.) dans du THF (7 mL), sont ajoutées une solution du composé **55** (106 mg, 0,25 mmole, 1 éq.) dans du THF (7 mL) puis de l'eau (7 mL). Après 30 minutes à 24 °C, l'ascorbate de sodium (144 mg, 0,73 mmole, 3 éq.) et la solution aqueuse saturée de CuSO₄ (40 µL) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à 24 °C pendant 20 heures, puis est adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient MeOH avec 0,5 % H₂O dans DCM, 0 % à 30 %). La fraction récupérée est précipitée dans de l'acétone pour conduire au composé **54** sous la forme d'un solide blanc cassé (112 mg, 0,10 mmole, rdt : 44 %).

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6) : δ 9.73 (s, 1H), 9.67 (s, 2H), 8.28 – 8.25 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 7.92 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.65 (ddd, *J* = 9.0, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.96 (ddd, *J* = 7.2, 4.9, 0.9 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.72 (s, 2H), 4.50 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.79 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.52 – 3.43 (m, 16H), 3.19 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.02 – 2.91 (m, 6H), 2.60 – 2.53 (m, 4H), 2.26 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 1.96 (s, 3H), 1.53 – 1.44 (m, 6H), 1.41 – 1.33 (m, 6H), 1.25 – 1.15 (m, 6H).

RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*6) : δ 172.0, 171.4, 170.2, 169.5, 156.4, 155.9, 147.8, 142.6, 137.6, 124.9, 117.4, 114.2, 69.7, 69.7, 69.6, 69.5, 69.0, 68.7, 56.9, 50.7, 49.4, 47.1, 46.8, 40.2, 38.6, 38.5, 30.0, 29.1, 28.8, 27.7, 26.1, 23.5, 23.4, 20.4.

MS-HR : calculée pour C₄₉H₇₇N₁₃O₁₄ : 1071.5713 ; trouvée : 1071.5752.

N-(2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl)-2-(di(pyridin-2-yl)amino)acétamide **55**



Formule brute : $C_{20}H_{27}N_7O_4$

MM : 429,48 g.mol⁻¹

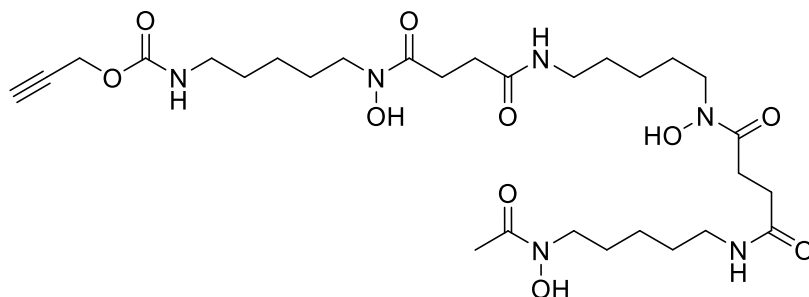
À une solution du composé **51** (501 mg, 1,9 mmole, 1 équ.) dans du DCM (90 mL), sont ajoutés le 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol-1-amine **58** (400 mg, 364 µL, 1,7 mmole, 0,95 équ.) et la DIPEA (469 mg, 0,6 mL, 3,6 mmoles, 2 équ.). Après dissolution totale du solide, l'EDC.HCl (696 mg, 3,6 mmoles, 2 équ.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 5 heures, est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 10 %) pour conduire au composé **55** sous la forme d'une huile jaune (573 mg, 1,3 mmole, rdt : 77 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.33 (ddd, *J* = 4.9, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.57 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.42 (sl, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.92 (ddd, *J* = 7.3, 4.9, 0.9 Hz, 2H), 4.74 (s, 2H), 3.63 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.62 – 3.56 (m, 4H), 3.52 – 3.39 (m, 8H), 3.35 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 170.9, 156.7, 148.5, 137.8, 118.0, 114.6, 70.8, 70.7, 70.7, 70.4, 70.1, 70.0, 53.0, 50.8, 39.2.

MS-HR : calculée pour $C_{20}H_{27}N_7O_4$: 429.2125 ; trouvée : 429.2136.

prop-2-yn-1-yl (3,14,25-trihydroxy-2,10,13,21,24-pentaoxo-3,9,14,20,25-pentaazatriacontan-30-yl)carbamate **56**



Formule brute : $C_{29}H_{50}N_6O_{10}$

MM : 642,75 g.mol⁻¹

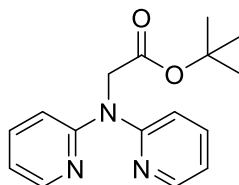
À une solution du composé **46** (300 mg, 0,42 mmole, 1 éq.) dans de la DMF (3 mL), est ajoutée la DIPEA (235 mg, 300 μ L, 1,82 mmole, 4,3 éq.) et le milieu réactionnel est porté à 90 °C. Le chloroformiate de propargyle (91 mg, 75 μ L, 0,77 mmole, 1,8 éq.) est ajouté d'un trait. Le milieu réactionnel est agité à 90 °C pendant 5 minutes avant d'être adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient MeOH avec 0,5 % H₂O dans DCM, 0 % à 30 %) pour conduire au composé **56** sous la forme d'un solide blanc (235 mg, 0,37 mmole, rdt : 86 %).

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6) : δ 9.66 (s, 1H), 9.61 (s, 2H), 7.77 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 7.29 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.66 – 3.55 (m, 1H), 3.49 – 3.42 (m, 7H), 3.18 – 3.08 (m, 1H), 3.03 – 2.92 (m, 4H), 2.57 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.26 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 1.96 (s, 3H), 1.54 – 1.45 (m, 6H), 1.43 – 1.33 (m, 6H), 1.23 – 1.16 (m, 6H).

RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*6) : δ 172.0, 171.3, 170.1, 155.2, 76.9, 53.5, 51.3, 47.1, 46.8, 41.8, 40.3, 38.4, 29.9, 29.0, 28.8, 27.6, 26.0, 23.5, 23.3, 20.4.

MS-HR : calculée pour $C_{29}H_{50}N_6O_{10}$: 642.3588 ; trouvée : 642.3605.

tert-butyl di(pyridin-2-yl)glycinate **57**



Formule brute : C₁₆H₁₉N₃O₂

MM : 285,35 g.mol⁻¹

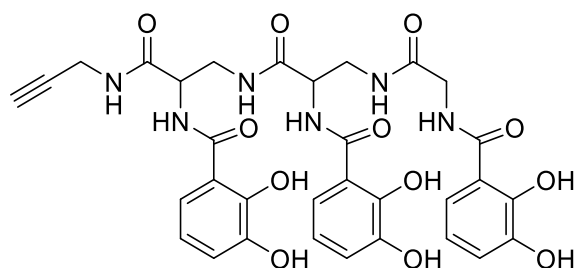
À une solution du composé **52** (1,0 g, 5,9 mmoles, 1 éq.) dans du DMSO (10 mL), est ajouté l'hydroxyde de potassium (1,6 g, 29,3 mmoles, 5 éq.). Le mélange est agité à 28 °C pendant 16 heures. Le ballon est mis dans un bain d'acétone à 15 °C puis le *tert*-butyl bromoacétate (2,3 g, 1,7 mL, 11,7 mmoles, 2 éq.) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est ramené lentement à 28 °C, est agité pendant 6 heures, puis est dilué à l'eau (100 mL). La phase aqueuse est extraite à l'Et₂O (4 x 100 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice puis purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient AcOEt dans cyclohexane, 5 % à 50 %) pour conduire au composé **57** sous la forme d'une huile jaune (1,5 g, 5,2 mmoles, rdt : 88 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.32 (ddd, *J* = 4.9, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.52 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.22 (dt, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 2H), 6.86 (ddd, *J* = 7.2, 4.9, 0.9 Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 1.42 (s, 9H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) : δ 170.4, 156.9, 148.4, 137.3, 117.4, 114.0, 81.1, 50.8, 28.2.

MS (ESI⁺) : *m/z* 286.2 [M+H]⁺.

N-(7-(2,3-dihydroxybenzamido)-1-(2,3-dihydroxyphényl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétraazahexadec-15-yn-11-yl)-2,3-dihydroxybenzamide **63**



Formule brute : $C_{32}H_{32}N_6O_{12}$

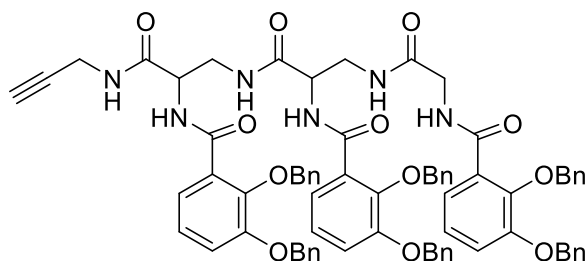
MM : 692,64 g.mol⁻¹

À une solution du composé **63d** (200 mg, 0,14 mmole, 1 éq.) dans du DCM (6 mL), sont ajoutés le TIPS (387 mg, 500 µL, 2,44 mmoles, 17 éq.) et le TFA (525 mg, 342 µL, 4,60 mmoles, 33 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 22 heures, puis est concentré sous pression réduite. Le brut réactionnel est dilué dans un mélange DCM/MeOH/H₂O, adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient MeOH avec 0,5 % H₂O dans DCM, 0 % à 30 %) pour conduire au composé **63** sous la forme d'un solide blanc (46 mg, 0,07 mmole, rdt : 47 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 12.23 (sl, 1H), 12.01 (sl, 2H), 9.23 (slz, 3H), 9.02 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.54 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.36 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.14 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.32 – 7.23 (m, 3H), 6.96 – 6.88 (m, 3H), 6.74 – 6.62 (m, 3H), 4.58 – 4.45 (m, 2H), 3.95 – 3.77 (m, 4H), 3.63 – 3.53 (m, 2H), 3.47 – 3.38 (m, 2H), 3.09 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H).

MS-HR : calculée pour $C_{32}H_{32}N_6O_{12}$: 692.2078 ; trouvée : 692.2070.

2,3-bis(benzyloxy)-N-(7-(2,3-bis(benzyloxy)benzamido)-1-(2,3-bis(benzyloxy)phényl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétraazahexadec-15-yn-11-yl)benzamide **63c**



Formule brute : $C_{74}H_{68}N_6O_{12}$

MM : 1233,39 g.mol⁻¹

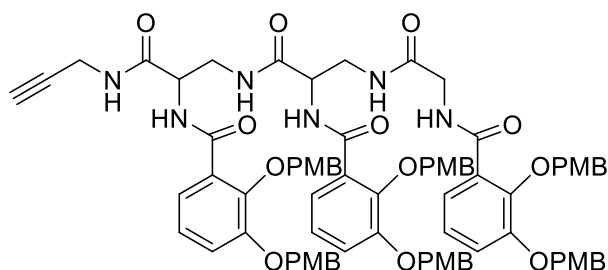
À une solution du composé **79** (522 mg, 0,89 mmole, 1 éq.) dans du DCM anhydre (8,9 mL), est ajouté le TFA (5,8 g, 3,8 mL, 51,29 mmoles, 57 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 31 °C pendant 23 heures, puis concentré sous pression réduite. La triamine résultante **86** est dissoute dans du THF anhydre (16 mL). Puis sont ajoutées la DIPEA anhydre (2,7 g, 3,5 mL, 21,18 mmoles, 24 éq.) et la molécule **70c** (1,4 g, 2,75 mmoles, 3 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 31 °C pendant 3 jours, puis dilué avec du DCM (20 mL). La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique 10 % (20 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (2 x 20 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice puis purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 5 %) pour conduire au composé **63c** sous la forme d'un solide blanc (755 mg, 0,61 mmole, rdt : 69 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.77 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 8.49 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 2H), 7.49 – 7.42 (m, 4H), 7.42 – 7.30 (m, 20H), 7.29 – 7.21 (m, 9H), 7.07 (dd, J = 8.2, 1.6 Hz, 1H), 7.01 (pd, J = 8.2, 2.6 Hz, 4H), 6.96 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.19 – 5.01 (m, 12H), 4.73 – 4.68 (m, 1H), 4.49 – 4.42 (m, 1H), 4.03 – 3.87 (m, 2H), 3.77 – 3.66 (m, 2H), 3.60 – 3.52 (m, 1H), 3.46 – 3.35 (m, 2H), 3.30 – 3.21 (m, 1H), 2.14 (t, J = 2.5 Hz, 1H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 170.9, 170.2, 169.8, 166.3, 166.0, 165.8, 151.9, 151.9, 151.8, 147.1, 146.9, 136.6, 136.6, 136.5, 136.5, 136.4, 136.3, 129.3, 129.2, 128.8, 128.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.3, 127.8, 127.8, 127.8, 127.4, 126.8, 124.4, 124.3, 124.2, 123.2, 123.0, 122.9, 117.5, 117.4, 117.4, 76.6, 76.2, 76.2, 71.5, 71.4, 71.4, 54.2, 54.0, 44.0, 43.5, 41.0, 29.3.

MS-HR : calculée pour $C_{74}H_{68}N_6O_{12}$: 1232.4895 ; trouvée : 1232.4880.

N-(7-(2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzamido)-1-(2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)phényl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétraaza hexadec-15-yn-11-yl)-2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzamide **63d**



Formule brute : $C_{80}H_{80}N_6O_{18}$

MM : 1413,54 g.mol⁻¹

À une solution du composé **79** (257 mg, 0,44 mmole, 1 éq.) dans du DCM (4,9 mL), est ajouté le TFA (3,2 g, 2,1 mL, 28,27 mmoles, 64 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 24 °C pendant 18 heures, puis concentré sous pression réduite. La triamine résultante **86** est dissoute dans du THF anhydre (7,8 mL). Puis sont ajoutées la DIPEA anhydre (743 mg, 950 µL, 5,75 mmoles, 13 éq.) et la molécule **70d** (741 mg, 1,32 mmole, 3 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 24 °C pendant 3 jours, puis dilué avec du DCM (10 mL). La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique 10 % (10 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (2 x 10 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice puis purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 6 %) pour conduire au composé **63d** sous la forme d'un solide blanc (476 mg, 0,34 mmole, rdt : 77 %).

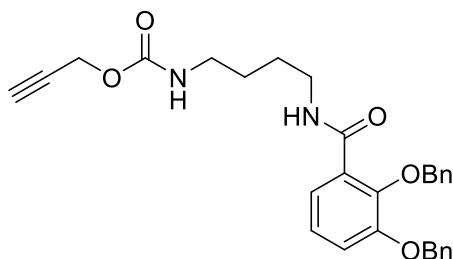
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.66 – 8.58 (m, 2H), 7.66 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 3H), 7.46 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.43 – 7.30 (m, 7H), 7.29 – 7.21 (m, 5H), 7.07 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.04 – 6.98 (m, 4H), 6.98 – 6.86 (m, 8H), 6.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.74 (dd, *J* = 8.6, 3.5 Hz, 4H), 5.10 – 4.92 (m, 12H), 4.78 – 4.72 (m, 1H), 4.48 (q, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.05 – 3.90 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.65 – 3.58 (m, 1H), 3.50 – 3.42 (m, 2H), 3.37 – 3.30 (m, 1H), 2.15 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 170.9, 170.3, 169.9, 166.3, 166.0, 165.8, 160.0, 159.8, 159.8, 159.8, 159.7, 159.7, 151.9, 151.9, 147.1, 147.0, 131.1, 131.1, 131.0, 129.7, 129.6, 129.6, 128.7, 128.6, 128.6, 128.6, 128.5, 128.5, 127.4, 127.1, 126.6, 124.3, 124.1, 124.0, 123.1,

122.9, 122.8, 117.5, 117.4, 117.4, 114.1, 114.1, 114.0, 113.8, 113.8, 79.7, 76.1, 75.8, 75.7, 71.5, 71.2, 55.4, 55.4, 55.3, 55.3, 54.2, 53.9, 44.0, 43.5, 40.9, 29.2.

MS-HR : calculée pour $C_{80}H_{80}N_6O_{18}$: 1412.5529 ; trouvée : 1412.5589.

prop-2-yn-1-yl (4-(2,3-bis(benzyloxy)benzamido)butyl)carbamate
65c



Formule brute : $C_{29}H_{30}N_2O_5$

MM : 486,57 g.mol⁻¹

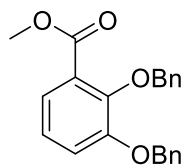
À une solution du composé **71c** (739 mg, 1,8 mmole, 1 éq.) dans du DCM (17 mL), sont ajoutés la DIPEA (709 mg, 906 μ L, 5,5 mmoles, 3 éq.) et le chloroformiate de propargyle (267 mg, 220 μ L, 2,2 mmoles, 1,2 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 24 °C pendant 6 heures, adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 4 %) pour conduire au composé **65c** sous la forme d'un solide blanc (871 mg, 1,8 mmole, rdt : 98 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.95 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.76 – 7.71 (m, 1H), 7.49 – 7.45 (m, 2H), 7.43 – 7.33 (m, 8H), 7.16 – 7.13 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.85 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 4.66 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.26 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 3.10 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.45 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 1.43 – 1.29 (m, 4H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 165.2, 155.5, 151.8, 146.9, 136.6, 136.5, 128.9, 128.8, 128.8, 128.8, 128.4, 127.8, 127.3, 124.5, 123.5, 117.1, 76.5, 74.6, 71.4, 52.4, 40.9, 39.3, 27.3, 26.7.

MS-HR : calculée pour $C_{29}H_{30}N_2O_5$: 486.2155 ; trouvée : 486.2161.

2,3-bis(benzyloxy)benzoate de méthyle **68c**



Formule brute : C₂₂H₂₀O₄

MM : 348,40 g.mol⁻¹

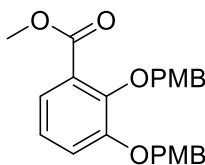
À une solution du composé **67** (500 mg, 3,0 mmoles, 1 équ.) dans de l'acétone (15 mL), sont ajoutés le K₂CO₃ anhydre (2,1 g, 15,0 mmoles, 5 équ.) et le bromure de benzyle (1,5 g, 1,1 mL, 8,9 mmoles, 3 équ.). Le milieu réactionnel est agité à 56 °C pendant 2 heures, filtré, concentré sous pression réduite, repris dans du pentane froid (40 mL), soniqué pendant 5 minutes, puis laissé à 4 °C pendant 2 heures. Le précipité est filtré et récupéré pour conduire au composé **68c** sous la forme d'un solide blanc (843 mg, 2,4 mmoles, rdt : 81 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.45 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 7.41 – 7.28 (m, 7H), 7.15 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.09 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 3.86 (s, 3H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 166.9, 153.0, 148.4, 137.6, 136.7, 128.7, 128.4, 128.2, 128.1, 127.7, 127.0, 124.1, 123.0, 118.2, 75.8, 71.5, 52.3.

MS (ESI⁺) : m/z 349.1 [M+H]⁺.

2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzoate de méthyle **68d**



Formule brute : $C_{24}H_{24}O_6$

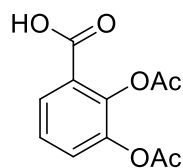
MM : 408,45 g.mol⁻¹

À une solution du composé **67** (1,5 g, 8,9 mmoles, 1 éq.) dans de l'acétone (45 mL), sont ajoutés le TBAI (1,6 g, 4,5 mmoles, 0,5 éq.) et le K_2CO_3 anhydre (2,6 g, 18,6 mmoles, 2 éq.). Après 15 minutes à 25 °C, le chlorure de 4-méthoxybenzyle (4,2 g, 3,7 mL, 27,0 mmoles, 3 éq.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité fortement à 56 °C pendant 22 heures, concentré sous pression réduite, repris dans du DCM (100 mL), lavé avec une solution d'acide citrique 10 % (100 mL), puis à la saumure. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée, adsorbée sur silice avec 1 % de triéthylamine puis purifiée par chromatographie sur gel de silice (gradient Et_2O + 0,1 % triéthylamine dans cyclohexane + 0,1 % triéthylamine, 5 % à 50 %) pour conduire au composé **68d** sous la forme d'un solide blanc (3,6 g, 8,9 mmoles, rdt : 100 %).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39 – 7.32 (m, 5H), 7.13 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.06 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.94 – 6.89 (m, 2H), 6.85 – 6.81 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (s, 3H).

MS (ESI⁺) : m/z 431.2 $[M+Na]^+$.

Acide 2,3-diacétoxybenzoïque **69b**



Formule brute : $C_{11}H_{10}O_6$

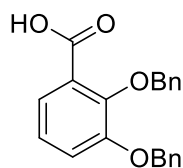
MM : 238,20 g.mol⁻¹

À une solution du composé **66** (500 mg, 3,2 mmoles, 1 éq.) dans de la triéthylamine (2,7 mL), sont ajoutés l'anhydride acétique (994 mg, 914 μ L, 9,7 mmoles, 3 éq.) et la DMAP (39 mg, 0,3 mmole, 0,1 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 89 °C pendant 1 heure, puis revient à 28 °C pour être concentré sous pression réduite. Le brut réactionnel est repris dans du DCM (50 mL), est lavé avec une solution de HCl à 0,5 N (100 mL) à froid, puis à la saumure à froid. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée, puis concentrée sous pression réduite pour conduire au composé **69b** sous la forme d'un solide brun (728 mg, 3,1 mmoles, rdt : 94 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 13.29 (sl, 1H), 7.81 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.26 (s, 3H).

MS (ESI⁺) : m/z 261.0 [M+Na]⁺.

Acide 2,3-bis(benzyloxy)benzoïque **69c**



Formule brute : $C_{21}H_{18}O_4$

MM : 334,37 g.mol⁻¹

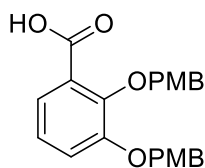
À une solution du composé **68c** (250 mg, 0,7 mmole, 1 éq.) dans du THF (3,5 mL), est ajouté le TMSOK (456 mg, 3,6 mmoles, 5 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 65 °C pendant 4 heures, concentré sous pression réduite, puis repris dans une solution saturée de NH_4Cl (15 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (2 x 15 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées, puis concentrées sous pression réduite pour conduire au composé **69c** sous la forme d'un solide jaune pâle (241 mg, 0,7 mmole, rdt : 100 %).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 11.38 (s, 1H), 7.74 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.46 – 7.39 (m, 3H), 7.39 – 7.31 (m, 5H), 7.27 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.19 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 5.20 (s, 2H).

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) : δ 165.4, 151.5, 147.3, 136.0, 134.8, 129.4, 129.0, 128.9, 128.7, 127.9, 125.1, 124.6, 123.2, 119.2, 77.2, 71.7.

MS (ESI⁺) : m/z 335.1 $[M+H]^+$.

Acide 2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzoïque **69d**



Formule brute : $C_{23}H_{22}O_6$

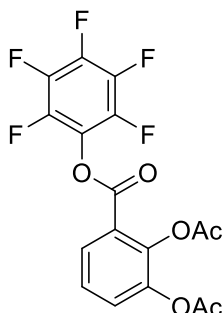
MM : 394,42 g.mol⁻¹

À une solution du composé **68d** (825 mg, 2,0 mmoles, 1 éq.) dans du THF (9 mL), est ajouté le TMSOK (1,3 g, 10,1 mmoles, 5 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 65 °C pendant 5 heures, concentré sous pression réduite, puis repris dans une solution saturée de NH₄Cl (10 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (10 mL). La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur Na₂SO₄, filtrée, puis concentrée sous pression réduite pour conduire au composé **69d** sous la forme d'un solide jaune pâle (818 mg, 2,0 mmoles, rdt : 100 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.73 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 3H), 7.18 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.98 – 6.93 (m, 2H), 6.85 – 6.81 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H).

MS (ESI⁺) : m/z 417.1 [M+Na]⁺.

3-((perfluorophénoxy)carbonyl)-1,2-phénylène diacétate **70b**



Formule brute : $C_{17}H_9F_5O_6$

MM : $404,25 \text{ g.mol}^{-1}$

À une solution du composé **69b** (728 mg, 3,1 mmoles, 1 éq.) dans du DCM (30 mL), sont ajoutés le pentafluorophénol (533 mg, 2,9 mmoles, 0,95 éq.) et le DIC (366 mg, 452 μL , 2,9 mmoles, 0,95 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 30 °C pendant 4 heures, puis concentré sous pression réduite et repris dans un mélange cyclohexane/ Et_2O (1/1) pour précipiter le DIU. La suspension obtenue est filtrée et le filtrat est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient AcOEt dans cyclohexane, 2 % à 30 %) pour conduire au composé **70b** sous la forme d'un solide jaune (927 mg, 2,3 mmoles, rdt : 79 %).

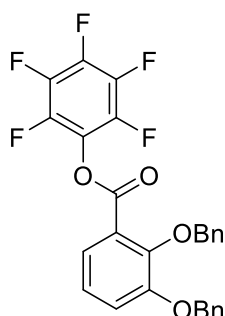
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) : δ 8.10 (dd, $J = 8.0, 1.6 \text{ Hz}$, 1H), 7.53 (dd, $J = 8.1, 1.6 \text{ Hz}$, 1H), 7.43 (t, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

RMN ^{19}F (471 MHz, CDCl_3) : δ -152.0 – -152.1 (m), -157.4 (t, $J = 21.7 \text{ Hz}$), -161.9 – -162.1 (m).

RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) : δ 168.2, 168.1, 159.7, 144.1, 143.8, 142.4, 140.9, 140.4, 139.1, 138.9, 137.1, 129.8, 129.6, 126.7, 124.9, 122.1, 20.7, 20.5.

MS-HR : calculée pour $C_{17}H_9F_5O_6$: 404.0319 ; trouvée : 404.0327.

2,3-bis(benzyloxy)benzoate de pentafluorophényle **70c**



Formule brute : $C_{27}H_{17}F_5O_4$

MM : 500,42 g.mol⁻¹

À une solution du composé **69c** (1, g, 3,4 mmoles, 1 éq.) dans du DCM (35 mL), sont ajoutés le pentafluorophénol (592 mg, 3,2 mmoles, 0,95 éq.) et le DIC (405 mg, 500 µL, 3,2 mmoles, 0,95 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 18 heures, puis concentré sous pression réduite et repris dans un mélange cyclohexane/Et₂O (2/1) pour précipiter le DIU. La suspension obtenue est filtrée et le filtrat est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient Et₂O dans cyclohexane, 2 % à 20 %) pour conduire au composé **70c** sous la forme d'un solide blanc (1,5 g, 3,1 mmoles, rdt : 96 %).

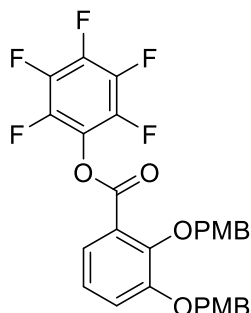
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.63 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.48 – 7.44 (m, 2H), 7.44 – 7.34 (m, 5H), 7.31 – 7.26 (m, 4H), 7.18 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.16 (s, 2H).

RMN ¹⁹F (471 MHz, CDCl₃) : δ -152.1 – -152.2 (m), -158.2 (t, *J* = 21.6 Hz), -162.4 – -162.6 (m).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 161.4, 153.3, 150.0, 137.1, 136.4, 128.8, 128.7, 128.4, 128.2, 127.7, 124.4, 123.9, 123.1, 120.0, 76.0, 71.6.

MS-HR : calculée pour $C_{27}H_{17}F_5O_4$: 500.1047 ; trouvée : 500.1046.

2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzoate de pentafluorophényle **70d**



Formule brute : $C_{29}H_{21}F_5O_6$

MM : 560,47 g.mol⁻¹

À une solution du composé **69d** (1,5 g, 3,8 mmoles, 1 éq.) dans du DCM (34 mL), sont ajoutés le pentafluorophénol (675 mg, 3,7 mmoles, 0,96 éq.) et le DIC (458 mg, 570 μ L, 3,6 mmoles, 0,95 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 29 °C pendant 19 heures, puis concentré sous pression réduite et repris dans un mélange cyclohexane/Et₂O (2/1) pour précipiter le DIU. La suspension obtenue est filtrée et le filtrat est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient Et₂O dans cyclohexane, 5 % à 50 %) pour conduire au composé **70d** sous la forme d'un solide blanc (1,9 g, 3,5 mmoles, rdt : 95 %).

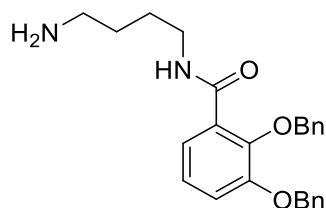
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.61 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.16 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.79 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.78 (s, 3H).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ -152.1 (d, J = 17.6 Hz), -158.2 (t, J = 21.8 Hz), -162.4 (dd, J = 21.6, 17.5 Hz).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 161.3, 159.7, 159.5, 153.2, 150.0, 130.4, 129.5, 129.2, 128.3, 124.1, 123.7, 122.9, 120.2, 114.1, 113.6, 75.5, 71.3, 55.3, 55.2.

MS-HR : calculée pour $C_{29}H_{21}F_5O_6$: 560.1258 ; trouvée : 560.1258.

N-(4-aminobutyl)-2,3-bis(benzyloxy)benzamide **71c**



Formule brute : $C_{25}H_{28}N_2O_3$

MM : 404,51 g.mol⁻¹

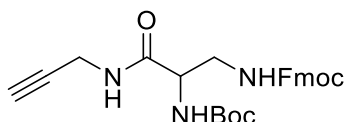
À une solution diluée de 1,4-diaminobutane (157 mg, 179 μ L, 1,8 mmole, 5 eq.) dans du DCM anhydre (18 mL), est ajouté goutte à goutte une solution du composé **70c** (200 mg, 0,4 mmole, 1 eq.) dans du DCM anhydre (9 mL). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 4 heures, dilué avec du MeOH (30 mL), adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient Et₂O + 0,1 % triéthylamine dans DCM + 0,1 % triéthylamine, 0 % à 30 %) pour conduire au composé **71c** sous la forme d'un solide blanc (159 mg, 0,4 mmole, rdt : 98 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.98 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 5.7, 3.9 Hz, 1H), 7.49 – 7.43 (m, 2H), 7.42 – 7.31 (m, 8H), 7.16 – 7.11 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 3.27 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.71 (sl, 2H), 2.65 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.45 – 1.32 (m, 4H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 165.3, 151.8, 146.9, 136.6, 136.5, 128.8, 128.8, 128.4, 127.8, 127.5, 124.5, 123.4, 117.1, 76.5, 71.4, 41.5, 39.5, 30.1, 26.7.

MS-HR : calculée pour $C_{25}H_{28}N_2O_3$: 404.2100 ; trouvée : 404.2110.

(9H-fluorèn-9-yl)méthyl tert-butyl (3-oxo-3-(prop-2-yn-1-ylamino) propane-1,2-diyl)dicarbamate **77**



Formule brute : C₂₆H₂₉N₃O₅

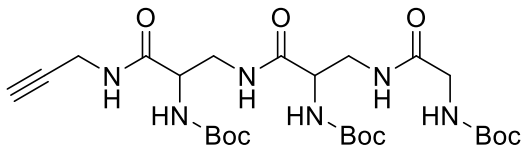
MM : 463,53 g.mol⁻¹

À une solution du composé **76** (1,0 g, 2,3 mmoles, 1 éq.) dans du DCM (40 mL), sont ajoutés la propargylamine **75** (168 mg, 195 µL, 3,0 mmoles, 1,3 éq.) goutte à goutte à 0 °C, puis le HOBT (386 mg, 2,9 mmoles, 1,2 éq.). Après 40 minutes à 0 °C, l'EDC.HCl (545 mg, 2,8 mmoles, 1,2 éq.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 17 heures, puis dilué avec du DCM (50 mL). La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique 10 % (100 mL), de l'eau (100 mL), une solution saturée de NaHCO₃ (100 mL) puis à la saumure. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée, adsorbée sur silice puis purifiée par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 5 %) pour conduire au composé **77** sous la forme d'un solide blanc (922 mg, 2,0 mmoles, rdt : 85 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.58 (ddd, *J* = 7.5, 4.3, 1.0 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.32 (tdd, *J* = 7.4, 2.5, 1.3 Hz, 2H), 6.92 (sl, 1H), 5.71 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.43 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.02 (q, *J* = 16.0 Hz, 2H), 3.59 (dl, *J* = 21.6 Hz, 2H), 2.18 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.46 (s, 9H).

MS (ESI⁺) : *m/z* 486.2 [M+Na]⁺.

tert-butyl (10-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2,2-dimethyl-4,7,11,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,12,16-tetraazanonadec-18-yn-14-yl)carbamate **79**



Formule brute : $C_{26}H_{44}N_6O_9$

MM : 584,67 g.mol⁻¹

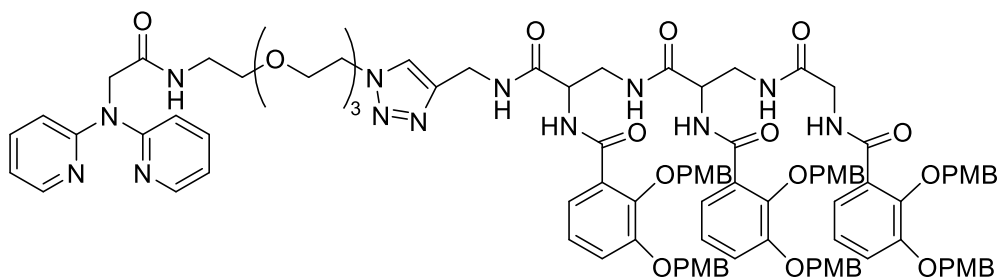
À une solution du composé **77** (846 mg, 1,8 mmole, 1 éq.) dans un mélange MeOH/CHCl₃ (40 mL/14 mL), est ajoutée la diéthylamine (4,0 g, 5,6 mL, 54,7 mmoles, 30 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 17 heures, puis concentré sous pression réduite. L'amine résultante est dissoute dans du THF anhydre (28 mL). Puis sont ajoutés HBTU (794 mg, 2,1 mmoles, 1,2 éq), la DIPEA (712 mg, 910 µL, 5,5 mmoles, 3 éq.) et la molécule **92** (660 mg, 1,8 mmoles, 1 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 21 heures, puis dilué avec du DCM (50 mL). La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique 10 % (50 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (2 x 50 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice puis purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 10 %) pour conduire au composé **79** sous la forme d'un solide blanc (909 mg, 1,6 mmole, rdt : 85 %).

RMN ^1H (500 MHz, MeOD) : δ 4.25 – 4.15 (m, 1H), 4.11 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 3.97 (dd, J = 7.9, 2.6 Hz, 2H), 3.72 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 3.69 – 3.61 (m, 1H), 3.51 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.39 – 3.35 (m, 1H), 2.59 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.45 – 1.39 (m, 18H).

RMN ¹³C (126 MHz, MeOD) : δ 173.7, 173.4, 172.6, 158.6, 157.6, 81.1, 81.0, 80.9, 72.5, 56.9, 55.6, 44.8, 42.3, 41.9, 29.7, 28.8, 28.7, 28.7.

MS (ESI⁺) : *m/z* 585.3 [M+H]⁺.

N-(7-(2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzamido)-1-(2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)phényl)-14-(1-(1-(di(pyridin-2-yl)amino)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatétradécan-14-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétraazatétradécan-11-yl)-2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzamide **82d**



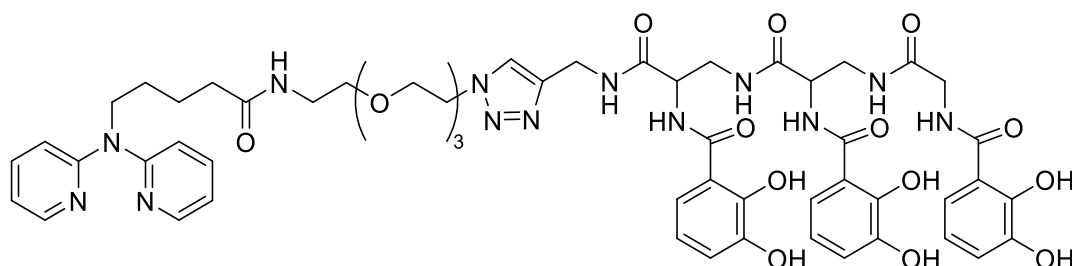
Formule brute : $C_{100}H_{107}N_{13}O_{22}$

MM : 1843,03 g.mol⁻¹

À une solution du composé **63d** (101 mg, 71 μmoles, 1 éq.) dans du THF (6 mL), sont ajoutés le composé **55** (29 mg, 68 μmoles, 0,95 éq.), l'ascorbate de sodium (58 mg, 68 μmoles, 4,1 éq.) et la solution aqueuse saturée de CuSO₄ (0,3 mL). Le milieu réactionnel est agité à 25 °C pendant 18 heures, puis est filtré sur célite, adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient MeOH dans DCM, 0 % à 10 %) pour conduire au composé **82d** sous la forme d'un solide blanc (40 mg, 22 μmoles, rdt : 32 %).

MS-HR : calculée pour $C_{100}H_{107}N_{13}O_{22}$: 1841.7654 ; trouvée : 1841.7672.

N-(14-(1-(17-(di(pyridin-2-yl)amino)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahepta-décyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-11-(2,3-dihydroxybenzamido)-1-(2,3-dihydroxyphényl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétraazatétradécan-7-yl)-2,3-dihydroxybenzamide **83**



Formule brute : $C_{55}H_{65}N_{13}O_{16}$

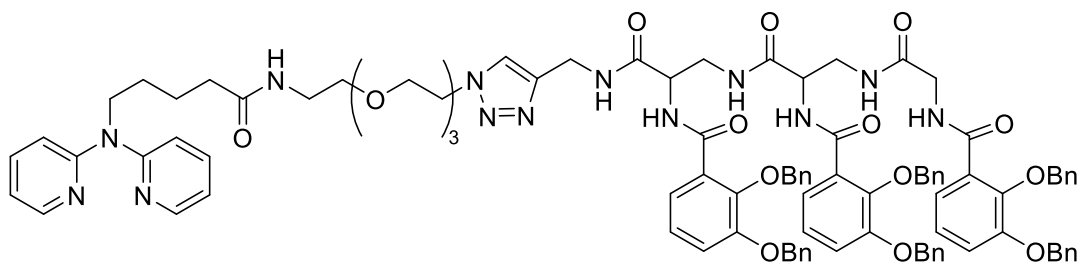
MM : 1164,20 g.mol⁻¹

À une solution du composé **83d** (90 mg, 0,05 mmole, 1 éq.) dans du DCM (4,5 mL), sont ajoutés le TIPS (1,0 g, 1,3 mL, 6,35 mmoles, 132 éq.) et le TFA (468 mg, 305 μ L, 4,11 mmoles, 86 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 18 heures, puis est concentré sous pression réduite. Le brut réactionnel est dilué dans un mélange DCM/MeOH, adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient MeOH avec 0,5 % H₂O dans DCM, 0 % à 30 %) pour conduire au composé **83** sous la forme d'une huile jaune pâle (50 mg, 0,04 mmole, rdt : 90 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) : δ 12.24 (sl, 1H), 12.01 (sl, 1H), 11.97 (sl, 1H), 9.23 (sl, 3H), 9.01 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.78 (dd, J = 17.6, 7.2 Hz, 2H), 8.62 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.39 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.28 (ddd, J = 5.0, 2.0, 0.8 Hz, 2H), 8.15 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.79 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.61 (ddd, J = 8.4, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.27 (td, J = 8.3, 1.5 Hz, 3H), 7.10 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.92 (m, 5H), 6.72 – 6.61 (m, 3H), 4.53 (dt, J = 18.5, 6.0 Hz, 2H), 4.46 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 4.32 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 4.08 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.87 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.76 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.65 – 3.52 (m, 3H), 3.51 – 3.39 (m, 11H), 3.13 (q, J = 5.8 Hz, 2H), 2.05 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.60 – 1.43 (m, 4H).

MS-HR : calculée pour $C_{55}H_{65}N_{13}O_{16}$: 1163.4672 ; trouvée : 1163.4679.

2,3-bis(benzyloxy)-N-(7-(2,3-bis(benzyloxy)benzamido)-1-(2,3-bis(benzyloxy)phényl)-14-(1-(17-(di(pyridin-2-yl)amino)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadécyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétraazatétradécan-11-yl)benzamide **83c**



Formule brute : C₉₇H₁₀₁N₁₃O₁₆

MM : 1704,95 g.mol⁻¹

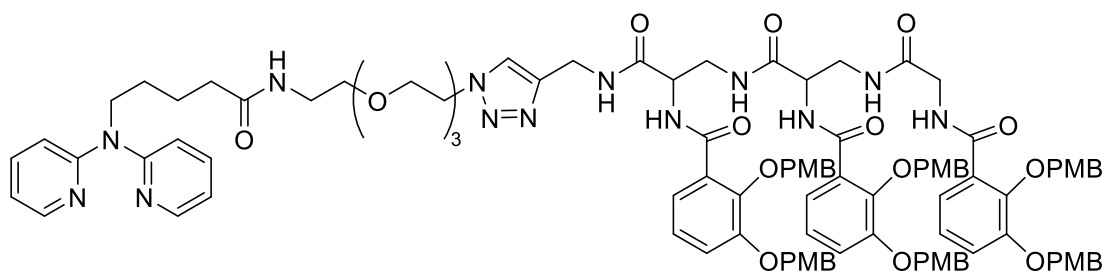
À une solution du composé **63c** (171 mg, 138 µmoles, 1 éq.) dans du THF (6 mL), sont ajoutés le composé **84** (64 mg, 136 µmoles, 1 éq.), la solution aqueuse saturée de CuSO₄ (1,2 mL) et l'ascorbate de sodium (110 mg, 553 µmoles, 4 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 25 °C pendant 18 heures, dilué avec du DCM (20 mL). La phase organique est lavée à l'eau (20 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (2 x 20 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice et purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient MeOH dans DCM, 0 % à 12 %) pour conduire au composé **83c** sous la forme d'un solide blanc cassé (168 mg, 99 µmoles, rdt : 73 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.66 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.44 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.33 – 8.24 (m, 2H), 7.83 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.51 – 7.28 (m, 27H), 7.25 – 7.17 (m, 9H), 7.09 – 7.03 (m, 3H), 7.02 – 6.93 (m, 4H), 6.91 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.81 (ddd, *J* = 7.2, 4.9, 0.9 Hz, 2H), 6.45 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.17 – 4.93 (m, 12H), 4.66 (dt, *J* = 7.3, 5.3 Hz, 1H), 4.51 (dd, *J* = 15.5, 6.0 Hz, 1H), 4.47 – 4.40 (m, 2H), 4.38 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.66 (qd, *J* = 16.0, 5.6 Hz, 2H), 3.56 – 3.42 (m, 13H), 3.37 (p, *J* = 6.0 Hz, 3H), 2.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.74 – 1.61 (m, 4H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 173.4, 170.8, 170.4, 170.3, 166.2, 165.9, 157.5, 151.9, 151.8, 151.8, 148.4, 147.0, 146.8, 146.7, 144.8, 137.3, 136.6, 136.5, 136.5, 136.5, 136.4, 136.3, 129.3, 129.3, 129.2, 128.8, 128.7, 128.7, 128.5, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 126.7, 124.4, 124.3, 124.2, 123.2, 123.1, 122.8, 122.8, 117.4, 117.2, 117.1, 117.1, 114.9, 76.5, 76.2, 76.1, 71.4, 71.3, 71.3, 70.6, 70.5, 70.5, 70.2, 70.0, 69.4, 54.6, 54.1, 50.2, 47.8, 43.9, 42.6, 40.8, 39.2, 36.3, 35.5, 27.7, 23.3.

MS-HR : calculée pour $C_{97}H_{101}N_{13}O_{16}$: 1703.7489 ; trouvée : 1703.7483.

N-(7-(2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzamido)-1-(2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)phényl)-14-(1-(17-(di(pyridin-2-yl)amino)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadécyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétraazatétradécan-11-yl)-2,3-bis((4-méthoxybenzyl)oxy)benzamide **83d**



Formule brute : C₁₀₃H₁₁₃N₁₃O₂₂

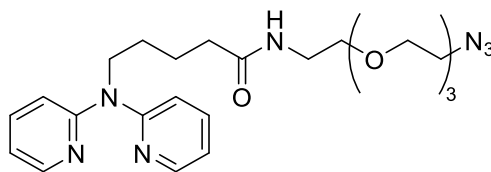
MM : 1885,11 g.mol⁻¹

À une solution du composé **63d** (203 mg, 143 µmoles, 1 éq.) dans du THF (12 mL), sont ajoutés le composé **84** (59 mg, 126 µmoles, 0,9 éq.), l'ascorbate de sodium (111 mg, 562 µmoles, 3,9 éq.) et la solution aqueuse saturée de CuSO₄ (0,6 mL). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 20 heures, puis est filtré sur célite, adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient MeOH dans DCM, 0 % à 15 %) pour conduire au composé **83d** sous la forme d'un solide blanc (109 mg, 58 µmoles, rdt : 46 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.76 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.56 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.31 (ddd, *J* = 5.0, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.87 – 7.76 (m, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.53 – 7.44 (m, 4H), 7.35 (dt, *J* = 24.4, 8.3 Hz, 8H), 7.28 – 7.22 (m, 3H), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.10 – 7.03 (m, 3H), 7.03 – 6.81 (m, 14H), 6.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.74 – 6.69 (m, 4H), 6.48 (sl, 1H), 5.10 – 4.88 (m, 12H), 4.68 (q, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.50 (ddd, *J* = 32.3, 14.6, 5.5 Hz, 4H), 4.40 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.80 – 3.76 (m, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.57 – 3.42 (m, 14H), 3.37 (q, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.20 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.71 – 1.64 (m, 4H).

MS (ESI⁺) : *m/z* 1884.8 [M+H]⁺.

N-(2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl)-5-(di(pyridin-2-yl)amino)pentanamide **84**



Formule brute : C₂₃H₃₃N₇O₄

MM : 471,56 g.mol⁻¹

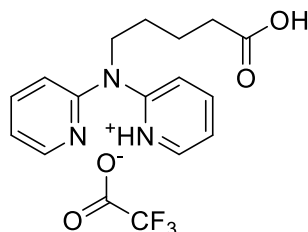
À une solution du composé **85** (501 mg, 1,3 mmole, 1 éq.) dans du DCM (40 mL), sont ajoutés le 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthan-1-amine **58** (285 mg, 259 µL, 1,2 mmole, 0,95 éq.) et la DIPEA (508 mg, 650 µL, 3,9 mmoles, 3 éq.). Après dissolution totale du solide, l'EDC.HCl (491 mg, 2,6 mmoles, 2 éq.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à 25 °C pendant 17 heures, est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 3 % à 10 %) pour conduire au composé **84** sous la forme d'une huile jaune pâle (424 mg, 0,9 mmole, rdt : 73 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.32 (ddd, J = 4.9, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.50 (ddd, J = 8.4, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.84 (ddd, J = 7.2, 4.9, 0.9 Hz, 2H), 6.25 (sl, 1H), 4.19 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.69 – 3.56 (m, 10H), 3.52 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.41 (q, J = 5.3 Hz, 2H), 3.36 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.77 – 1.65 (m, 4H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 173.2, 157.5, 148.5, 137.3, 117.1, 114.9, 70.8, 70.7, 70.7, 70.4, 70.2, 70.1, 50.8, 47.7, 39.3, 36.4, 27.7, 23.3.

MS-HR : calculée pour C₂₃H₃₃N₇O₄ : 471.2594 ; trouvée : 471.2591.

2-((4-carboxybutyl)(pyridin-2-yl)amino)pyridin-1-ium 2,2,2-trifluoroacétate **85**



Formule brute : $C_{17}H_{18}F_3N_3O_4$

MM : 385,34 g.mol⁻¹

À une solution du composé **95** (1,6 g, 5,0 mmoles, 1 éq.) dans du DCM (15 mL), sont ajoutés le TIPS (773 mg, 1,0 mL, 4,9 mmoles, 1 éq.) et le TFA (6,1 g, 4,0 mL, 53,9 mmoles, 11 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 24 °C pendant 17 heures, puis est concentré sous pression réduite. De l'éther froid (-20 °C) est ajouté au brut réactionnel. Après 2 heures à -20 °C, le précipité est récupéré par filtration sur papier filtre pour conduire au composé **85** sous la forme d'un solide blanc (1,9 g, 4,9 mmoles, rdt : 99 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) : δ 8.35 (ddd, $J = 5.3, 1.9, 0.8$ Hz, 2H), 7.89 (ddd, $J = 9.0, 7.3, 2.0$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.16 (ddd, $J = 7.3, 5.2, 0.9$ Hz, 2H), 4.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.69 – 1.49 (m, 4H).

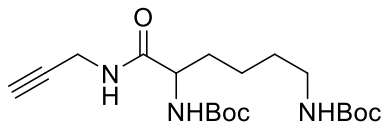
RMN ¹⁹F (376 MHz, DMSO-*d*6) : δ -74.9.

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*6) : δ 174.3, 154.6, 145.6, 140.3, 118.1, 115.5, 48.2, 33.3, 26.7, 21.7.

MS-HR : calculée pour $C_{15}H_{17}N_3O_2$: 271.1321 ; trouvée : 271.1329.

di-tert-butyl
dicarbamate **90**

(6-oxo-6-(prop-2-yn-1-ylamino)hexane-1,5-diyl)-



Formule brute : C₁₉H₃₃N₃O₅

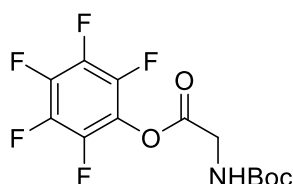
MM : 383,49 g.mol⁻¹

À une solution du composé **89** (1,0 g, 2,9 mmoles, 1 éq.) dans du DCM (50 mL), sont ajoutés la propargylamine **75** (316 mg, 367 µL, 5,7 mmoles, 2 éq.) goutte à goutte, puis l'EDC.HCl (609 mg, 3,2 mmoles, 1,1 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 3 jours, puis dilué avec du DCM (100 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (150 mL), une solution d'acide citrique 10 % (100 mL), de l'eau (100 mL), séchée sur Na₂SO₄, filtrée, adsorbée sur silice puis purifiée par chromatographie sur gel de silice (gradient AcOEt dans cyclohexane, 2 % à 50 %) pour conduire au composé **90** sous la forme d'un solide blanc (708 mg, 1,8 mmole, rdt : 64 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6.47 (sl, 1H), 5.11 (sl, 1H), 4.60 (sl, 1H), 4.10 – 3.98 (m, 2H), 3.11 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.22 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 1.91 – 1.80 (m, 1H), 1.70 – 1.57 (m, 2H), 1.54 – 1.47 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 1.42 – 1.32 (m, 2H).

MS-HR : calculée pour C₁₉H₃₃N₃O₅ : 383.2420 ; trouvée : 383.2427.

perfluorophényl (tert-butoxycarbonyl)glycinate **91**



Formule brute : $C_{13}H_{12}F_5NO_4$

MM : 341,23 g.mol⁻¹

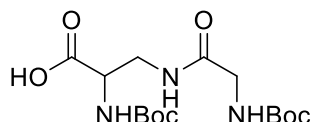
À une solution du composé **87** (2,5 g, 14,3 mmoles, 1 éq.) dans du DCM (52 mL), sont ajoutés le pentafluorophénol (2,4 g, 12,9 mmoles, 0,91 éq.) et le DCC (3,3 g, 15,9 mmoles, 1,1 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 18 heures, filtré sur célite et concentré sous pression réduite pour conduire au composé **91** sous la forme d'une huile jaune (4,4 g, 12,9 mmoles) utilisé tel quel dans la réaction suivante.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 5.05 (sl, 1H), 4.29 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 1.47 (s, 9H).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ -152.2 (d, J = 17.4 Hz), -157.3 (t, J = 21.7 Hz), -161.9 (dd, J = 22.0, 17.4 Hz).

MS (ESI⁺) : m/z 364.1 [M+Na]⁺.

Acide 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)acétamido)propanoïque **92**



Formule brute : C₁₅H₂₇N₃O₇

MM : 361,40 g.mol⁻¹

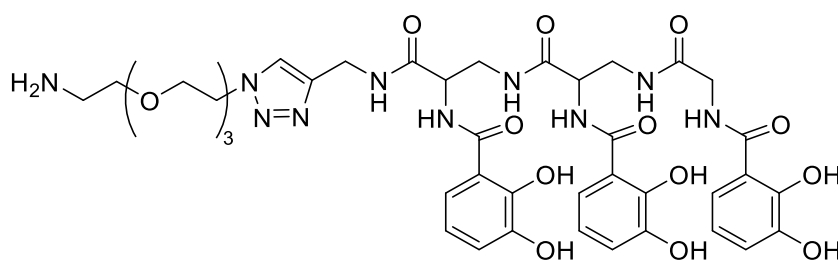
À une solution du composé **91** (4,7 g, 13,9 mmoles, 1,3 éq.) dans du THF (28 mL), sont ajoutés l'acide 3-amino-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoïque **88** (2,2 g, 10,7 mmoles, 1 éq.) et la DIPEA (4,1 g, 5,3 mL, 32,1 mmoles, 3 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 17 heures, puis lavé avec une solution d'acide citrique 10 % (30 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 30 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice puis purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 20 %) pour conduire au composé **92** sous la forme d'un solide blanc (2,8 g, 7,8 mmoles, rdt : 73 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.09 (sl, 1H), 5.95 (sl, 1H), 5.42 (sl, 1H), 4.33 (sl, 1H), 3.89 – 3.66 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.45 (s, 9H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 173.5, 172.0, 156.7, 156.2, 80.5, 54.1, 44.2, 41.5, 28.4.

MS-HR : calculée pour C₁₅H₂₇N₃O₇ : 361.1849 ; trouvée : 361.1852.

N-(14-(1-(2-(2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-11-(2,3-dihydroxybenzamido)-1-(2,3-dihydroxyphényl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétraazatétradécan-7-yl)-2,3-dihydroxybenzamide **94**



Formule brute : $C_{40}H_{50}N_{10}O_{15}$

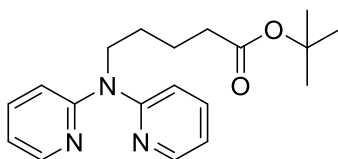
MM : 910,90 g.mol⁻¹

À une solution du composé **106** (100 mg, 63 µmoles, 1 éq.) dans du MeOH (20 mL), sont ajoutés le palladium sur charbon (17 mg, 16 µmoles, 0,25 éq.) et le catalyseur de Pearlman (17 mg, 24 µmoles, 0,37 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 25 °C pendant 20 heures sous hydrogène, filtré sur célite et concentré sous pression réduite pour conduire au composé **94** sous la forme d'une huile jaune (52 mg, 57 µmoles, rdt : 91 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8.59 (sl, 1H), 8.25 (sl, 1H), 8.19 (sl, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.26 – 7.10 (m, 4H), 6.87 – 6.67 (m, 4H), 6.50 (s, 1H), 6.45 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.38 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.32 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.61 – 4.38 (m, 5H), 4.34 – 4.27 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.77 (t, *J* = 5.0 Hz, 3H), 3.51 – 3.41 (m, 13H), 2.91 (sl, 2H).

MS-HR : calculée pour $C_{40}H_{50}N_{10}O_{15}$: 910.3457 ; trouvée : 910.3462.

tert-butyl 5-(di(pyridin-2-yl)amino)pentanoate **95**



Formule brute : $C_{19}H_{25}N_3O_2$

MM : 327,43 g.mol⁻¹

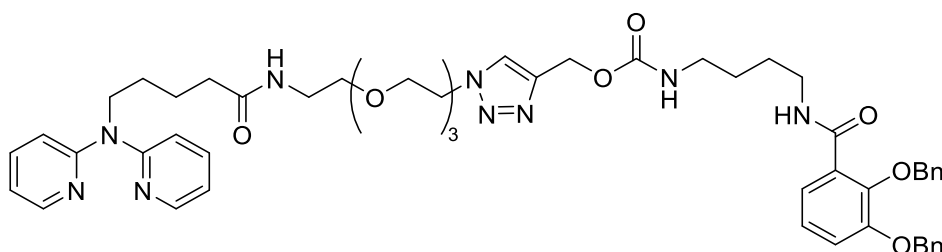
À une solution du composé **52** (1,0 g, 5,9 mmoles, 1 éq.) dans du DMSO (10 mL), est ajouté l'hydroxyde de potassium (1,7 g, 30,9 mmoles, 5,3 éq.). Le mélange est agité à 26 °C pendant 17 heures. Le ballon est mis dans un bain d'acétone à 13 °C puis le *tert*-butyl bromovalérate (2,9 g, 2,5 mL, 11,7 mmoles, 2 éq.) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est ramené lentement à 26 °C, est agité pendant 24 heures, puis est dilué à l'eau (100 mL). La phase aqueuse est extraite à l'AcOEt (4 x 100 mL). Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice puis purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient AcOEt dans cyclohexane, 5 % à 40 %) pour conduire au composé **95** sous la forme d'une huile jaune (1,7 g, 5,3 mmoles, rdt : 91 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.32 (ddd, J = 4.9, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.49 (ddd, J = 8.4, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.07 (dt, J = 8.4, 1.0 Hz, 2H), 6.83 (ddd, J = 7.2, 4.9, 0.9 Hz, 2H), 4.19 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.24 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.79 – 1.54 (m, 4H), 1.40 (s, 9H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 173.2, 157.6, 148.5, 137.2, 117.0, 114.8, 48.0, 35.5, 28.2, 27.9, 22.8.

MS-HR : calculée pour C₁₉H₂₅N₃O₂ : 327.1947 ; trouvée : 327.1953.

(1-(17-(di(pyridin-2-yl)amino)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadécyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl (4-(2,3-bis(benzyloxy)benzamido)butyl) carbamate **97c**



Formule brute : $C_{52}H_{63}N_9O_9$

MM : 958,13 g.mol⁻¹

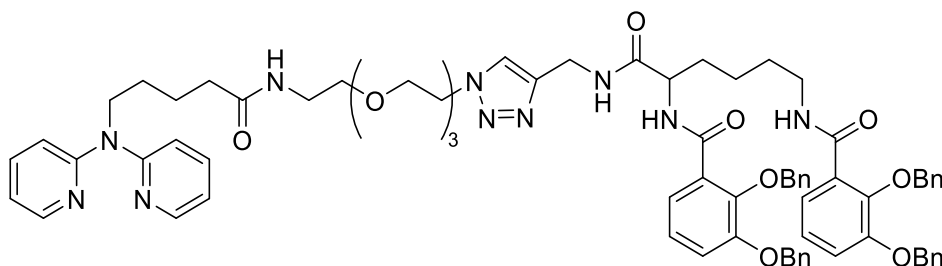
À une solution du composé **65c** (173 mg, 0,36 mmole, 1 éq.) dans du THF (15 mL), sont ajoutés le composé **84** (201 mg, 0,43 mmole, 1,2 éq.), la solution aqueuse saturée de $CuSO_4$ (1 mL) et l'ascorbate de sodium (285 mg, 1,44 mmole, 4 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 26 °C pendant 23 heures, dilué avec du DCM (40 mL). La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique 10 % (50 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (2 x 50 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées, adsorbées sur silice et purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 20 %) pour conduire au composé **97c** sous la forme d'une huile jaune-verte (248 mg, 0,26 mmoles, rdt : 73 %).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 8.30 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.93 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.70 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 7.53 – 7.42 (m, 4H), 7.42 – 7.27 (m, 8H), 7.13 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.82 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 6.41 (sl, 1H), 5.16 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 5.03 (sl, 1H), 4.49 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 4.17 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.83 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.56 (d, J = 8.9 Hz, 8H), 3.50 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.39 (q, J = 5.3 Hz, 2H), 3.24 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 3.06 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.21 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.75 – 1.63 (m, 4H), 1.41 – 1.26 (m, 4H).

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) : δ 173.3, 165.2, 157.5, 156.3, 151.8, 148.4, 146.9, 137.3, 136.6, 136.5, 128.8, 128.8, 128.8, 128.4, 127.8, 127.4, 124.5, 123.4, 117.1, 114.9, 76.5, 71.4, 70.7, 70.6, 70.5, 70.3, 70.1, 69.5, 58.0, 50.3, 47.7, 40.7, 39.2, 36.3, 27.7, 27.3, 26.7, 23.2.

MS-HR : calculée pour $C_{52}H_{63}N_9O_9$: 957.4749 ; trouvée : 957.4742.

N,N'-(6-(((1-(17-(di(pyridin-2-yl)amino)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadécyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)amino)-6-oxohexane-1,5-diyl)bis(2,3-bis(benzyloxy)benzamide) **98c**



Formule brute : $C_{74}H_{82}N_{10}O_{11}$

MM : 1287,53 g.mol⁻¹

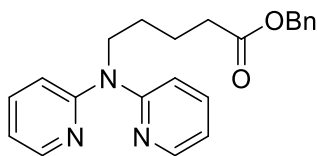
À une solution du composé **64c** (154 mg, 189 μ moles, 1 éq.) dans du THF (9 mL), sont ajoutés le composé **84** (110 mg, 234 μ moles, 1,2 éq.), la solution aqueuse saturée de $CuSO_4$ (1 mL) et l'ascorbate de sodium (160 mg, 805 μ moles, 4,3 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 25 °C pendant 2 jours, dilué avec du MeOH (10 mL), adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 20 %) pour conduire au composé **98c** sous la forme d'un solide blanc cassé (126 mg, 98 μ moles, rdt : 52 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.40 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 5.0, 2.3 Hz, 2H), 7.88 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.68 – 7.62 (m, 2H), 7.51 – 7.43 (m, 6H), 7.41 – 7.33 (m, 8H), 7.33 – 7.22 (m, 9H), 7.17 – 7.08 (m, 4H), 7.06 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.82 (dd, J = 7.2, 4.9 Hz, 2H), 6.62 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.17 – 5.10 (m, 6H), 5.05 (s, 2H), 4.49 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 4.42 (t, J = 5.1 Hz, 3H), 4.17 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.80 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.58 – 3.51 (m, 8H), 3.49 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.39 (q, J = 5.4 Hz, 2H), 3.13 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.21 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.76 – 1.63 (m, 5H), 1.39 – 1.29 (m, 1H), 1.21 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.14 (q, J = 7.5 Hz, 2H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 173.3, 171.7, 165.4, 165.0, 157.3, 151.7, 151.6, 148.2, 146.9, 146.7, 144.7, 137.1, 136.4, 136.3, 136.2, 136.1, 128.9, 128.7, 128.6, 128.6, 128.6, 128.6, 128.3, 128.2, 127.7, 127.6, 127.3, 126.6, 124.3, 124.3, 123.2, 123.1, 123.0, 117.3, 116.9, 116.9, 114.7, 76.3, 76.1, 71.3, 71.2, 70.5, 70.4, 70.3, 70.1, 69.8, 69.3, 53.7, 50.1, 47.6, 39.2, 39.1, 36.1, 35.1, 31.2, 28.9, 27.6, 23.1.

MS-HR : calculée pour $C_{74}H_{82}N_{10}O_{11}$: 1286.6165 ; trouvée : 1286.6186.

benzyl 5-(di(pyridin-2-yl)amino)pentanoate **105**



Formule brute : $C_{22}H_{23}N_3O_2$

MM : 361,45 g.mol⁻¹

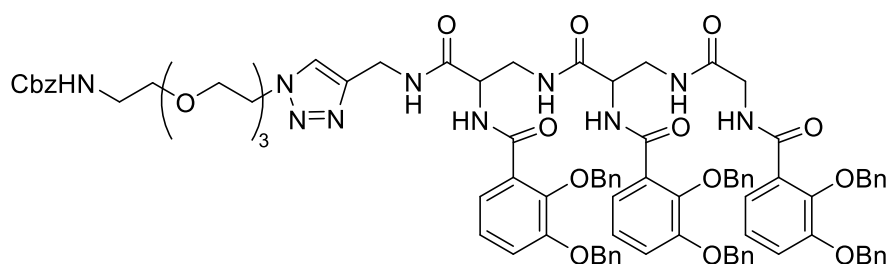
À une solution du composé **85** (143 mg, 372 μ moles, 1 éq.) dans de l'acétone (2 mL), sont ajoutés le K_2CO_3 anhydre (103 mg, 744 μ moles, 2 éq.) et le bromure de benzyle (127 mg, 89 μ L, 744 μ moles, 2 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 56 °C pendant 29 heures, concentré sous pression réduite, puis repris dans de l'eau (10 mL). La phase aqueuse est extraite à l'Et₂O (3 x 10 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice et purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 5 %) pour conduire au composé **105** sous la forme d'une huile jaune (116 mg, 321 μ moles, rdt : 86 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.32 (ddd, J = 5.0, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.49 (ddd, J = 8.3, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.37 – 7.28 (m, 5H), 7.06 (dt, J = 8.4, 0.9 Hz, 2H), 6.84 (ddd, J = 7.2, 5.0, 0.9 Hz, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.20 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.41 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.79 – 1.67 (m, 2H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 173.6, 157.5, 148.5, 137.3, 136.3, 128.7, 128.3, 117.0, 114.8, 66.2, 47.8, 34.2, 28.0, 22.5.

MS-HR : calculée pour $C_{22}H_{23}N_3O_2$: 361.1790 ; trouvée : 361.1798.

benzyl (2-(2-(2-(2-(4-(7,11-bis(2,3-bis(benzyloxy)benzamido)-1-(2,3-bis(benzyloxy)phényl)-1,4,8,12-tétraoxo-2,5,9,13-tétrazatétradécan-14-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl) carbamate **106**



Formule brute : $C_{90}H_{92}N_{10}O_{17}$

MM : 1585,78 g.mol⁻¹

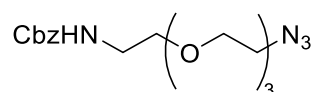
À une solution du composé **63c** (113 mg, 92 μ moles, 1 éq.) dans du THF (5 mL), sont ajoutés le composé **107** (33 mg, 95 μ moles, 1 éq.), la solution aqueuse saturée de $CuSO_4$ (0,3 mL) et l'ascorbate de sodium (75 mg, 380 μ moles, 4,1 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 27 °C pendant 2 jours, dilué avec du DCM (10 mL). La phase organique est lavée à l'eau (10 mL), avec une solution d'acide citrique 10 % (10 mL), séchée sur Na_2SO_4 , filtrée, adsorbée sur silice et purifiée par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 15 %) pour conduire au composé **106** sous la forme d'un solide blanc (125 mg, 79 μ moles, rdt : 86 %).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 8.70 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.46 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.81 (sl, 1H), 7.77 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.48 (dd, J = 6.4, 3.2 Hz, 1H), 7.47 – 7.41 (m, 4H), 7.41 – 7.28 (m, 26H), 7.25 – 7.18 (m, 9H), 7.07 (dd, J = 8.2, 1.6 Hz, 1H), 7.03 – 6.94 (m, 4H), 6.92 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.56 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.17 – 5.03 (m, 14H), 5.00 (d, J = 4.5 Hz, 2H), 4.67 (q, J = 6.0 Hz, 1H), 4.53 – 4.38 (m, 4H), 4.35 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.72 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.67 (dd, J = 9.0, 5.7 Hz, 2H), 3.57 – 3.41 (m, 9H), 3.38 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 3.34 (q, J = 5.3 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) : δ 170.8, 170.3, 170.2, 166.2, 165.9, 165.9, 156.6, 151.8, 147.1, 146.9, 146.8, 144.7, 136.8, 136.6, 136.5, 136.5, 136.4, 136.4, 129.3, 129.3, 129.2, 128.8, 128.7, 128.7, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 127.8, 127.8, 124.4, 124.3, 124.2, 123.2, 122.9, 122.9, 117.4, 117.3, 76.5, 76.2, 76.2, 71.4, 71.3, 71.3, 70.6, 70.5, 70.3, 70.0, 69.4, 66.7, 54.4, 54.0, 50.3, 43.9, 42.7, 40.9, 40.8, 35.4.

MS-HR : calculée pour $C_{90}H_{92}N_{10}O_{17}$: 1584.6642 ; trouvée : 1584.6636.

benzyl (2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl)carbamate **107**



Formule brute : $C_{16}H_{24}N_4O_5$

MM : 352,39 g.mol⁻¹

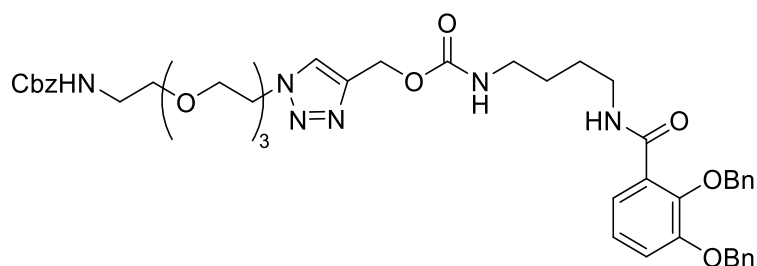
À une solution du 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthan-1-amine **58** (220 mg, 200 µL, 0,96 mmole, 1,05 éq.) dans du DCM (9 mL), sont ajoutés la DIPEA (236 mg, 318 µL, 1,83 mmole, 2 éq.) et le chloroformate de benzyle (160 mg, 134 µL, 0,91 mmoles, 1 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 25 °C pendant 24 heures, puis dilué avec du DCM (10 mL). La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique 10 % (20 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM (1 x 20 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées, adsorbées sur silice puis purifiées par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 3 %) pour conduire au composé **107** sous la forme d'une huile jaune pâle (287 mg, 0,81 mmole, rdt : 89 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.38 – 7.28 (m, 5H), 5.34 (sl, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.63 (ddt, *J* = 9.6, 5.2, 2.9 Hz, 10H), 3.56 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.39 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.33 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H).
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 156.58, 136.75, 128.61, 128.25, 128.19, 70.79, 70.

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 156.6, 136.7, 128.6, 128.2, 128.2, 70.8, 70.7, 70.7, 70.4, 70.1, 66.8, 50.8, 41.0.

MS-HR : calculée pour C₁₆H₂₄N₄O₅ : 352.1747 ; trouvée : 352.1752.

(1-(3-oxo-1-phényl-2,7,10,13-tétraoxa-4-azapentadécan-15-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl (4-(2,3-bis(benzyloxy)benzamido)butyl)carbamate **108**



Formule brute : $C_{45}H_{54}N_6O_{10}$

MM : 838,96 g.mol⁻¹

À une solution du composé **65c** (138 mg, 0,28 mmole, 1 éq.) dans du THF (14 mL), sont ajoutés le composé **107** (99 mg, 0,28 mmole, 1 éq.), la solution aqueuse saturée de $CuSO_4$ (0,3 mL) et l'ascorbate de sodium (224 mg, 1,13 mmole, 4 éq.). Le milieu réactionnel est agité à 28 °C pendant 6 heures, dilué avec du DCM (30 mL). La phase organique est lavée à l'eau (30 mL), avec une solution d'acide citrique 10 % (30 mL), séchée sur Na_2SO_4 , filtrée, adsorbée sur silice et purifiée par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 12 %) pour conduire au composé **108** sous la forme d'une huile incolore (214 mg, 0,26 mmole, rdt : 90 %).

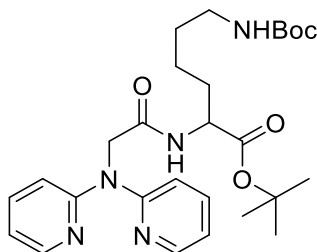
RMN ¹H (500 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.95 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.73 – 7.67 (m, 1H), 7.46 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.43 – 7.26 (m, 13H), 7.13 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 5.51 (sl, 1H), 5.16 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 5.06 (d, J = 4.2 Hz, 4H), 5.01 – 4.93 (m, 1H), 4.43 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.78 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.60 – 3.51 (m, 10H), 3.36 (q, J = 5.4 Hz, 2H), 3.24 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.06 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.40 – 1.26 (m, 4H).

RMN ¹³C (126 MHz, $CDCl_3$) : δ 165.2, 156.6, 156.3, 151.8, 146.9, 143.4, 136.7, 136.5, 136.5, 128.8, 128.8, 128.8, 128.6, 128.4, 128.2, 128.2, 127.8, 127.3, 124.8, 124.5, 123.4, 117.1, 76.5, 71.4, 70.6, 70.6, 70.3, 70.1, 69.4, 66.7, 58.0, 50.2, 40.9, 40.7, 39.2, 27.3, 26.7.

MS-HR : calculée pour $C_{45}H_{54}N_6O_{10}$: 838.3901 ; trouvée : 838.3904.

tert-butyl
lysinate **112**

*N*⁶-(tert-butoxycarbonyl)-*N*²-(di(pyridin-2-yl)glycyl)



Formule brute : C₂₇H₃₉N₅O₅

MM : 513,64 g.mol⁻¹

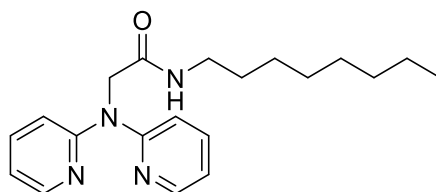
À une solution du composé **51** (100 mg, 0,35 mmole, 0,8 éq.) dans du DCM (20 mL), sont ajoutés le chlorhydrate d'ester de *tert*-butyle de lysine *N*ε-Boc-L commercial **111** (155 mg, 0,44 mmole, 1 éq.) et la DIPEA (109 mg, 140 μL, 0,85 mmole, 2 éq.). Après dissolution totale du solide, l'EDC.HCl (167 mg, 0,87 mmole, 2 éq.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à 24 °C pendant 17 heures, est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 8 %) pour conduire au composé **112** sous la forme d'une huile jaune pâle (158 mg, 0,31 mmole, rdt : 89 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.36 (ddd, *J* = 4.9, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 8.4, 7.3, 2.0 Hz, 2H), 7.18 (dt, *J* = 8.5, 0.9 Hz, 2H), 6.94 (ddd, *J* = 7.3, 4.9, 0.9 Hz, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.54 – 4.44 (m, 2H), 3.04 – 2.87 (m, 2H), 1.79 – 1.68 (m, 1H), 1.61 – 1.46 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.38 (s, 9H), 1.36 – 1.29 (m, 2H), 1.15 – 1.00 (m, 2H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 171.2, 170.5, 156.6, 156.0, 148.5, 137.8, 118.1, 114.7, 81.7, 53.0, 52.5, 40.4, 32.3, 29.5, 28.5, 28.0, 22.1.

MS-HR : calculée pour C₂₇H₃₉N₅O₅ : 513.2951 ; trouvée : 513.2948.

2-(di(pyridin-2-yl)amino)-N-octylacétamide **114**



Formule brute : $C_{20}H_{28}N_4O$

MM : 340,47 g.mol⁻¹

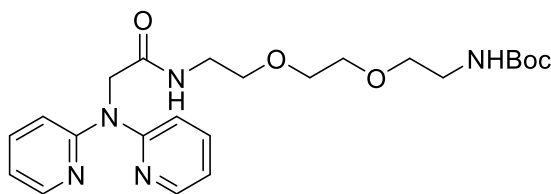
À une solution du composé **51** (100 mg, 0,35 mmole, 0,93 éq.) dans du DCM (15 mL), sont ajoutés l'octylamine commerciale **113** (48 mg, 62 μ L, 0,37 mmole, 1 éq.) et la DIPEA (96 mg, 123 μ L, 0,75 mmole, 2 éq.). Après dissolution totale du solide, l'EDC.HCl (143 mg, 0,75 mmole, 2 éq.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à 23 °C pendant 23 heures, est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 10 %) pour conduire au composé **114** sous la forme d'un solide blanc (92 mg, 0,27 mmole, rdt : 78 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.32 (ddd, J = 5.0, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.59 (ddd, J = 8.4, 7.3, 2.0 Hz, 2H), 7.18 (sl, 1H), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.93 (ddd, J = 7.3, 5.0, 0.9 Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 3.20 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.36 (p, J = 7.0 Hz, 2H), 1.30 – 1.06 (m, 10H), 0.85 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) : δ 170.7, 156.7, 148.5, 137.9, 118.2, 114.8, 53.3, 39.3, 31.9, 29.5, 29.3, 26.8, 22.7, 14.2.

MS-HR : calculée pour $C_{20}H_{28}N_4O$: 340.2263 ; trouvée : 340.2262.

tert-butyl (2-(2-(2-(2-(di(pyridin-2-yl)amino)acétamido)éthoxy)éthoxy)éthyl)carbamate **116**



Formule brute : C₂₃H₃₃N₅O₅

MM : 459,55 g.mol⁻¹

À une solution du composé **51** (200 mg, 0,69 mmole, 0,93 éq.) dans du DCM (60 mL), sont ajoutés le *tert*-butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate **115** (184 mg, 0,74 mmole, 1 éq.) et la DIPEA (192 mg, 245 µL, 1,5 mmole, 2 éq.). Après dissolution totale du solide, l'EDC.HCl (284 mg, 1,5 mmole, 2 éq.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à 25 °C pendant 4 heures, est adsorbé sur silice puis purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient EtOH dans DCM, 0 % à 6 %) pour conduire au composé **116** sous la forme d'une huile jaune pâle (183 mg, 0,40 mmole, rdt : 58 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) : δ 8.33 (ddd, *J* = 5.0, 2.0, 0.9 Hz, 2H), 7.58 (ddd, *J* = 8.3, 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.47 (sl, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.93 (ddd, *J* = 7.2, 5.0, 0.9 Hz, 2H), 5.05 (sl, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.48 – 3.40 (m, 10H), 3.24 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : δ 171.0, 156.7, 156.1, 148.4, 137.8, 118.1, 114.7, 79.3, 70.4, 70.3, 70.3, 70.1, 53.0, 40.4, 39.3, 28.5.

MS-HR : calculée pour C₂₃H₃₃N₅O₅ : 459.2482 ; trouvée : 459.2494.

Bibliographie

- (1) Piddock, L. J. V. Reflecting on the Final Report of the O'Neill Review on Antimicrobial Resistance. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16* (7), 767–768. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30127-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30127-X).
- (2) Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; Johnson, S. C.; Browne, A. J.; Chipeta, M. G.; Fell, F.; Hackett, S.; Haines-Woodhouse, G.; Kashef Hamadani, B. H.; Kumaran, E. A. P.; McManigal, B.; Agarwal, R.; Akech, S.; Albertson, S.; Amuasi, J.; Andrews, J.; Aravkin, A.; Ashley, E.; Bailey, F.; Baker, S.; Basnyat, B.; Bekker, A.; Bender, R.; Bethou, A.; Bielicki, J.; Boonkasidecha, S.; Bukosia, J.; Carneiro, C.; Castañeda-Orjuela, C.; Chansamouth, V.; Chaurasia, S.; Chiurchiù, S.; Chowdhury, F.; Cook, A. J.; Cooper, B.; Cressey, T. R.; Criollo-Mora, E.; Cunningham, M.; Darboe, S.; Day, N. P. J.; De Luca, M.; Dokova, K.; Dramowski, A.; Dunachie, S. J.; Eckmanns, T.; Eibach, D.; Emami, A.; Feasey, N.; Fisher-Pearson, N.; Forrest, K.; Garrett, D.; Gastmeier, P.; Giref, A. Z.; Greer, R. C.; Gupta, V.; Haller, S.; Haselbeck, A.; Hay, S. I.; Holm, M.; Hopkins, S.; Iregbu, K. C.; Jacobs, J.; Jarovsky, D.; Javanmardi, F.; Khorana, M.; Kissoon, N.; Kobeissi, E.; Kostyanov, T.; Krapp, F.; Krumkamp, R.; Kumar, A.; Kyu, H. H.; Lim, C.; Limmathurotsakul, D.; Loftus, M. J.; Lunn, M.; Ma, J.; Mturi, N.; Munera-Huertas, T.; Musicha, P.; Mussi-Pinhata, M. M.; Nakamura, T.; Nanavati, R.; Nangia, S.; Newton, P.; Ngoun, C.; Novotney, A.; Nwakanma, D.; Obiero, C. W.; Olivas-Martinez, A.; Olliaro, P.; Ooko, E.; Ortiz-Brizuela, E.; Peleg, A. Y.; Perrone, C.; Plakkal, N.; Ponce-de-Leon, A.; Raad, M.; Ramdin, T.; Riddell, A.; Roberts, T.; Robotham, J. V.; Roca, A.; Rudd, K. E.; Russell, N.; Schnall, J.; Scott, J. A. G.; Shivamallappa, M.; Sifuentes-Osorio, J.; Steenkeste, N.; Stewardson, A. J.; Stoeva, T.; Tasak, N.; Thairapong, A.; Thwaites, G.; Turner, C.; Turner, P.; van Doorn, H. R.; Velaphi, S.; Vongpradith, A.; Vu, H.; Walsh, T.; Waner, S.; Wangrangsimakul, T.; Wozniak, T.; Zheng, P.; Sartorius, B.; Lopez, A. D.; Stergachis, A.; Moore, C.; Dolecek, C.; Naghavi, M. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* **2022**, S0140673621027240. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- (3) O'Neill, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014.
- (4) Pendleton, J. N.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F. Clinical Relevance of the ESKAPE Pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *11* (3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>.
- (5) Santajit, S.; Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>.
- (6) Rice, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* **2008**, *197* (8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>.
- (7) De Oliveira, D. M. P.; Forde, B. M.; Kidd, T. J.; Harris, P. N. A.; Schembri, M. A.; Beatson, S. A.; Paterson, D. L.; Walker, M. J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **2020**, *33* (3), e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.
- (8) Butler, M. S.; Paterson, D. L. Antibiotics in the Clinical Pipeline in October 2019. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2020**, *73* (6), 329–364. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0291-8>.

- (9) Frei, A.; Zuegg, J.; Elliott, A. G.; Baker, M.; Braese, S.; Brown, C.; Chen, F.; G. Dowson, C.; Dujardin, G.; Jung, N.; King, A. P.; Mansour, A. M.; Massi, M.; Moat, J.; Mohamed, H. A.; Renfrew, A. K.; Rutledge, P. J.; Sadler, P. J.; Todd, M. H.; Willans, C. E.; Wilson, J. J.; Cooper, M. A.; Blaskovich, M. A. T. Metal Complexes as a Promising Source for New Antibiotics. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (10), 2627–2639. <https://doi.org/10.1039/C9SC06460E>.
- (10) Shiferaw, T.; Beyene, G.; Kassa, T.; Sewunet, T. Bacterial Contamination, Bacterial Profile and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Isolates from Stethoscopes at Jimma University Specialized Hospital. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2013**, *12*, 39. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-39>.
- (11) Wilhelm, M. J.; Sheffield, J. B.; Sharifian Gh., M.; Wu, Y.; Spahr, C.; Gonella, G.; Xu, B.; Dai, H.-L. Gram's Stain Does Not Cross the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (7), 1711–1717. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00042>.
- (12) Brown, L.; Wolf, J. M.; Prados-Rosales, R.; Casadevall, A. Through the Wall: Extracellular Vesicles in Gram-Positive Bacteria, Mycobacteria and Fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13* (10), 620–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>.
- (13) Hans Wedepohl, K. The Composition of the Continental Crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1995**, *59* (7), 1217–1232. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00038-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00038-2).
- (14) Sánchez, M.; Sabio, L.; Gálvez, N.; Capdevila, M.; Dominguez-Vera, J. M. Iron Chemistry at the Service of Life. *IUBMB Life* **2017**, *69* (6), 382–388. <https://doi.org/10.1002/iub.1602>.
- (15) Archibald, F. *Lactobacillus Plantarum*, an Organism Not Requiring Iron. *FEMS Microbiol. Lett.* **1983**, *19* (1), 29–32. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00504.x>.
- (16) Troxell, B.; Xu, H.; Yang, X. F. *Borrelia Burgdorferi*, a Pathogen That Lacks Iron, Encodes Manganese-Dependent Superoxide Dismutase Essential for Resistance to Streptonigrin. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (23), 19284–19293. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.344903>.
- (17) Ratledge, C.; Dover, L. G. Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54* (1), 881–941. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.881>.
- (18) Chipperfield, J. R.; Ratledge, C. Salicylic Acid Is Not a Bacterial Siderophore: A Theoretical Study. *BioMetals* **2000**, *13* (2), 165–168. <https://doi.org/10.1023/a:1009227206890>.
- (19) Garibaldi, J. A.; Neilands, J. B. Formation of Iron-Binding Compounds by Micro-Organisms. *Nature* **1956**, *177* (4507), 526–527. <https://doi.org/10.1038/177526a0>.
- (20) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>.
- (21) Brandel, J.; Humbert, N.; Elhabiri, M.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A.; Albrecht-Gary, A.-M. Pyochelin, a Siderophore of *Pseudomonas Aeruginosa*: Physicochemical Characterization of the Iron(III), Copper(II) and Zinc(II) Complexes. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (9), 2820. <https://doi.org/10.1039/c1dt11804h>.
- (22) Klumpp, C.; Burger, A.; Mislin, G. L.; Abdallah, M. A. From a Total Synthesis of Cepabactin and Its 3:1 Ferric Complex to the Isolation of a 1:1:1 Mixed Complex between

- Iron (III), Cepabactin and Pyochelin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (6), 1721–1724. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.01.034>.
- (23) Boukhalfa, H.; Brickman, T. J.; Armstrong, S. K.; Crumbliss, A. L. Kinetics and Mechanism of Iron(III) Dissociation from the Dihydroxamate Siderophores Alcaligin and Rhodotorulic Acid. *Inorg. Chem.* **2000**, *39* (25), 5591–5602. <https://doi.org/10.1021/ic000330k>.
- (24) Schalk, I. J.; Guillon, L. Pyoverdine Biosynthesis and Secretion in *Pseudomonas Aeruginosa*: Implications for Metal Homeostasis. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15* (6), 1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>.
- (25) Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A.; Brillet, K. Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore–Iron Outer Membrane Transporters. *Curr. Top. Membr.* **2012**, *69*, 37–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>.
- (26) Celia, H.; Noinaj, N.; Buchanan, S. K. Structure and Stoichiometry of the Ton Molecular Motor. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (2), 375. <https://doi.org/10.3390/ijms21020375>.
- (27) Krewulak, K. D.; Vogel, H. J. Structural Biology of Bacterial Iron Uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778* (9), 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>.
- (28) Schalk, I. J.; Guillon, L. Fate of Ferrisiderophores after Import across Bacterial Outer Membranes: Different Iron Release Strategies Are Observed in the Cytoplasm or Periplasm Depending on the Siderophore Pathways. *Amino Acids* **2013**, *44* (5), 1267–1277. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1468-2>.
- (29) Perraud, Q. Étude Des Bases Moléculaires Pour La Vectorisation d’antibiotiques Permettant de Contourner La Faible Perméabilité Des Membranes de *Pseudomonas Aeruginosa*. Thèse, Strasbourg, **2020**. <https://www.theses.fr/en/s164905>.
- (30) Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Bacterial Iron Uptake Pathways: Gates for the Import of Bactericide Compounds. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (11), 4573–4576. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00554>.
- (31) Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. Siderophore-Dependent Iron Uptake Systems as Gates for Antibiotic Trojan Horse Strategies against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Metallomics* **2014**, *6* (3), 408–420. <https://doi.org/10.1039/C3MT00359K>.
- (32) Braun, V.; Pramanik, A.; Gwinner, T.; Köberle, M.; Bohn, E. Sideromycins: Tools and Antibiotics. *BioMetals* **2009**, *22* (1), 3–13. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9199-7>.
- (33) Nikaido, H.; Vaara, M. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. *Microbiol. Rev.* **1985**, *49* (1), 1–32. <https://doi.org/10.1128/mr.49.1.1-32.1985>.
- (34) Benz, G.; Schröder, T.; Kurz, J.; Wünsche, C.; Karl, W.; Steffens, G.; Pfitzner, J.; Schmidt, D. Constitution of the Deferriform of the Albomycins $\delta 1$, $\delta 2$ and ϵ . *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21* (7), 527–528. <https://doi.org/10.1002/anie.198205271>.
- (35) Thomas, X.; Destoumieux-Garzón, D.; Peduzzi, J.; Afonso, C.; Blond, A.; Birlirakis, N.; Goulard, C.; Dubost, L.; Thai, R.; Tabet, J.-C.; Rebuffat, S. Siderophore Peptide, a New Type of Post-Translationally Modified Antibacterial Peptide with Potent Activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (27), 28233–28242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400228200>.

- (36) Destoumieux-Garzón, D.; Peduzzi, J.; Thomas, X.; Djediat, C.; Rebuffat, S. Parasitism of Iron-Siderophore Receptors of *Escherichia Coli* by the Siderophore-Peptide Microcin E492m and Its Unmodified Counterpart. *BioMetals* **2006**, *19* (2), 181–191. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-4452-9>.
- (37) Ferguson, A. D.; Braun, V.; Fiedler, H. P.; Coulton, J. W.; Diederichs, K.; Welte, W. Crystal Structure of the Antibiotic Albomycin in Complex with the Outer Membrane Transporter FhuA. *Protein Sci.* **2000**, *9* (5), 956–963. <https://doi.org/10.1110/ps.9.5.956>.
- (38) Braun, V.; Günthner, K.; Hantke, K.; Zimmermann, L. Intracellular Activation of Albomycin in *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1983**, *156* (1), 308–315. <https://doi.org/10.1128/jb.156.1.308-315.1983>.
- (39) Stefanska, A. L.; Fulston, M.; Houge-Frydrych, C. S.; Jones, J. J.; Warr, S. R. A Potent Seryl tRNA Synthetase Inhibitor SB-217452 Isolated from a *Streptomyces* Species. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2000**, *53* (12), 1346–1353. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.1346>.
- (40) Pramanik, A.; Braun, V. Albomycin Uptake via a Ferric Hydroxamate Transport System of *Streptococcus Pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (11), 3878–3886. <https://doi.org/10.1128/JB.00205-06>.
- (41) de Lorenzo, V. Isolation and Characterization of Microcin E 492 from *Klebsiella Pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **1984**, *139* (1), 72–75. <https://doi.org/10.1007/BF00692715>.
- (42) Strahsburger, E.; Baeza, M.; Monasterio, O.; Lagos, R. Cooperative Uptake of Microcin E492 by Receptors FepA, Fiu, and Cir and Inhibition by the Siderophore Enterochelin and Its Dimeric and Trimeric Hydrolysis Products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (7), 3083–3086. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.3083-3086.2005>.
- (43) Biéler, S.; Silva, F.; Belin, D. The Polypeptide Core of Microcin E492 Stably Associates with the Mannose Permease and Interferes with Mannose Metabolism. *Res. Microbiol.* **2010**, *161* (8), 706–710. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.07.003>.
- (44) Destoumieux-Garzón, D.; Thomas, X.; Santamaria, M.; Goulard, C.; Barthélémy, M.; Boscher, B.; Bessin, Y.; Molle, G.; Pons, A.-M.; Letellier, L.; Peduzzi, J.; Rebuffat, S. Microcin E492 Antibacterial Activity: Evidence for a TonB-Dependent Inner Membrane Permeabilization on *Escherichia Coli*. *Mol. Microbiol.* **2003**, *49* (4), 1031–1041. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03610.x>.
- (45) de Lorenzo, V.; Pugsley, A. P. Microcin E492, a Low-Molecular-Weight Peptide Antibiotic Which Causes Depolarization of the *Escherichia Coli* Cytoplasmic Membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27* (4), 666–669. <https://doi.org/10.1128/AAC.27.4.666>.
- (46) Budzikiewicz, H. Siderophore-Antibiotic Conjugates Used as Trojan Horses against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1* (1), 73–82. <https://doi.org/10.2174/1568026013395524>.
- (47) Page, M. G. P. Siderophore Conjugates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 115–126. <https://doi.org/10.1111/nyas.12024>.

- (48) Dassonville-Klimpt, A.; Sonnet, P. Advances in 'Trojan Horse' Strategies in Antibiotic Delivery Systems. *Future Med. Chem.* **2020**, *12* (11), 983–986. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0065>.
- (49) Górská, A.; Sloderbach, A.; Marszałł, M. P. Siderophore–Drug Complexes: Potential Medicinal Applications of the 'Trojan Horse' Strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35* (9), 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.06.007>.
- (50) Zheng, T.; Nolan, E. M. Enterobactin-Mediated Delivery of β -Lactam Antibiotics Enhances Antibacterial Activity against Pathogenic *Escherichia Coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (27), 9677–9691. <https://doi.org/10.1021/ja503911p>.
- (51) Ito, A.; Sato, T.; Ota, M.; Takemura, M.; Nishikawa, T.; Toba, S.; Kohira, N.; Miyagawa, S.; Ishibashi, N.; Matsumoto, S.; Nakamura, R.; Tsuji, M.; Yamano, Y. In Vitro Antibacterial Properties of Cefiderocol, a Novel Siderophore Cephalosporin, against Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (1), e01454-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01454-17>.
- (52) Sadek, M.; Le Guern, R.; Kipnis, E.; Gosset, P.; Poirel, L.; Dessein, R.; Nordmann, P. Progressive in Vivo Development of Resistance to Cefiderocol in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04526-0>.
- (53) Peukert, C.; Gasser, V.; Orth, T.; Fritsch, S.; Normant, V.; Cunrath, O.; Schalk, I. J.; Brönstrup, M. Trojan Horse Siderophore Conjugates Induce *Pseudomonas Aeruginosa* Suicide and Qualify the TonB Protein as a Novel Antibiotic Target. *J. Med. Chem.* **2022**, *sous presse*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01489>.
- (54) Neumann, W.; Sassone-Corsi, M.; Raffatellu, M.; Nolan, E. M. Esterase-Catalyzed Siderophore Hydrolysis Activates an Enterobactin-Ciprofloxacin Conjugate and Confers Targeted Antibacterial Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (15), 5193–5201. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b01042>.
- (55) Higgins, P. G.; Fluit, A. C.; Schmitz, F. J. Fluoroquinolones: Structure and Target Sites. *Curr. Drug Targets* **2003**, *4* (2), 181–190. <https://doi.org/10.2174/1389450033346920>.
- (56) Loupias, P.; Laumailé, P.; Morandat, S.; Mondange, L.; Guillier, S.; El Kirat, K.; Da Nascimento, S.; Biot, F.; Taudon, N.; Dassonville-Klimpt, A.; Sonnet, P. Synthesis and Study of New Siderophore Analog-Ciprofloxacin Conjugates with Antibiotic Activities against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Burkholderia* Spp. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *245*, 114921. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114921>.
- (57) Foti, C.; Piperno, A.; Scala, A.; Giuffrè, O. Oxazolidinone Antibiotics: Chemical, Biological and Analytical Aspects. *Molecules* **2021**, *26* (14), 4280. <https://doi.org/10.3390/molecules26144280>.
- (58) Paulen, A.; Gasser, V.; Hoegy, F.; Perraud, Q.; Pesset, B.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Synthesis and Antibiotic Activity of Oxazolidinone–Catechol Conjugates against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (47), 11567–11579. <https://doi.org/10.1039/C5OB01859E>.
- (59) Moynié, L.; Hoegy, F.; Milenkovic, S.; Munier, M.; Paulen, A.; Gasser, V.; Faucon, A. L.; Zill, N.; Naismith, J. H.; Ceccarelli, M.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Hijacking of the Enterobactin Pathway by a Synthetic Catechol Vector Designed for Oxazolidinone

- Antibiotic Delivery in *Pseudomonas Aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8* (9), 1894–1904. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00202>.
- (60) Liu, R.; Miller, P. A.; Vakulenko, S. B.; Stewart, N. K.; Boggess, W. C.; Miller, M. J. A Synthetic Dual Drug Sideromycin Induces Gram-Negative Bacteria To Commit Suicide with a Gram-Positive Antibiotic. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (9), 3845–3854. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00218>.
- (61) Patra, M.; Gasser, G.; Metzler-Nolte, N. Small Organometallic Compounds as Antibacterial Agents. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (21), 6350–6358. <https://doi.org/10.1039/C2DT12460B>.
- (62) Ude, Z.; Romero-Canelón, I.; Twamley, B.; Fitzgerald Hughes, D.; Sadler, P. J.; Marmion, C. J. A Novel Dual-Functioning Ruthenium(II)-Arene Complex of an Anti-Microbial Ciprofloxacin Derivative - Anti-Proliferative and Anti-Microbial Activity. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *160*, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.018>.
- (63) Michaut, M.; Steffen, A.; Contreras, J.-M.; Morice, C.; Paulen, A.; Schalk, I. J.; Plésiat, P.; Mislin, G. L. A. Chryso-Lactams:Gold(I) Derivatives of Ampicillin with Specific Activity against Gram-Positive Pathogens. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 127098. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127098>.
- (64) Laurent, Q.; Batchelor, L. K.; Dyson, P. J. Applying a Trojan Horse Strategy to Ruthenium Complexes in the Pursuit of Novel Antibacterial Agents. *Organometallics* **2018**, *37* (6), 915–923. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00885>.
- (65) Hudej, R.; Kljun, J.; Kandioller, W.; Repnik, U.; Turk, B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Miklavčič, D.; Turel, I. Synthesis and Biological Evaluation of the Thionated Antibacterial Agent Nalidixic Acid and Its Organoruthenium(II) Complex. *Organometallics* **2012**, *31* (16), 5867–5874. <https://doi.org/10.1021/om300424w>.
- (66) Guo, C.; Nolan, E. M. Heavy-Metal Trojan Horse: Enterobactin-Directed Delivery of Platinum(IV) Prodrugs to *Escherichia Coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (28), 12756–12768. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c03324>.
- (67) Southwell, J.; Herman, R.; Raines, D.; Clarke, J.; Boeswald, I.; Dreher, T.; Gutenthaler, S.; Schubert, N.; Seefeldt, J.; Metzler-Nolte, N.; Thomas, G.; Wilson, K.; Duhme-Klair, A.-K. Siderophore-linked Ruthenium Catalysts for Targeted Allyl Ester Prodrug Activation within Bacterial Cells. *Chem. Eur. J.* **2022**, chem.202202536. <https://doi.org/10.1002/chem.202202536>.
- (68) Raab, O. Über Die Wirkung Fluorescirender Stoffe Auf Infusorien. *Z. Biol.* **1900**, *39*, 524–546.
- (69) Agarwal, M. L.; Clay, M. E.; Harvey, E. J.; Evans, H. H.; Antunez, A. R.; Oleinick, N. L. Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Cancer Res.* **1991**, *51* (21), 5993–5996.
- (70) Yin, R.; Dai, T.; Avci, P.; Jorge, A. E. S.; de Melo, W. C. M. A.; Vecchio, D.; Huang, Y.-Y.; Gupta, A.; Hamblin, M. R. Light Based Anti-Infectives: Ultraviolet C Irradiation, Photodynamic Therapy, Blue Light, and Beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13* (5), 731–762. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.009>.

- (71) Dai, T.; Gupta, A.; Murray, C. K.; Vrahas, M. S.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R. Blue Light for Infectious Diseases: *Propionibacterium Acnes*, *Helicobacter Pylori*, and Beyond? *Drug Resist. Updat.* **2012**, *15* (4), 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.07.001>.
- (72) Wegener, M.; Hansen, M. J.; Driessen, A. J. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Photocontrol of Antibacterial Activity: Shifting from UV to Red Light Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (49), 17979–17986. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09281>.
- (73) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- (74) Kessel, D. Photodynamic Therapy: Critical PDT Theory. *Photochem. Photobiol.* **2022**. <https://doi.org/10.1111/php.13616>.
- (75) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (76) Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24* (2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>.
- (77) Brancalion, L.; Moseley, H. Laser and Non-Laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med. Sci.* **2002**, *17* (3), 173–186. <https://doi.org/10.1007/s101030200027>.
- (78) Juzeniene, A.; Juzenas, P.; Ma, L.-W.; Iani, V.; Moan, J. Effectiveness of Different Light Sources for 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy. *Lasers Med. Sci.* **2004**, *19* (3), 139–149. <https://doi.org/10.1007/s10103-004-0314-x>.
- (79) Algorri, J. F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; López-Higuera, J. M. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. *Cancers* **2021**, *13* (17), 4447. <https://doi.org/10.3390/cancers13174447>.
- (80) Bolze, F.; Jenni, S.; Sour, A.; Heitz, V. Molecular Photosensitisers for Two-Photon Photodynamic Therapy. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (96), 12857–12877. <https://doi.org/10.1039/C7CC06133A>.
- (81) Starkey, J. R.; Rebane, A. K.; Drobizhev, M. A.; Meng, F.; Gong, A.; Elliott, A.; McInerney, K.; Spangler, C. W. New Two-Photon Activated Photodynamic Therapy Sensitizers Induce Xenograft Tumor Regressions after Near-IR Laser Treatment through the Body of the Host Mouse. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (20), 6564–6573. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4162>.
- (82) Konopka, K.; Goslinski, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. *J. Dent. Res.* **2007**, *86* (8), 694–707. <https://doi.org/10.1177/154405910708600803>.
- (83) Glueck, M.; Schamberger, B.; Eckl, P.; Plaetzer, K. New Horizons in Microbiological Food Safety: Photodynamic Decontamination Based on a Curcumin Derivative. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16* (12), 1784–1791. <https://doi.org/10.1039/c7pp00165g>.
- (84) Vimaladevi, M.; Divya, K. C.; Girigoswami, A. Liposomal Nanoformulations of Rhodamine for Targeted Photodynamic Inactivation of Multidrug Resistant Gram

- Negative Bacteria in Sewage Treatment Plant. *J. Photochem. Photobiol. B* **2016**, *162*, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.034>.
- (85) Chen, W.; Chen, J.; Li, L.; Wang, X.; Wei, Q.; Ghiladi, R. A.; Wang, Q. Wool/Acrylic Blended Fabrics as Next-Generation Photodynamic Antimicrobial Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (33), 29557–29568. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09625>.
- (86) Anas, A.; Sobhanan, J.; Sulfiya, K. M.; Jasmin, C.; Sreelakshmi, P. K.; Biju, V. Advances in Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2021**, *49*, 100452. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2021.100452>.
- (87) Zhao, Y.; Lu, Z.; Dai, X.; Wei, X.; Yu, Y.; Chen, X.; Zhang, X.; Li, C. Glycomimetic-Conjugated Photosensitizer for Specific *Pseudomonas Aeruginosa* Recognition and Targeted Photodynamic Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (9), 3222–3230. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00600>.
- (88) Soliman, N.; Sol, V.; Ouk, T.-S.; Thomas, C. M.; Gasser, G. Encapsulation of a Ru(II) Polypyridyl Complex into Polylactide Nanoparticles for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (10), 961. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100961>.
- (89) Le Gall, T.; Lemerrier, G.; Chevreux, S.; Tücking, K.-S.; Ravel, J.; Thétiot, F.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Montier, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure-Activity Study on Clinical Bacterial Strains. *ChemMedChem* **2018**, *13* (20), 2229–2239. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800392>.
- (90) Youf, R.; Nasir, A.; Müller, M.; Thétiot, F.; Haute, T.; Ghanem, R.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; Le Gall, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (8), 1664. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081664>.
- (91) Huang, H.; Banerjee, S.; Sadler, P. J. Recent Advances in the Design of Targeted Iridium(III) Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2018**, *19* (15), 1574–1589. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800182>.
- (92) Ho, P.-Y.; Lee, S.-Y.; Kam, C.; Zhu, J.; Shan, G.-G.; Hong, Y.; Wong, W.-Y.; Chen, S. Fluorescence Imaging and Photodynamic Inactivation of Bacteria Based on Cationic Cyclometalated Iridium(III) Complexes with Aggregation-Induced Emission Properties. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10* (24), 2100706. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100706>.
- (93) Sauvageot, E.; Elie, M.; Gaillard, S.; Daniellou, R.; Fechter, P.; Schalk, I. J.; Gasser, V.; Renaud, J.-L.; Mislin, G. L. A. Antipseudomonal Activity Enhancement of Luminescent Iridium(III) Dipyrindylamine Complexes under Visible Blue Light. *Metallomics* **2017**, *9* (12), 1820–1827. <https://doi.org/10.1039/C7MT00262A>.
- (94) Walker, J. R.; Altman, E. Biotinylation Facilitates the Uptake of Large Peptides by *Escherichia Coli* and Other Gram-Negative Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (4), 1850–1855. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1850-1855.2005>.
- (95) Piffeteau, A.; Gaudry, M. Biotin Uptake: Influx, Efflux and Countertransport in *Escherichia Coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1985**, *816* (1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90395-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90395-5).

- (96) Anderegg, G.; L'Eplattenier, F.; Schwarzenbach, G. Hydroxamatkomplexe III. Eisen(III)-Austausch Zwischen Sideraminen Und Komplexonen. Diskussion Der Bildungskonstanten Der Hydroxamatkomplexe. *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46* (4), 1409–1422. <https://doi.org/10.1002/hlca.19630460436>.
- (97) Normant, V.; Josts, I.; Kuhn, L.; Perraud, Q.; Fritsch, S.; Hammann, P.; Mislin, G. L. A.; Tidow, H.; Schalk, I. J. Nocardamine-Dependent Iron Uptake in *Pseudomonas Aeruginosa*: Exclusive Involvement of the FoxA Outer Membrane Transporter. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15* (10), 2741–2751. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00535>.
- (98) Chan, D. C. K.; Burrows, L. L. *Pseudomonas Aeruginosa* FpvB Is a High-Affinity Transporter for Xenosiderophores Ferrichrome and Ferrioxamine B. *mBio* **2022**, e03149-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.03149-22>.
- (99) Josts, I.; Veith, K.; Tidow, H. Ternary Structure of the Outer Membrane Transporter FoxA with Resolved Signalling Domain Provides Insights into TonB-Mediated Siderophore Uptake. *eLife* **2019**, *8*, e48528. <https://doi.org/10.7554/eLife.48528>.
- (100) Kirin, S. I.; Yennawar, H. P.; Williams, M. E. Synthesis and Characterization of Cu(II) Complexes with Amino Acid Substituted Di(2-Pyridyl)Amine Ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007* (23), 3686–3694. <https://doi.org/10.1002/ejic.200700273>.
- (101) Weidmann, A. G.; Komor, A. C.; Barton, J. K. Biological Effects of Simple Changes in Functionality on Rhodium Metalloinsertors. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2013**, *371* (1995), 20120117. <https://doi.org/10.1098/rsta.2012.0117>.
- (102) Sheehan, J. C.; Ledis, S. L. Total Synthesis of a Monocyclic Peptide Lactone Antibiotic, Etamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (3), 875–879. <https://doi.org/10.1021/ja00784a041>.
- (103) Nonoyama, M. Chelating C-Metallation of N-Phenylpyrazole with Rhodium(III) and Iridium(III). *J. Organomet. Chem.* **1975**, *86* (2), 263–267. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)89620-5](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)89620-5).
- (104) Gotsbacher, M. P.; Codd, R. Azido-Desferrioxamine Siderophores as Functional Click-Chemistry Probes Generated in Culture upon Adding a Diazo-Transfer Reagent. *ChemBioChem* **2020**, *21* (10), 1433–1445. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900661>.
- (105) Zheng, T.; Bullock, J. L.; Nolan, E. M. Siderophore-Mediated Cargo Delivery to the Cytoplasm of *Escherichia Coli* and *Pseudomonas Aeruginosa*: Syntheses of Monofunctionalized Enterobactin Scaffolds and Evaluation of Enterobactin-Cargo Conjugate Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (44), 18388–18400. <https://doi.org/10.1021/ja3077268>.
- (106) Thamarappalli, A.; Ranasinghe, C. S. K.; Jang, J.; Gao, M.; Burn, P. L.; Puttock, E. V.; Shaw, P. E. Properties of Dual Emissive Dendrimers Based on Thermally Activated Delayed Fluorescence Dendrons and a Phosphorescent Ir(Ppy)₃ Core. *Adv. Funct. Mater.* **2022**, *32* (38), 2205077. <https://doi.org/10.1002/adfm.202205077>.
- (107) Loomis, L. D.; Raymond, K. N. Solution Equilibria of Enterobactin and Metal-Enterobactin Complexes. *Inorg. Chem.* **1991**, *30* (5), 906–911. <https://doi.org/10.1021/ic00005a008>.

- (108) Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. Enterobactin: An Archetype for Microbial Iron Transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (7), 3584–3588. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630018100>.
- (109) Poole, K.; Young, L.; Neshat, S. Enterobactin-Mediated Iron Transport in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1990**, *172* (12), 6991–6996. <https://doi.org/10.1128/jb.172.12.6991-6996.1990>.
- (110) Dean, C. R.; Poole, K. Cloning and Characterization of the Ferric Enterobactin Receptor Gene (PfeA) of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (2), 317–324. <https://doi.org/10.1128/jb.175.2.317-324.1993>.
- (111) Gasser, V.; Kuhn, L.; Hubert, T.; Aussel, L.; Hammann, P.; Schalk, I. J. The Esterase PfeE, the Achilles' Heel in the Battle for Iron between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Escherichia Coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (6), 2814. <https://doi.org/10.3390/ijms22062814>.
- (112) Baco, E.; Hoegy, F.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Diphenyl-Benzo[1,3]Dioxole-4-Carboxylic Acid Pentafluorophenyl Ester: A Convenient Catechol Precursor in the Synthesis of Siderophore Vectors Suitable for Antibiotic Trojan Horse Strategies. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (5), 749–757. <https://doi.org/10.1039/C3OB41990H>.
- (113) Gasser, V.; Baco, E.; Cunrath, O.; August, P. S.; Perraud, Q.; Zill, N.; Schleberger, C.; Schmidt, A.; Paulen, A.; Bumann, D.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. Catechol Siderophores Repress the Pyochelin Pathway and Activate the Enterobactin Pathway in *Pseudomonas Aeruginosa*: An Opportunity for Siderophore-Antibiotic Conjugates Development: Ability of *P. Aeruginosa* to Acquire Iron via Catechols. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18* (3), 819–832. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13199>.
- (114) Moynié, L.; Milenkovic, S.; Mislin, G. L. A.; Gasser, V.; Mallocci, G.; Baco, E.; McCaughan, R. P.; Page, M. G. P.; Schalk, I. J.; Ceccarelli, M.; Naismith, J. H. The Complex of Ferric-Enterobactin with Its Transporter from *Pseudomonas Aeruginosa* Suggests a Two-Site Model. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 3673. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11508-y>.
- (115) Pinkert, L.; Lai, Y.-H.; Peukert, C.; Hotop, S.-K.; Karge, B.; Schulze, L. M.; Grunenberg, J.; Brönstrup, M. Antibiotic Conjugates with an Artificial MECAM-Based Siderophore Are Potent Agents against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Pathogens. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (20), 15440–15460. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01482>.
- (116) Loupias, P.; Dechamps-Olivier, I.; Dupont, L.; Vanlemmens, P.; Mullié, C.; Taudon, N.; Bouchut, A.; Dassonville-Klimpt, A.; Sonnet, P. Study of Iron Piperazine-Based Chelators as Potential Siderophore Mimetics. *Pharmaceuticals* **2019**, *12* (4), 160. <https://doi.org/10.3390/ph12040160>.
- (117) Wang, G.; Bian, L.; Zhang, H.; Wang, Y.; Gao, L.; Sun, K.; Xiang, L.; Qi, J. Synthesis and SAR Studies of Neuritogenic Gentiside Derivatives. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2016**, *64* (2), 161–170. <https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00795>.
- (118) Laganis, E. D.; Chenard, B. L. Metal Silanolates: Organic Soluble Equivalents for O². *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25* (51), 5831–5834. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)81697-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)81697-X).
- (119) Schuda, P. F.; Botti, C. M.; Venuti, M. C. A Synthesis of the Siderophore 1,3,5-Tris(*N,N'*,*N*-2,3-Dihydroxybenzoyl)Aminomethylbenzene. *Org. Prep. Proced. Int.* **1984**, *16* (2), 119–125. <https://doi.org/10.1080/00304948409356174>.

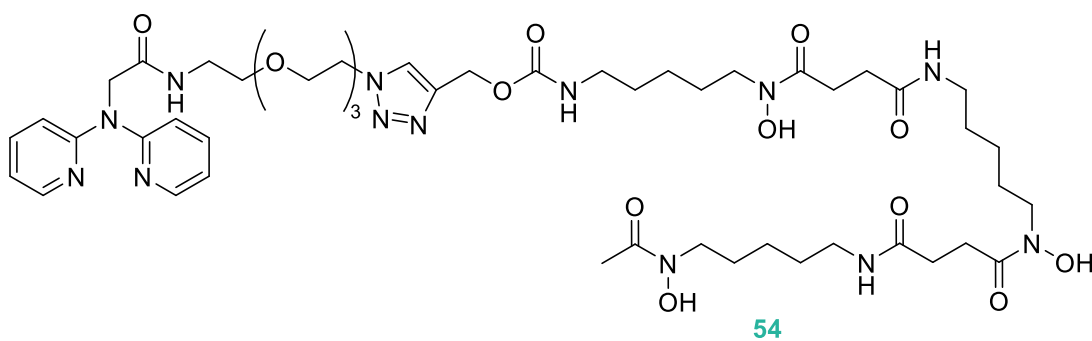
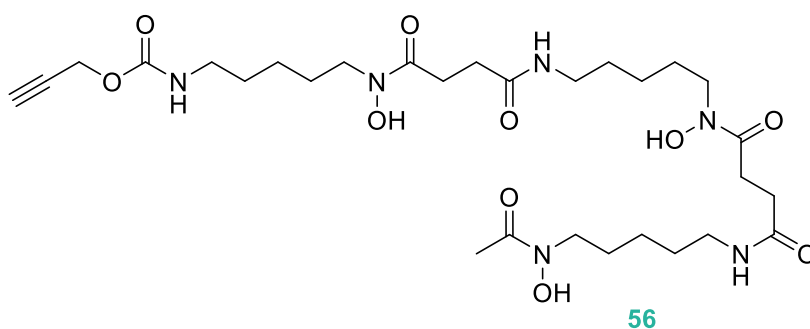
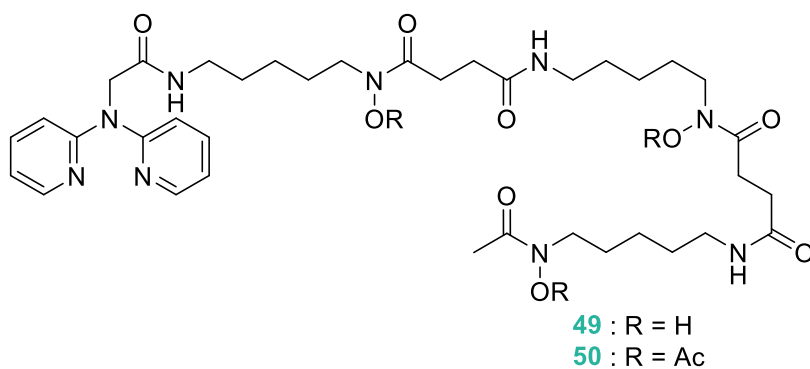
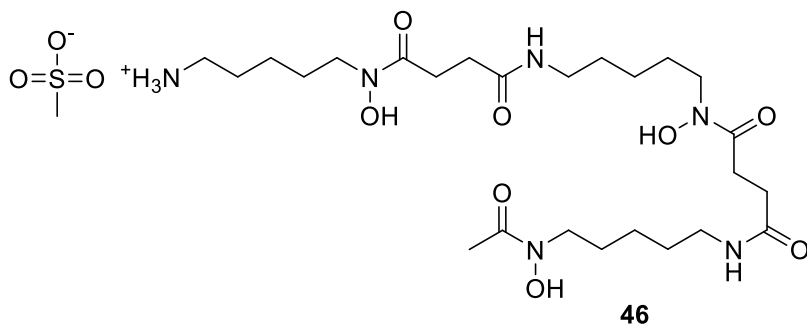
- (120) Orlowska, E.; Roller, A.; Wiesinger, H.; Pignitter, M.; Jirsa, F.; Krachler, R.; Kandoller, W.; Keppler, B. K. Benzoic Hydroxamate-Based Iron Complexes as Model Compounds for Humic Substances: Synthesis, Characterization and Algal Growth Experiments. *RSC Adv.* **2016**, 6 (46), 40238–40249. <https://doi.org/10.1039/C5RA25256C>.
- (121) Han, J.; Wang, X.; Liu, L.; Li, D.; Suyola, S.; Wang, T.; Baigude, H. “Click” Chemistry Mediated Construction of Cationic Curdlan Nanocarriers for Efficient Gene Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 163, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.055>.
- (122) Oikawa, Y.; Tanaka, T.; Horita, K.; Yonemitsu, O. Selective Hydrogenolysis of the Benzyl Protecting Group for Hydroxy Function with Raney Nickel in the Presence of the MPM (4-Methoxybenzyl) and DMPM (3,4-Dimethoxybenzyl) Protecting Groups. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25 (47), 5397–5400. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91294-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91294-8).
- (123) Li, Y.; Manickam, G.; Ghoshal, A.; Subramaniam, P. More Efficient Palladium Catalyst for Hydrogenolysis of Benzyl Groups. *Synth. Commun.* **2006**, 36 (7), 925–928. <https://doi.org/10.1080/00397910500466199>.
- (124) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3th ed.; John Wiley & Sons, Inc: New York, 1999.
- (125) O’Connor, C. Acidic and Basic Amide Hydrolysis. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1970**, 24 (4), 553. <https://doi.org/10.1039/qr9702400553>.
- (126) Han, X.; Achalkumar, A. S.; Bushby, R. J.; Evans, S. D. A Cholesterol-Based Tether for Creating Photopatterned Lipid Membrane Arrays on Both a Silica and Gold Surface. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2009**, 15 (26), 6363–6370. <https://doi.org/10.1002/chem.200900404>.
- (127) Faucon, A. L.; Hoegy, F.; Werle, N.; Gurlaouen, C.; Mislin, G. L. A. Dipyriddyamine-Acetamide (Dpaa): A Primary Amine Protecting Group Orthogonally Cleavable under Acidic Conditions in the Presence of *t*-Butyloxycarbonyl (Boc) and *t*-Butylester. *Tetrahedron Lett.* **2022**, 96, 153758. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2022.153758>.
- (128) Frei, A. Metal Complexes, an Untapped Source of Antibiotic Potential? *Antibiotics* **2020**, 9 (2), 90. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020090>.
- (129) Perraud, Q.; Cantero, P.; Roche, B.; Gasser, V.; Normant, V. P.; Kuhn, L.; Hammann, P.; Mislin, G. L. A.; Ehret-Sabatier, L.; Schalk, I. J. Phenotypic Adaption of *Pseudomonas Aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Mol. Cell. Proteomics* **2020**, 19 (4), 589–607. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001829>.
- (130) Perraud, Q.; Cantero, P.; Munier, M.; Hoegy, F.; Zill, N.; Gasser, V.; Mislin, G. L. A.; Ehret-Sabatier, L.; Schalk, I. J. Phenotypic Adaptation of *Pseudomonas Aeruginosa* in the Presence of Siderophore-Antibiotic Conjugates during Epithelial Cell Infection. *Microorganisms* **2020**, 8 (11), 1820. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111820>.
- (131) Zscherp, R.; Coetzee, J.; Vornweg, J.; Grunenberg, J.; Herrmann, J.; Müller, R.; Klahn, P. Biomimetic Enterobactin Analogue Mediates Iron-Uptake and Cargo Transport into *E. Coli* and *P. Aeruginosa*. *Chem. Sci.* **2021**, 12 (30), 10179–10190. <https://doi.org/10.1039/D1SC02084F>.
- (132) Klahn, P.; Jimidar, C. C.; Zscherp, R. Advances in the Synthesis of Enterobactin, Artificial Analogues and Enterobactin-Derived Antimicrobial Drug Conjugates and Imaging Tools

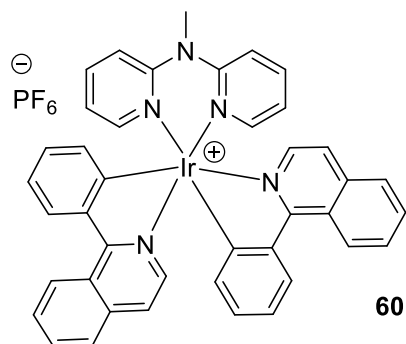
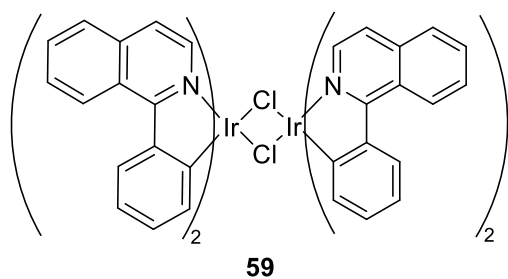
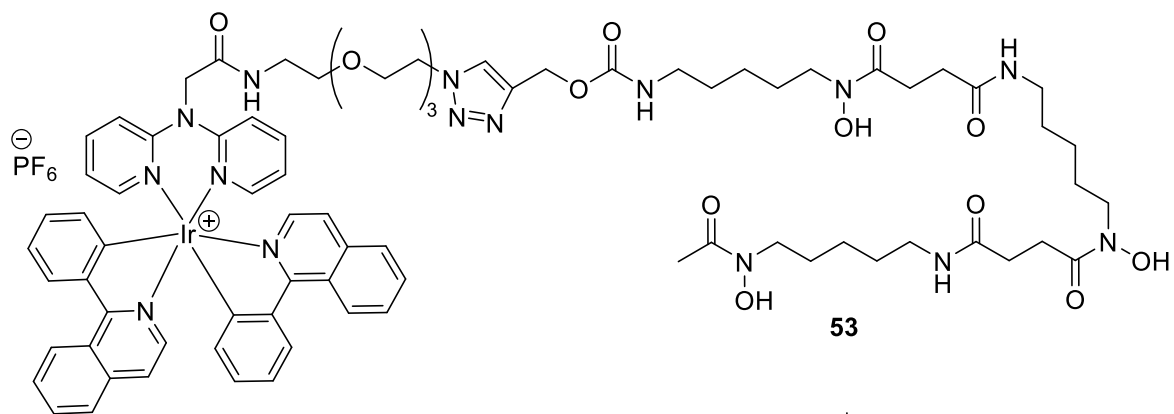
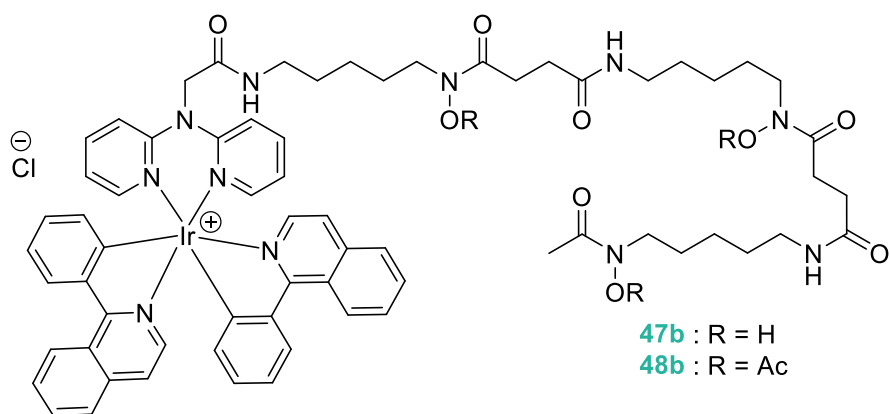
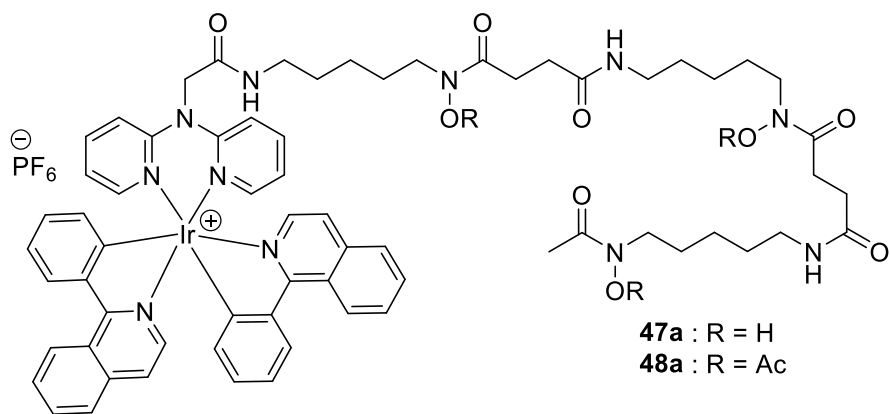
- for Infection Diagnosis. *Synthesis* **2022**, a-1783-0751. <https://doi.org/10.1055/a-1783-0751>.
- (133) Schons, V.; Atkinson, R. A.; Dugave, C.; Graff, R.; Mislin, G. L. A.; Rochet, L.; Hennard, C.; Kieffer, B.; Abdallah, M. A.; Schalk, I. J. The Structure–Activity Relationship of Ferric Pyoverdine Bound to Its Outer Membrane Transporter: Implications for the Mechanism of Iron Uptake. *Biochemistry* **2005**, *44* (43), 14069–14079. <https://doi.org/10.1021/bi051155s>.
- (134) Noël, S.; Guillon, L.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Synthesis of Fluorescent Probes Based on the Pyochelin Siderophore Scaffold. *Org. Lett.* **2011**, *13* (5), 844–847. <https://doi.org/10.1021/ol1028173>.
- (135) Nakashima, Y.; Ohta, S.; Wolf, A. M. Blue Light-Induced Oxidative Stress in Live Skin. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *108*, 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.010>.
- (136) Zhu, S.; Li, X.; Wu, F.; Cao, X.; Gou, K.; Wang, C.; Lin, C. Blue Light Induces Skin Apoptosis and Degeneration through Activation of the Endoplasmic Reticulum Stress–Autophagy Apoptosis Axis: Protective Role of Hydrogen Sulfide. *J. Photochem. Photobiol. B* **2022**, *229*, 112426. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112426>.
- (137) McKenzie, L. K.; Sazanovich, I. V.; Baggaley, E.; Bonneau, M.; Guerchais, V.; Williams, J. A. G.; Weinstein, J. A.; Bryant, H. E. Metal Complexes for Two-Photon Photodynamic Therapy: A Cyclometallated Iridium Complex Induces Two-Photon Photosensitization of Cancer Cells under Near-IR Light. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (2), 234–238. <https://doi.org/10.1002/chem.201604792>.
- (138) Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Ed. CLSI Supplement M100, 2020.

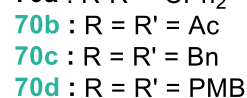
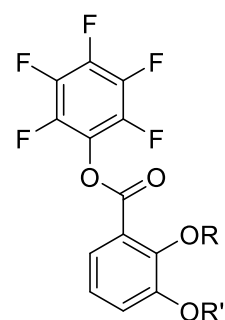
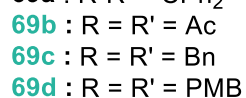
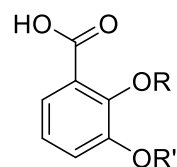
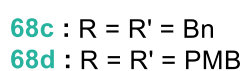
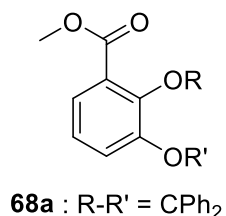
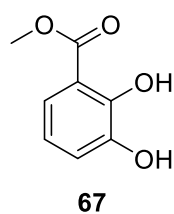
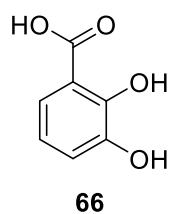
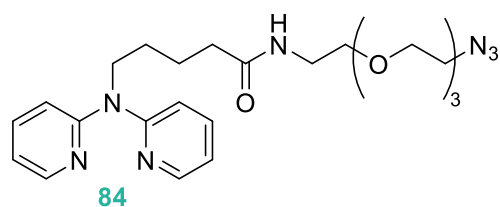
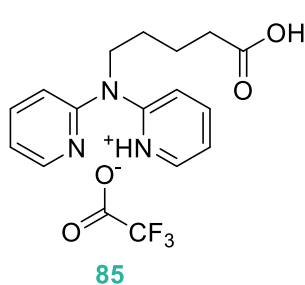
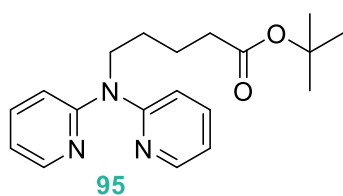
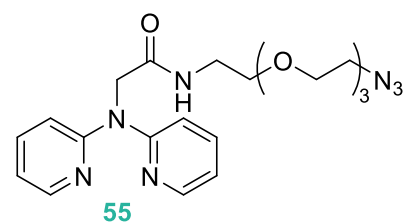
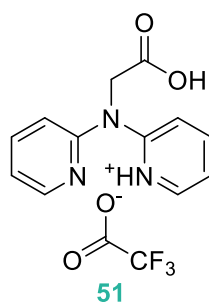
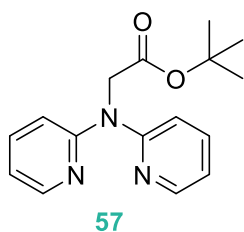
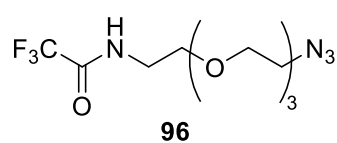
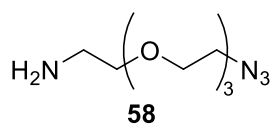
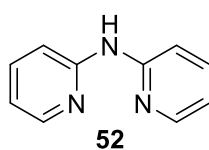
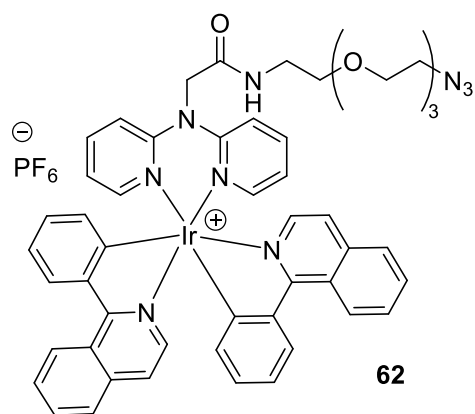
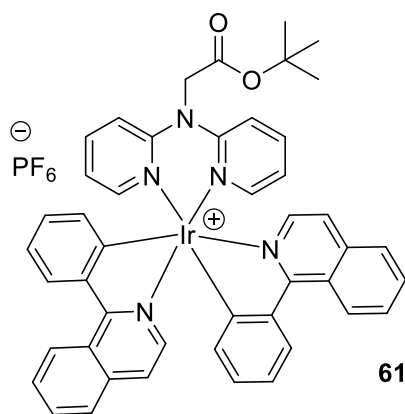
Annexes

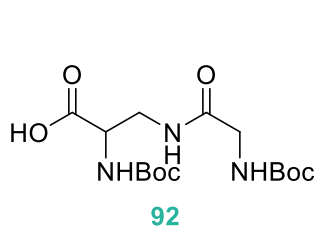
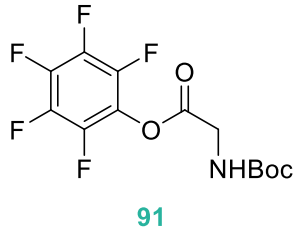
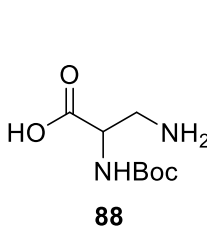
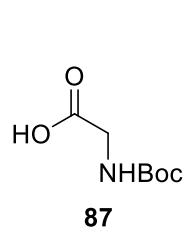
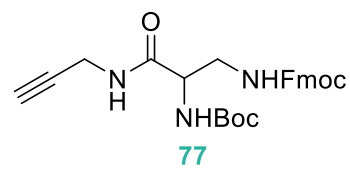
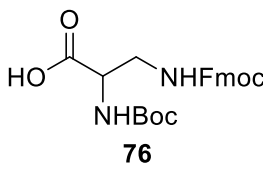
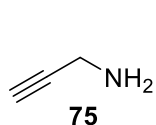
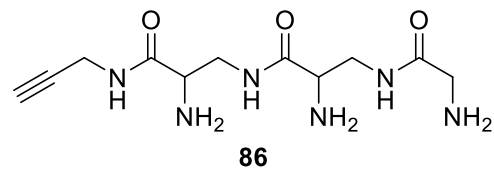
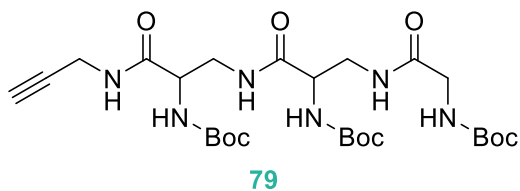
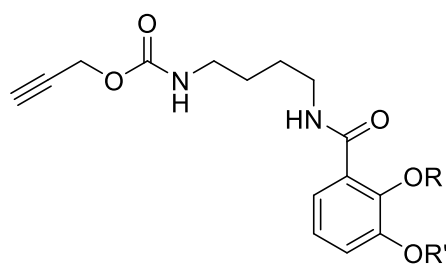
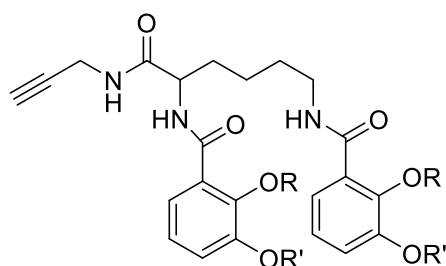
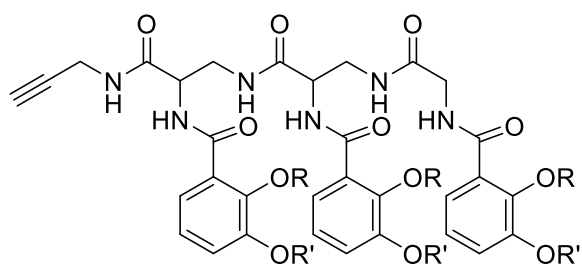
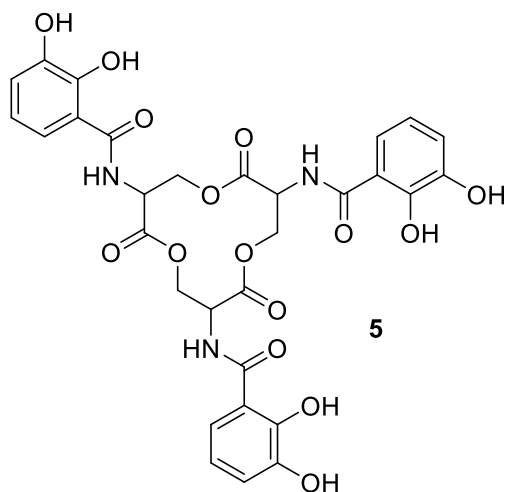
I. Index des molécules de la Partie II

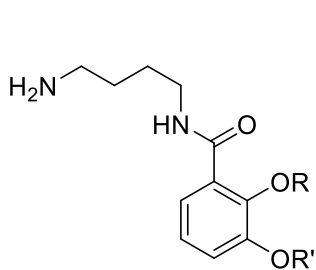
Les molécules dont les numéros sont colorés en **cyan**, sont décrites dans la partie « Protocoles et données analytiques et spectrales ».



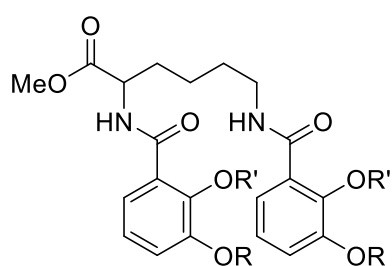




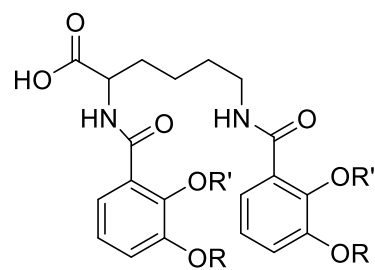




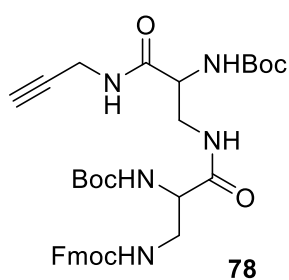
71a : R-R' = CPh₂
71c : R = R' = Bn



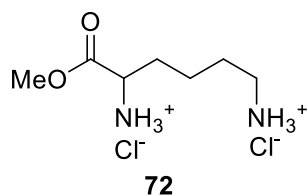
73a : R-R' = CPh₂



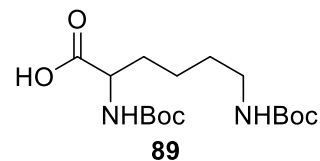
74a : R-R' = CPh₂



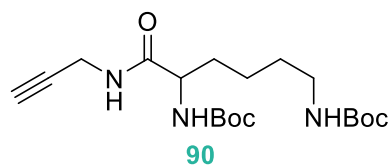
78



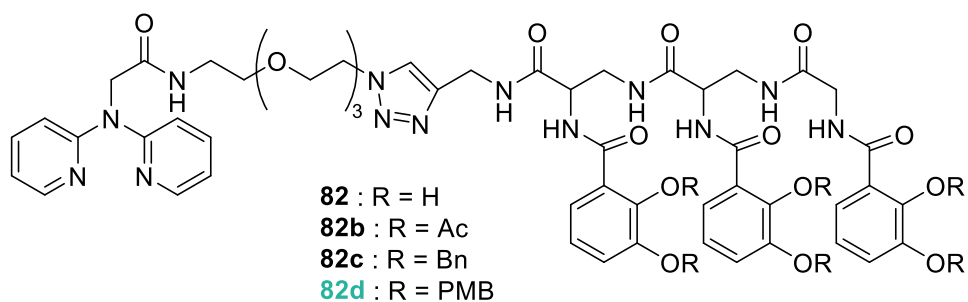
72



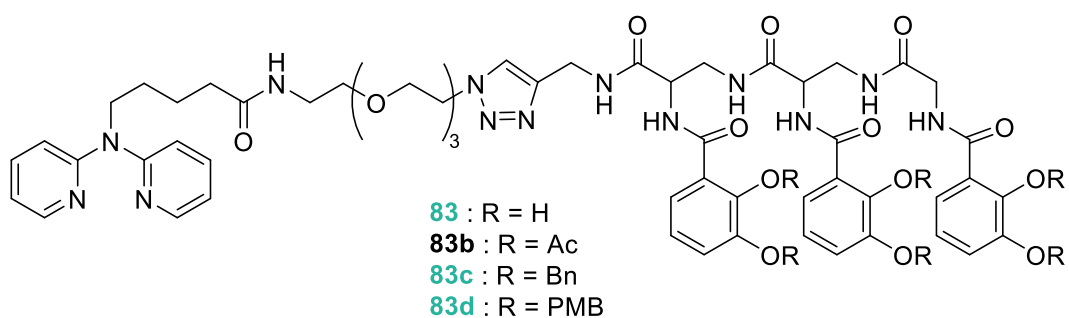
89



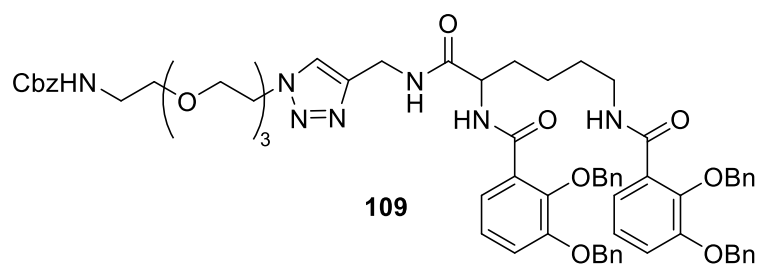
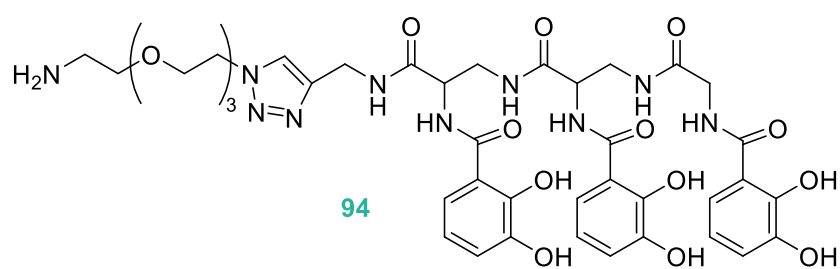
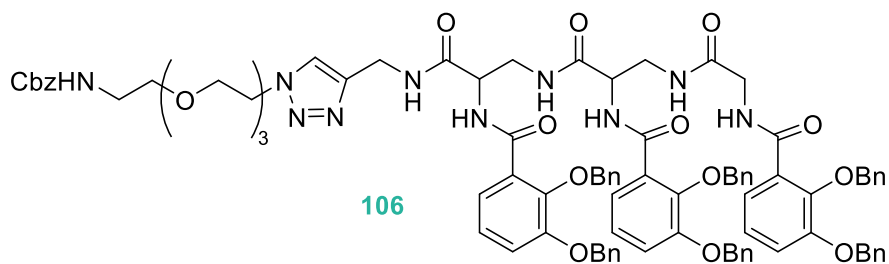
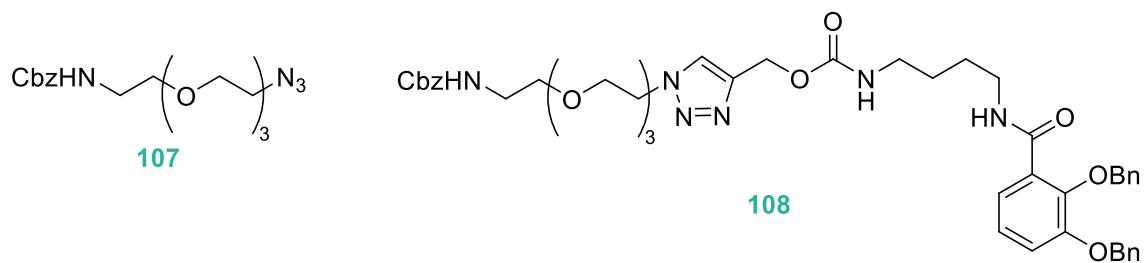
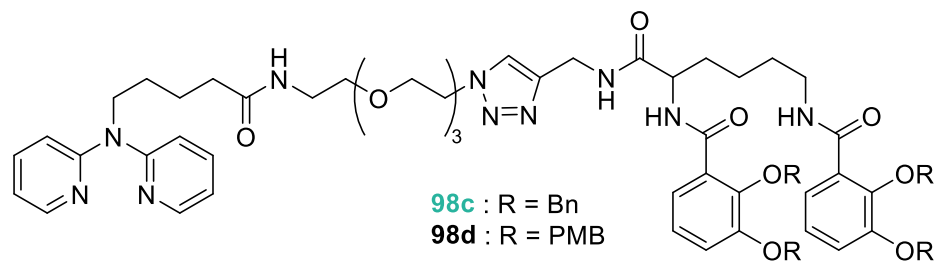
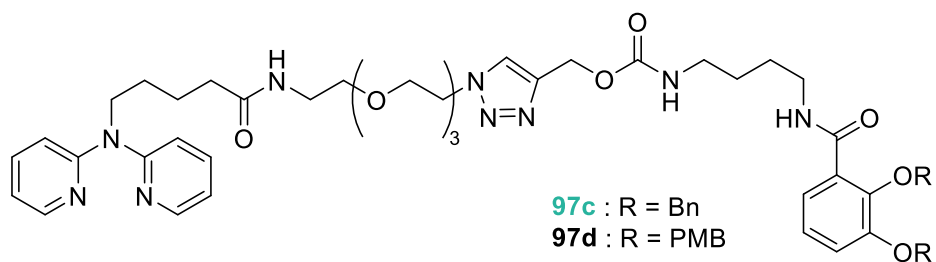
90

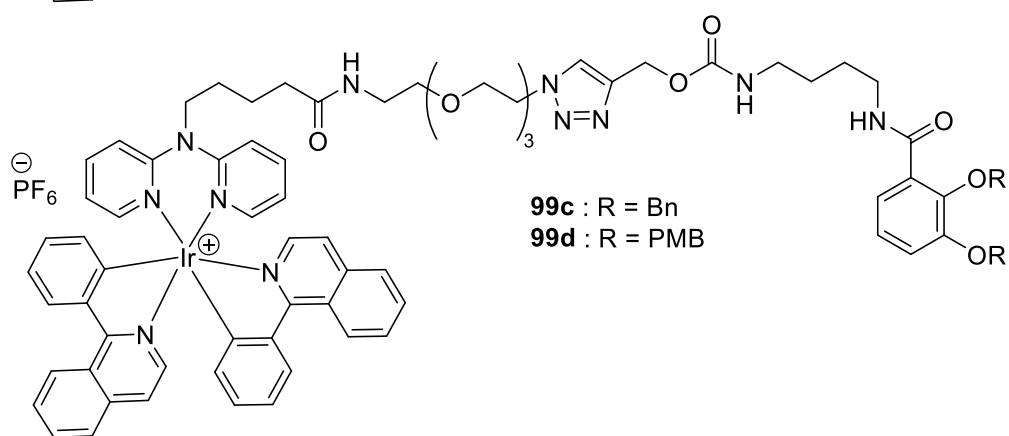
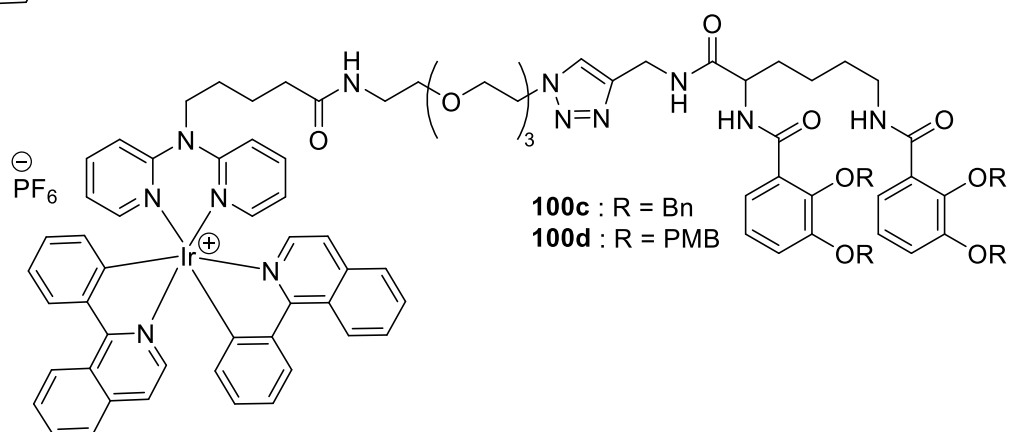
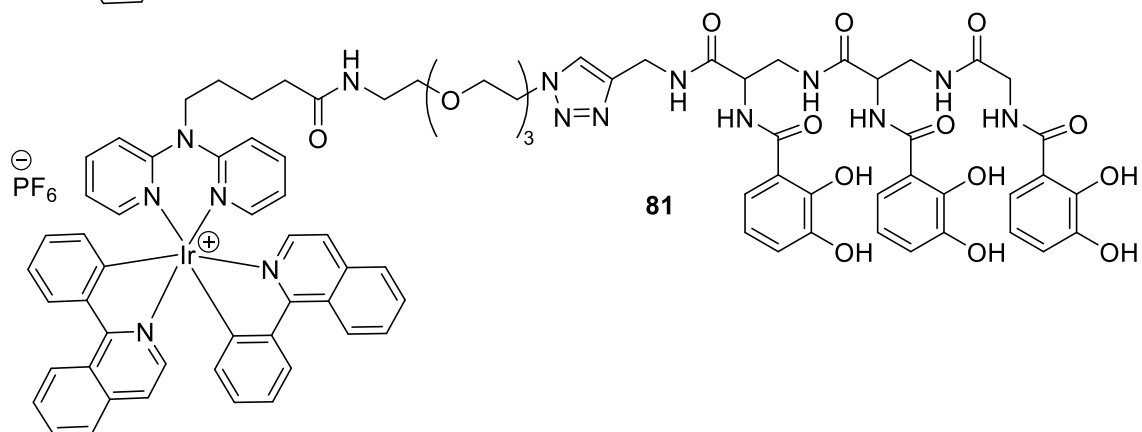
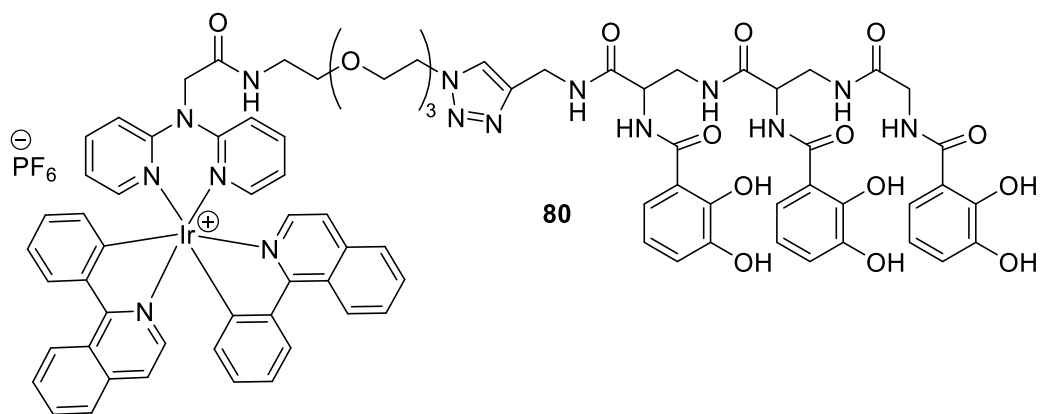


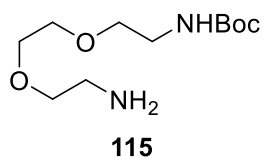
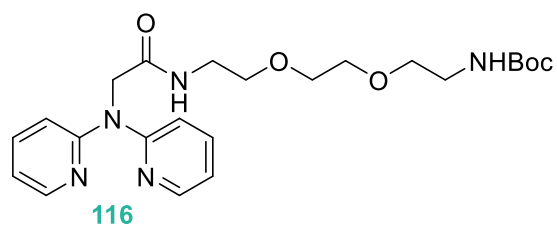
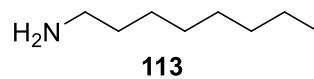
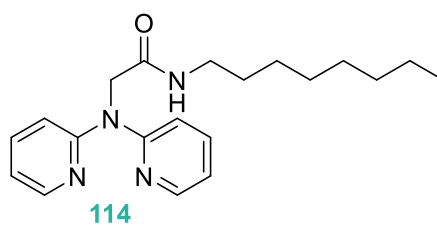
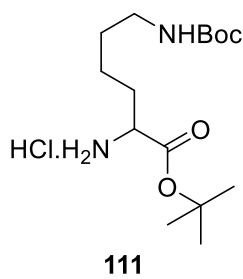
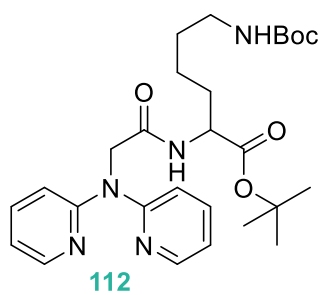
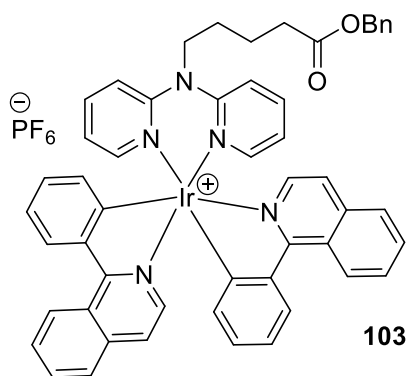
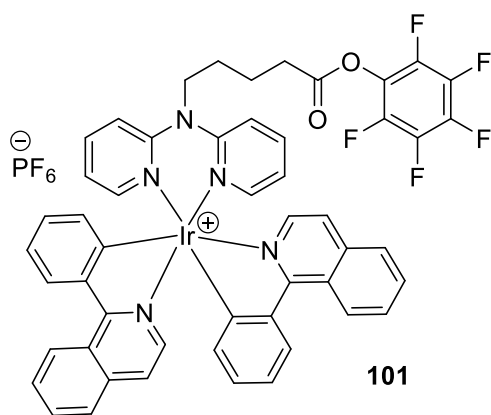
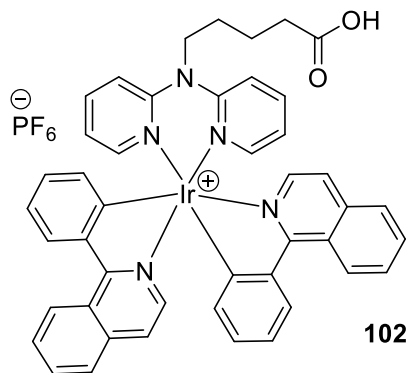
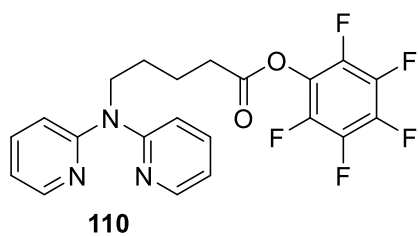
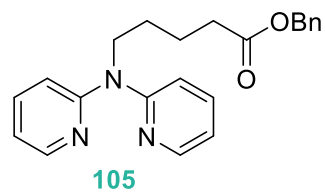
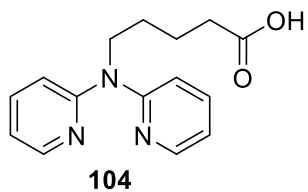
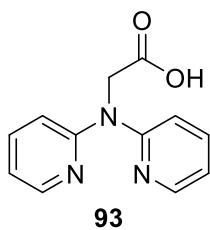
82 : R = H
82b : R = Ac
82c : R = Bn
82d : R = PMB



83 : R = H
83b : R = Ac
83c : R = Bn
83d : R = PMB







II. Index des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif (a) et à Gram positif (b). Modifié de Brown, L. <i>et al.</i> , <i>Nat. Rev. Microbiol.</i> 2015 , <i>13</i> , 620–630. ¹²	10
Figure 2. Structures de groupes bidentates retrouvés dans les sidérophores. Organisation des hétéroatomes (colorés en rouge) autour de l'ion Fe(III).	11
Figure 3. Structures de six sidérophores bactériens représentatifs. Les hétéroatomes impliqués dans la chélation du fer(III) sont colorés en rouge.	12
Figure 4. Processus général du transport du fer sidérophore-dépendant dans une bactérie à Gram négatif. Le sidérophore est coloré en violet et la protéine périplasmique en violet pâle. L'ion Fe ³⁺ est représenté sous la forme d'une sphère verte et l'ion Fe ²⁺ sous la forme d'une sphère rose.	14
Figure 5. Principe général de la stratégie du cheval de Troie utilisant des conjugués sidérophore-antibiotique (sidéromycines). Le sidérophore est coloré en violet et le bras espaceur en bleu. L'antibiotique est représenté sous la forme d'une gélule orange et blanche, l'ion Fe ³⁺ sous la forme d'une sphère verte et l'ion Fe ²⁺ sous la forme d'une sphère rose. ...	15
Figure 6. Structure de l'albomycine δ2 7 et mode de fonctionnement de cette sidéromycine. Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.	16
Figure 7. Structure de la microcine E492 8 et mode de fonctionnement de cette sidéromycine. Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.	17
Figure 8. Développement de sidéromycines synthétiques au cours du temps. Extrait de la thèse de Q. Perraud, 2020 . ²⁹	19
Figure 9. Structures des conjugués 9a et 9b entre un analogue fonctionnalisé de l'Ent 5 et des antibiotiques de la famille des β-lactames. ⁵⁰ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.	20
Figure 10. Structure du céfidérocol 10 (FETCROJA®). Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.	21

Figure 11. Structures des conjugués 11a et 11b entre un analogue fonctionnalisé de l'Ent 5 et de la ciprofloxacine, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones. ⁵⁴ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.	22
Figure 12. Structures des conjugués 12a-d et 13a,d entre un sidérophore et la ciprofloxacine. ⁵⁶ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange.	23
Figure 13. Structure et mode d'action de la sidéromycine artificielle 14 . Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et l'antibiotique en orange. L'ion Fe^{3+} est représenté sous la forme d'une sphère verte.	25
Figure 14. Structures des conjugués DFO-Ru(II) 15 , 16 , 17 et 18 . ⁶⁴ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et le métalloantibiotique en orange.	28
Figure 15. Structures des conjugués Ent-Pt(IV) 19a et 19b . ⁶⁶ Le vecteur sidérophore est coloré en violet, l'espaceur en bleu et le métalloantibiotique en orange.	29
Figure 16. Structures des catalyseurs sidérophores-Ru(IV) 22a à 22e . ⁶⁷ Le vecteur sidérophore est coloré en violet et le bras espaceur-complexe Ru(IV) en bleu.	31
Figure 17. Processus de photosensibilisation illustré par un diagramme de Jablonski modifié. Extrait de Agostinis, P. <i>et al.</i> , <i>CA: A Cancer Journal for Clinicians</i> 2011 , 61, 250–281. ⁷⁵	34
Figure 18. Structures de quelques PS communs.	36
Figure 19. Structures du complexe de Ru(II) 29 et des nanoconjugués ruthénium(II)-polylactide 30a-e . ⁸⁸	37
Figure 20. Structures des complexes de Ru(II) 31 à 36 , ainsi que les ligands Phen 37 et 38 . ⁸⁹	38
Figure 21. Structure du complexe de Ru(II) 39 . ⁹⁰	40
Figure 22. Structures des complexes d'Ir(III) 40 , 41 et 42 . ⁹²	41
Figure 23. Structures des complexes d'Ir(III) 43 , 44 et 45 . ⁹³	42
Figure 24. Structure de la DFO 46 . Les hétéroatomes impliqués dans la chélation du fer(III) sont colorés en rouge.	47

Figure 25. Modèle proposé du système du transport du fer DFO-dépendant. Le second transporteur n'était pas identifié à la date de publication de cet article. Modifié de Normant <i>et al.</i> , <i>ACS Chem. Biol.</i> 2020 , <i>15</i> , 2741–2751. ⁹⁷	48
Figure 26. Vue d'ensemble du complexe FoxA-DFO avec la fraction périplasmique de la protéine TonB. Le transporteur FoxA est en gris. Modifié de Josts <i>et al.</i> , <i>eLife</i> 2019 , <i>8</i> , e48528. ⁹⁹	49
Figure 27. Vue sagittale de FoxA en complexe avec Fe(III)-NOCA. Modifié de Normant <i>et al.</i> , <i>ACS Chem. Biol.</i> 2020 , <i>15</i> , 2741–2751. ⁹⁷	49
Figure 28. Photoincubateur utilisé pour la détermination de CMI (ici en lumière bleue).	56
Figure 29. CMI des composés 60 , 61 et 62 . Le graphique ne prenant pas en charge les symboles ">" et "≤", les valeurs "128" et "0,0625" sont en réalité "> 128" et "≤ 0,0625" respectivement. Les résultats ont été obtenus en réplicats biologiques (n = 3).	57
Figure 30. Spectres d'absorption des complexes 60 en cyan (λ_{max} = 292, 344, 353, 381, 442 nm), 61 en violet (λ_{max} = 292, 342, 355, 383, 439 nm) et 62 en orange (λ_{max} = 293, 341, 354, 383, 443 nm). Un zoom du spectre entre 500 et 550 nm est représenté en haut à droite.	58
Figure 31. LC/MS-BR du conjugué 47a ferrique ($M_{\text{cation 47a-Fe}}$ = 1425,49 g.mol ⁻¹).	62
Figure 32. LC/MS-BR du conjugué 53 ferrique ($M_{\text{cation 53-Fe}}$ = 1725,61 g.mol ⁻¹).	63
Figure 33. Structure des conjugués DFO-Ir(III) 47b et 48b possédant le contre-ion Cl ⁻	64
Figure 34. CMI des conjugués 49 , 47a , 47a-[Fe] et 53-[Fe] . Le graphique ne prenant pas en charge les symboles ">" et "≤", les valeurs "128" et "0,0625" sont en réalité "> 128" et "≤ 0,0625" respectivement. Les résultats ont été obtenus en réplicats biologiques (n = 3) pour le conjugué 53-[Fe] mais juste une mesure (n = 1) pour les autres conjugués à l'heure de rédiger ce manuscrit.	65
Figure 35. Structure de l'entérobactine 5 et de son complexe ferrique. Les hétéroatomes impliqués dans la chélation du fer(III) sont colorés en rouge. L'ion Fe(III) est représenté par la sphère orange.	67
Figure 36. Représentation schématique de la voie de transport du fer entérobactine-dépendante de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1. Extrait de la thèse de Q. Perraud, 2020 . ²⁹	69

Figure 37. Structures du TCV 63 , du BCV 64 et du MCV 65 . Les hétéroatomes impliqués dans la chélation du fer(III) sont colorés en rouge.....	70
Figure 38. Structure tridimensionnelle de l'entérobactine ferrique et de PfeA, son transporteur de membrane externe spécifique chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Le transporteur est constitué de deux domaines : un tonneau β est coloré en blanc avec des boucles extracellulaires en orange et le domaine N-terminal en rouge obturant le tonneau. La structure carbonée de l'entérobactine ferrique est représentée en cyan. La membrane externe dans laquelle est enchâssé le transporteur est représentée en beige. Le milieu extracellulaire (en haut) et le périplasme (en bas) sont colorés en bleu.....	73
Figure 39. Structures de Ent-Fe ³⁺ , TCV-Fe ³⁺ et BCV-Fe ³⁺ en complexe avec PfeA. (a, d, g) Diagrammes Ligplot illustrant les interactions PfeA-sidérophore. (b, e, h) Carte finale de la densité électronique 2F _O -F _C avec un contour à un niveau 1 σ autour de Ent-Fe ³⁺ , TCV-Fe ³⁺ et BCV-Fe ³⁺ respectivement. (c, f, i) Comparaison du site de liaison Ent-Fe ³⁺ , TCV-Fe ³⁺ et BCV-Fe ³⁺ . Modifié de Moynié, L. et al., <i>Nat Commun</i> 2019 , 10, 3673 et Moynié, L. et al., <i>ACS Infect. Dis.</i> 2022 , 8, 1894–1904. ^{59,114}	74
Figure 40. LC/MS-BR de la réaction de déprotection du conjugué 82d (M ₉₃ = 229,09 g.mol ⁻¹ ; M ₉₄ = 910,35 g.mol ⁻¹).	86
Figure 41. Spectre RMN ¹⁹ F du sous-produit fluoré 96 formé au cours de la synthèse de 84	89
Figure 42. Conjugués MCV-dpa 97d et BCV-dpa 98d possédant une chaîne valérate et dont les catéchols sont protégés par des groupes PMB.	91
Figure 43. Conjugués MCV-Ir(III) 99d et BCV-Ir(III) 100d	92
Figure 44. Structures des conjugués MCV-Ir(III) 99c et BCV-Ir(III) 100c	96
Figure 45. Structure du conjugué BCV 109	101
Figure 46. LC/MS-BR de la réaction de formation de 101 (M _{cation 101} = 1038,24 g.mol ⁻¹).	106
Figure 47. LC/MS-BR de la réaction de formation du TCV 94 (M ₉₄ = 910,35 g.mol ⁻¹).	107
Figure 48. Réactivité des composés 55 (rond violets), 112 (carrés orange) et 114 (triangles bleus) traités avec 30 % d'acide formique ou 30 % d'acide acétique dans du DCM. Le milieu réactionnel est analysé par LC/MS à t = 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h et 24 h.	113

Figure 49. Modèles m55 , m84 , m114 et m112 des molécules 55 , 84 , 114 et 112 respectivement.	115
Figure 50. Diagramme énergétique du clivage de m55 en présence d'acide formique. Les énergies sont données relativement par rapport aux réactifs séparés (molécule d'eau, acide formique, dpa) en kcal mol ⁻¹ . Extrait de Faucon, A. L et al., <i>Tetrahedron Letters</i> 2022 , 96, 153758. ¹²⁷	117
Figure 51. Structures des conjugués DFO-Ir(III) obtenus à l'heure de rédiger ces conclusions.	122
Figure 52. Structures des conjugués MCV-Ir(III) 117 et BCV-Ir(III) 118	125
Figure 53. Projet d'utilisation du motif Dpaa en tant qu'espaceur hydrolysable dans une stratégie de cheval de Troie. Le sidérophore est coloré en violet, l'antibiotique en orange et le bras-espaceur en bleu.....	129

III. Index des schémas

Schéma 1. Antibiotique 21 et sa prodrogue 20 . ⁶⁷ L'antibiotique est coloré en orange et le groupement protecteur en bleu.	30
Schéma 2. Rétrosynthèse des conjugués 47a,b et 48a,b entre les DFO et un complexe d'Ir(III).	51
Schéma 3. Rétrosynthèse du conjugué 53 entre la DFO et un complexe d'Ir(III).	52
Schéma 4. Synthèse du ligand 51	53
Schéma 5. Synthèse du ligand 55	54
Schéma 6. Structures du dimère 59 et du complexe 60 , et synthèse des complexes d'iridium(III) 61 et 62	55
Schéma 7. Synthèse des conjugués DFO-dpa 49 et 50	59
Schéma 8. Synthèse du conjugué DFO-dpa 54	60
Schéma 9. Synthèse des conjugués 47a et 48a	62
Schéma 10. Synthèse du conjugué 53	63
Schéma 11. Synthèse du MCV 65 . ⁵⁸	71
Schéma 12. Synthèse du BCV 64 . ¹¹²	72
Schéma 13. Synthèse du TCV 63 . ¹¹²	72
Schéma 14. Rétrosynthèse des conjugués 80 et 81 entre les TCV et un complexe d'Ir(III). ...	75
Schéma 15. Rétrosynthèse du ligand 84	76
Schéma 16. Rétrosynthèse des TCV 63b , 63c , 63d entre le châssis triamine 86 et les synthons catéchols 70b , 70c , 70d	76
Schéma 17. Synthèse du synthon 70b	78
Schéma 18. Synthèse du synthon 70d	79
Schéma 19. Synthèse du synthon 70c	80
Schéma 20. Tentatives de synthèse du BCV acétylé 64b	81

Schéma 21. Synthèse de la molécule 77	82
Schéma 22. Synthèse de la molécule 92	83
Schéma 23. Synthèse du châssis tris-carbamate 79	83
Schéma 24. Synthèse du TCV 63d	84
Schéma 25. Synthèse du conjugué TCV-dpa 82d et tentative de déprotection des fonctions catéchols.	85
Schéma 26. Tentative de synthèse du conjugué TCV-dpa 82	87
Schéma 27. Synthèse du ligand 84	88
Schéma 28. Synthèse du conjugué TCV-dpa 83	90
Schéma 29. Réaction de coordination entre un ligand dpa <i>N</i> -substitué et le dimère d'iridium(III) 59	91
Schéma 30. Synthèse du conjugué MCV-dpa 97c	94
Schéma 31. Synthèse du conjugué BCV-dpa 98c	94
Schéma 32. Synthèse du conjugué TCV-dpa 83c	95
Schéma 33. Rétrosynthèse du conjugué 81 entre le TCV 94 et le complexe d'Ir(III) 101	97
Schéma 34. Rétrosynthèse du complexe d'Ir(III) 101	98
Schéma 35. Rétrosynthèse du conjugué 94 entre le TCV 63c et l'azoture 107	99
Schéma 36. Synthèse de l'azoture 107	100
Schéma 37. Synthèse du TCV 106	100
Schéma 38. Synthèse du MCV 108	101
Schéma 39. Synthèse du ligand 110	102
Schéma 40. Tentative de synthèse du complexe d'iridium(III) 102	103
Schéma 41. Voies de synthèse du ligand dpa 105	103
Schéma 42. Synthèse des complexes d'iridium(III) 102 et 101	104
Schéma 43. Voie de synthèse du conjugué TCV-Ir(III) 81	108

Schéma 44. Synthèse des ligands dpa 112 , 114 et 116 et rappel des structures des ligands 55 et 84	111
Schéma 45. Mécanisme proposé de l'hydrolyse de la Dpaa avec catalyse acide pour m114	116
Schéma 46. Synthèse du conjugué 81 entre le vecteur sidérophore 94 et l'ester activé iridié 101 . La fonction amine réactive est colorée en rouge.	126
Schéma 47. Synthèse des conjugués entre les vecteurs sidérophores 119 et 121 , et l'ester activé iridié 101 . La fonction amine réactive est colorée en rouge.	127

IV. Index des tableaux

Tableau 1. Caractérisations macromoléculaires des nanoconjugués 30a-e . ⁸⁸	37
Tableau 2. Différents essais de formation du ligand dpa 110	102
Tableau 3. Tests de clivage dans des conditions acides des composés 55, 84, 112, 114 et 116 . ^a Rendement basé sur l'analyse LC/MS due à la volatilité de l'amine libre 113 pendant le traitement.....	112
Tableau 4. Tests de clivage dans des conditions acides avec différents % de H ₂ O sur le composé 55 . Les entrées correspondent au % de réactif de départ restant. ^a LC/MS.....	113
Tableau 5. Tests de clivage dans des conditions acides avec différents % de H ₂ O sur le composé 112 . Les entrées correspondent au % de réactif de départ restant. ^a LC/MS.....	114
Tableau 6. Souches bactériennes.	135

V. Communications

A. Publications

p. 218

Faucon, A. L.; Hoegy, F.; Werle, N.; Gourlaouen, C.; Mislin, G. L. A. Dipyrldylamine-Acetamide (Dpaa): A Primary Amine Protecting Group Orthogonally Cleavable under Acidic Conditions in the Presence of *t*-Butyloxycarbonyl (Boc) and *t*-Butylester. *Tetrahedron Letters* **2022**, *96*, 153758. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2022.153758>.

p. 222

Moynié, L.; Hoegy, F.; Milenkovic, S.; Munier, M.; Paulen, A.; Gasser, V.; Faucon, A. L.; Zill, N.; Naismith, J. H.; Ceccarelli, M.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Hijacking of the Enterobactin Pathway by a Synthetic Catechol Vector Designed for Oxazolidinone Antibiotic Delivery in *Pseudomonas Aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8* (9), 1894–1904. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00202>.

B. Communications orales

Titre : Vectorization of organometallic complexes using siderophore surrogates: a Trojan horse strategy against Gram-negative pathogenic bacteria

Aline L. Faucon, Julien Renault, Julie Couchot, Françoise Hoegy, Jean-Luc Renaud, Patrick Plésiat, Sylvain Gaillard, Gaëtan L. A. Mislin.

Journées du Campus d'Illkirch, Strasbourg, France, 23-24 mai 2022.

Titre : Vectorization Of Iridium(III) Complexes Using Siderophore Surrogates: A Trojan Horse Strategy Against Gram-Negative Pathogenic Bacteria

Aline L. Faucon, Julien Renault, Julie Couchot, Françoise Hoegy, Jean-Luc Renaud, Patrick Plésiat, Sylvain Gaillard, Gaëtan L. A. Mislin.

Vectorization and Innovation against Pathogens Resistance (VIPR), École d'été 2022 de l'ITI InnoVec, Strasbourg, France, 5-6 septembre 2022.

C. Communications par affiche

Titre : Vectorization Of Iridium(III) Complexes Using Siderophore Surrogates: A Trojan Horse Strategy Against Gram-Negative Pathogenic Bacteria

Aline L. Faucon, Julien Renault, Julie Couchot, Françoise Hoegy, Jean-Luc Renaud, Patrick Plésiat, Sylvain Gaillard, Gaëtan L. A. Mislin.

Vectorization and Innovation against Pathogens Resistance (VIPR), École d'été 2022 de l'ITI InnoVec, Strasbourg, France, 5-6 septembre 2022.

Titre : Vectorization Of Iridium(III) Complexes Using Siderophore Surrogates: A Trojan Horse Strategy Against Gram-Negative Pathogenic Bacteria

Aline L. Faucon, Julien Renault, Julie Couchot, Françoise Hoegy, Jean-Luc Renaud, Patrick Plésiat, Sylvain Gaillard, Gaëtan L. A. Mislin.

EFMC-YMCS (European Federation for Medicinal Chemistry Young Medicinal Chemists' Symposium) 9th edition, Nice, France, 8-9 septembre 2022.



Dipyridylamine-acetamide (Dpaa): A primary amine protecting group orthogonally cleavable under acidic conditions in the presence of *t*-butyloxycarbonyl (Boc) and *t*-butylester

Aline L. Faucon^a, Françoise Hoegy^a, Noémie Werle^a, Christophe Gourlaouen^{b,*}, Gaëtan L.A. Mislin^{a,*}

^a Equipe Métaux et Microorganismes: Biologie, Chimie et Applications (MMBCA), CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, 300 Boulevard Sébastien Brant, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

^b Laboratoire de Chimie Quantique, Institut de Chimie de Strasbourg, UMR7177 CNRS/Université de Strasbourg, 4 rue Blaise Pascal, F-67081, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2022

Revised 21 March 2022

Accepted 25 March 2022

Available online 26 March 2022

Keywords:

2,2'-Dipyridylamine

Amine protecting group

Hydrolysis

t-Butyloxycarbonyl

t-Butylester

ABSTRACT

We show that dipyridylamine-acetamide (Dpaa), can be cleaved under mild acidic conditions (30% formic acid in dichloromethane). The release of the amine function is orthogonal to other acid-labile protecting groups. Calculations suggest that the ease of Dpaa cleavage relies on activation of the carbonyl function by the protonated dipyridylamine nitrogen and activation of a water molecule by a hydrogen-bond network.

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The protection of chemical functions and their selective deprotection are key steps of many organic syntheses described so far [1]. The Boc (*t*-butyloxycarbonyl) group is probably the most frequently used protecting group for the amine function due to its high chemical stability under various reaction conditions, with the notable exception of acidic conditions, leading, in general, to the release of the amine, with volatile by-product emission (e.g., carbon dioxide and isobutylene) [2–5]. These properties have made Boc orthogonal to many other protecting groups with higher stability under harsher acidic conditions [2]. However, chemically stable protective groups orthogonal to Boc under milder acidic conditions have, to date, received less attention. In this context, we report the synthesis and properties of the dipyridylamine-acetamide (Dpaa) moiety and its application as a protecting group of the amine function in the concomitant presence of Boc, as well as another acid-labile protecting group: *t*-butylester.

The discovery of the properties of Dpaa is the fruit of serendipity and related to the synthesis and properties of compounds **9** and **10** (Scheme 1). These compounds were synthesized as ligands for transition metals. To synthesize **9** and **10**, commercial 2,2'-dipyridyl-amine (dpa) **1** was treated with either *t*-butyl-bromoacetate **2**

or *t*-butyl-bromovalerate **3** in a DMSO solution of ground KOH [6,7], leading to the expected *t*-butyl esters **4** and **5** isolated in 88% and 87% yield respectively. The release of the corresponding carboxylic acids **6** and **7** was obtained in respectively 79% and 99% yield using a 20% v/v solution of trifluoroacetic acid (TFA) in dichloromethane (DCM). Both dpa acids **6** and **7** were then further coupled to the terminal amine of 11-azido-3,6,9-trioxundecane-1-amine **8** in the presence of 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino) propyl)carbodiimide (EDCI.HCl) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) in DCM, leading to dpa derivatives **9** and **10** isolated in 77% and 73% yield respectively. The accidental treatment of **9** using a 5% solution of TFA in DCM during 24 h led to the unexpected complete release of amine **8**. In the same conditions, **10** remains stable (Scheme 1, Figs. S1 and S2 see ESI).

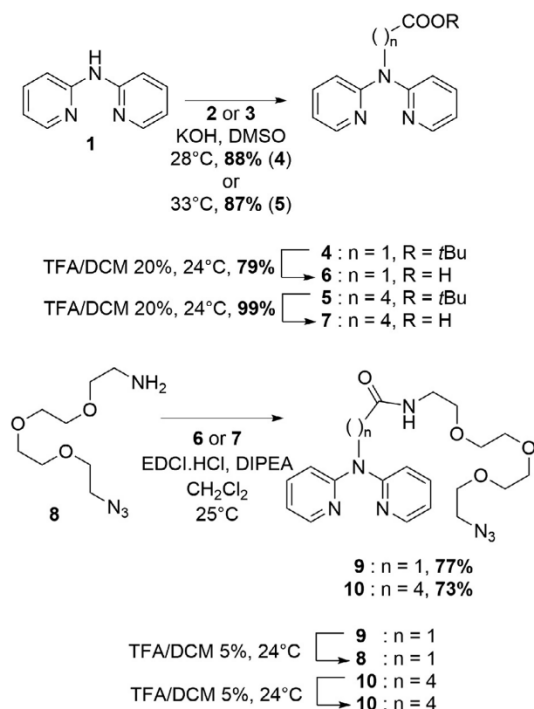
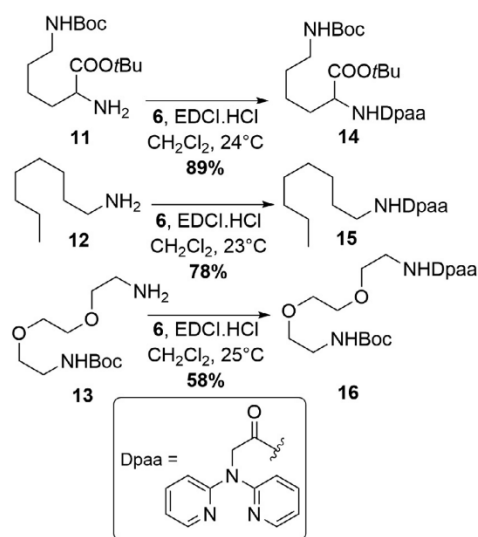
The amide bond is described to be generally cleaved under relatively harsh basic or acidic conditions [2,8]. In this context, the lability of the Dpaa group of **9** under mild acidic conditions was unexpected and was further investigated. This intriguing lability was tested using organic acids with a higher pKa than TFA, such as formic and acetic acids, and several Dpaa-containing substrates. Thus *N*α, *N*ε-di-Boc-L-lysine **11**, octylamine **12**, and *tert*-butyl (2-(2-(2-amino-ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate **13** [9] were reacted with dipyridylamine-acetic acid **6** in the presence of EDCI.HCl and DIPEA in DCM. The corresponding Dpaa derivatives **14**, **15**, and **16** were obtained with yields of 89, 78, and 58%, respectively

* Corresponding authors.

E-mail addresses: gourlaouen@unistra.fr (C. Gourlaouen), mislin@unistra.fr (G.L. A. Mislin).

<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2022.153758>

0040-4039/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Scheme 1. Synthesis and reactivity of dpa-derivatives **9** and **10**.Scheme 2. Synthesis of Dpaa derivatives **14**, **15** and **16**.

(Scheme 2). Attempts to generate a Dpaa reagent ready to use for amine protection (e.g., NHS- or pentafluorophenyl-ester, acyl chloride) have not thus far been successful.

Compounds **14**, **15**, and **16**, as well as compounds **9** and **10**, were then treated with v/v 30% formic or acetic acid in DCM. The products obtained and yields are reported in Table 1. A general procedure for Dpaa removal with formic acid is provided in ESI.

Table 1

Cleavage assays in acidic conditions on compounds **9**, **10**, **14**, **15** and **16**. Product isolated and yield.

Entry	Starting material	Product, yield	
		HCOOH/CH ₂ Cl ₂ , 30%, 20 °C, 24 h	AcOH/CH ₂ Cl ₂ , 30%, 20 °C, 24 h
1	9	8 (95%)	8 (30%)
2	10	10 (92%)	10 (96%)
3	14	11 (91%)	11 (42%)
4	15	12 (100%) ^a	12 (28%) ^a
5	16	13 (93%)	13 (23%)

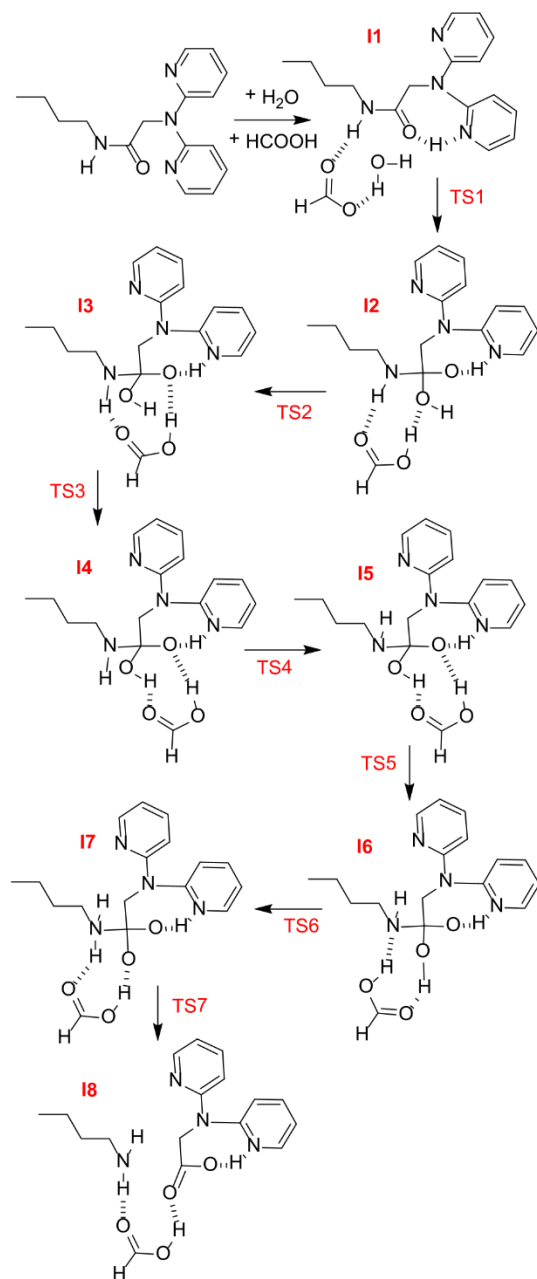
^a Based on LC/MS analysis due to the volatility of free amine **12** during the work-up (Figs. S4 and S5 see ESI).

As expected, valerate-dpa derivative **10** (entry 2, Table 1) was not affected by either formic or acetic acid. However, the Dpaa group of compounds **9**, **14**, **15**, and **16** (entries 1, 3, 4, and 5, Table 1) was cleaved in the presence of both acids. Under these conditions, neither the Boc nor *t*-butylester protecting groups (compounds **14** and **16**) were released (entries 3 and 5, Table 1). We also analysed the evolution of the reaction mixture by LC-MS at 30 min, and 1, 2, 4, 8, and 24 h of reaction for the hydrolysis of compounds **9**, **14**, and **15** in either v/v 30% formic acid in DCM or v/v 30% acetic acid in DCM (Fig. S3 see ESI), and found that formic acid is more efficient than acetic acid for the cleavage on the same Dpaa substrate.

These data suggest the importance of the pKa and acid catalysis in the deprotection process. Moreover, the hydrolysis reactions observed for the Dpaa compounds also appeared to be related to the water content of the commercial organic acids. We thus treated compound **9** with 30% formic or acetic acid in DCM with 0%, 2%, or 10% water (biphasic medium) to evaluate the robustness of Dpaa in the presence of significant amounts of water. The presence of increasing quantities of water in the medium strongly potentiated the Dpaa removal promoted by acetic acid, whereas formic acid was more efficient, regardless of the proportion of water tested (Table S1, Figs. S6–S9 see ESI). Moreover, the Boc and *t*-butyl ester moieties of compound **14** remained unaffected in the presence of 2% water in 30% acetic acid in DCM. In the presence of 2% water in 30% formic acid in DCM, only traces of compounds resulting from cleavage of the Boc and *t*-butyl ester groups of **14** were detected by LC-MS (Table S2 and Figs. S10 and S11, see ESI). The effect of inorganic acid on Dpaa group was also assessed and treatment of **9** by a mixture of HCl_{aq}, 0.02 M in DCM led only to a partial release of the amine **8** (**8** was isolated in 41% yield after 24 h). This acidic condition appeared therefore more efficient than acetic acid but less than formic acid in the Dpaa cleavage.

The lability of Dpaa under mildly acidic conditions was unexpected. We thus performed calculations to investigate the basis of this reactivity. The structure of **9** was simplified by cutting between the two carbons after the first oxygen of the PEG chain. This model possesses five basic poles, and the most stable protonation site is on one of the pyridines, which forms a H-bond with the amide carbonyl. We found no path without using a water molecule for the cleavage. The mechanism was established for three different acids (TFA, formic and acetic acids) and a model of compounds **9** (**m9**), **10** (**m10**), **14** (**m14**), and **15** (**m15**) (Fig. S12, see ESI). We present the general mechanism of the cleavage for the model of **m15** with formic acid and detail the differences for the other derivatives (Scheme 3, Fig. 1).

Initially, the water molecule and the deprotonated acid interact through a H-bond network to form the adduct **11**. The first step is the attack of the water molecule (**TS1**) on the carbonyl carbon, associated with H⁺ transfer towards the formate to form **12**. This is the rate limiting step, associated with a barrier of 30.1 kcal mol^{−1}.



Scheme 3. Mechanism of the acid promoted Dpaa hydrolysis for **m15**.

For cleavage, a second proton must be present on the amide nitrogen. Then, **I2** undergoes two rearrangements of the H-bond pattern (**TS2** and **TS3**). The associated barriers are very low (**Table S3** see ESI). Once in **I4**, the configuration of the amide nitrogen is not suitable to allow H-transfer and an interconversion takes place through **TS4** to form the conformer **I5**. Then the hydrogen of formic acid makes a H-bond with the amide nitrogen to form **I6**. The proton is then transferred to the nitrogen atom (**I7**), followed

by cleavage of the C–N bond (**I8**) (**Scheme 3**). The mechanism for **m14** is the same; the ester function of **m14** slightly increases the barrier. The computed mechanism for a cleavage of **m9** and **m10** is slightly different. The ether function just increases the barrier. The presence of the ether oxygen in the PEG chain generates a H-bond between the OH coming from the water molecule and the ether oxygen, adding several steps of H-bond network rearrangement. We identified two possible paths for **m9** and **m10**. In **m9b** the attack of the water molecule is assisted by the oxygen of the side chain. In **m9a** there is no assistance (**Fig. 1** and **Fig. S13** see ESI). The presence of the H-bond influences the barrier associated to **TS1**. The presence of the H-bond (in **m9b**, **Fig. S13** see ESI) stabilizes **TS1** and lower the energy by 3.5 kcal mol^{−1} and of all subsequent structures (**Table S4** see ESI) compared to the mechanism without H-bond (**m9a**).

In any case, the rate limiting step is **TS1**, the attack of the water molecule on the amide. The associated barrier varies from 26.7 (**m9**) to 32.1 kcal mol^{−1} (**m14**). The presence of the PEG chain appears to slightly lower the barrier. The final dissociation product (**Fig. 1**) is more stable than the initial adduct **I1** for all considered compounds, except for **m10**. The different behaviours are associated with the H-bond network. In the dissociation product, the acid generated by the cleavage of Dpaa forms an internal H-bond between the H of the acid and the nitrogen atom of one of the pyridines. This internal H-bond is stronger in “short” Dpaa (**m9**, **m14** and **m15**) than in “long” Dpaa (**m10**) by 2.0 kcal mol^{−1}, partially explaining the change in the thermodynamic balance of the reaction and the absence of cleavage for **m10**. From a kinetic point of view, the presence of the PEG chain stabilizes **TS1** by a H-bond with the water molecule, lowering the barrier in **m9**. This effect should also be present in **m14**, although in this case, **I1** is much less stable than for the other compound, counterbalancing the presence of the H-bond. Such destabilization of **I1** may be attributed to steric congestion induced by the presence of the ester function close to the targeted amide carbon atom.

We compared the effect of the nature of the acid on the first step of the reaction for **m9**. The first step depends on the formation of a H-bond between the protonated carbonyl of the amide function and one of the Dpaa pyridines. This is directly related to the pKa of the acid as shown in **Table S5** (see ESI). The generated **I1** adduct is more stable with TFA than with formic acid or acetic acid. Then, the following **TS1** associated barrier varies similarly, the lowest being for TFA (fastest reaction) and the highest for acetic acid (no reaction).

The reaction with HCl slightly changes the mechanism, reducing the number of steps associated to the H-bond network rearrangement. Calculation shows that the carbonyl is not needed for the reaction. We retrieve the relationship between pKa and the attack of the water molecule. The rate determining step is not the attack of the water molecule but the transfer of the proton toward the nitrogen. The highest barrier (**I1**–**TS3**) is of 26.0 kcal/mol higher than that with formic acid (**m9a**, **I1**–**TS1**, 17.5 kcal/mol) (**Fig. S14**, see ESI).

In conclusion, we describe dipyriddyamine-acetamide (Dpaa), an organic group offering new alternatives for the protection of the primary amine function. This group is easy to install using classical peptide coupling conditions. Moreover, Dpaa is easy to remove using v/v 30% formic acid in dichloromethane, proving to also be orthogonal to other acid-labile protecting groups, namely Boc or tbutylester. The orthogonality with other amine protecting groups is still under investigation, especially on secondary amines. Such deprotection by intramolecular acid-base catalysis promoted by a dipyriddyamine moiety is thus far unprecedented and could be an inspiration for other applications in organic and medicinal chemistry.

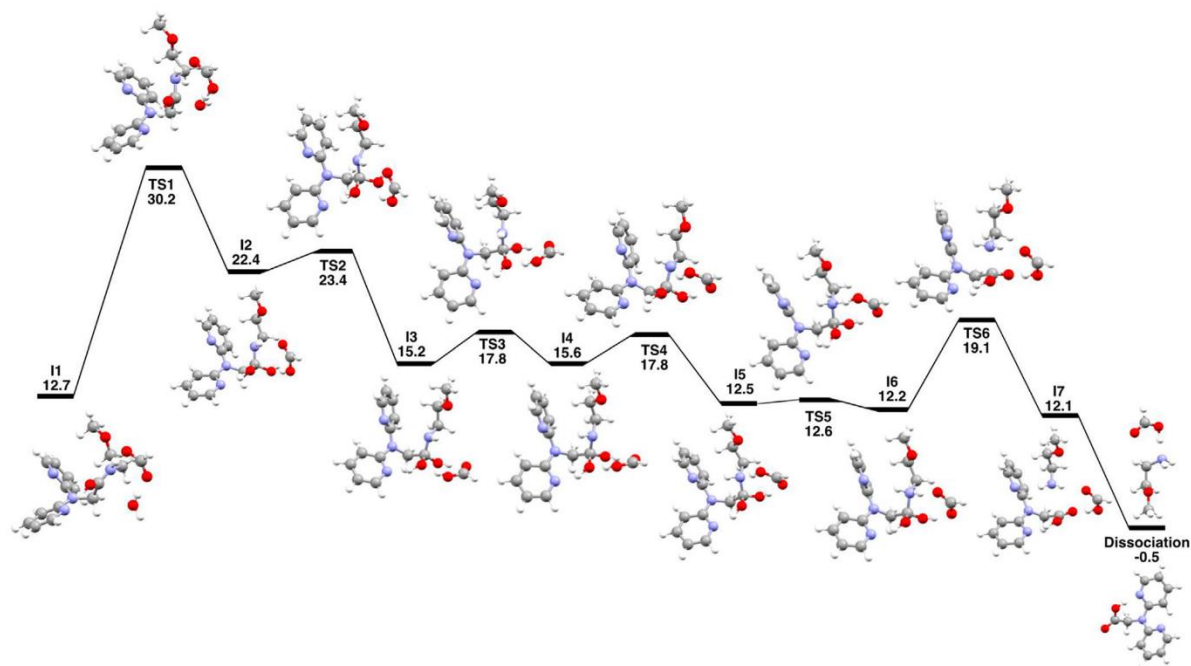


Fig. 1. Mechanism for the cleavage of **m9a**. Energies are given relatively to the separated reactants (water molecule, formic acid and Dpaa) in kcal mol⁻¹.

Authors contributions

ALF discovered the Dpaa reactivity. ALF, FH, and NW performed the synthesis and spectral analysis of the molecules. GLAM conceived the project. CG performed calculations and modelling. GLAM and CG designed and wrote the manuscript. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have approved the final version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in the present article.

Acknowledgments

ALF and GLAM acknowledge the *Agence Nationale pour la Recherche* for a PhD fellowship and financial support for the VECTRUM project (grant ANR-19-CE18-0011-02). NW and GLAM acknowledge the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) InnoVec (Innovative Vectorization of Biomolecules, IdEx, ANR-10-IDEX-0002) and SFRI (ANR-20-SFRI-0012) for the Master fellowship of NW and financial support. GLAM acknowledges the CNRS for its global financial support. CG and GLAM thank the computation center of Strasbourg (HPC) for computational time.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2022.153758>.

References

- [1] K.C. Nicolaou, E.J. Sorensen, *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods*, VCH, Weinheim, 1996.
- [2] T.W. Green, P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, second ed., Wiley, New York, 1999.
- [3] F.C. McKay, N.F. Albertson, *Boc New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis*, J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 4686–4690.
- [4] G.W. Anderson, A.C. McGregor, *t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis*, J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 6180.
- [5] L.A. Carpino, *New amino-protecting groups in organic synthesis*, Acc. Chem. Res. 6 (1973) 191–198.
- [6] A.G. Weidmann, A.C. Komor, J.K. Barton, *Biological effects of simple changes in functionality on rhodium metalloinsertors*, Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci. 371 (2013) 20120117.
- [7] S.I. Kirin, H.P. Yennawar, M.E. Williams, *Synthesis and Characterization of CuII Complexes with Amino Acid Substituted Di(2-pyridyl)amine Ligands*, Eur. J. Inorg. Chem. 2007 (23) (2007) 3686–3694.
- [8] C. O'Connor, *Acidic and basic amide hydrolysis*, Q. Rev. Chem. Soc. 24 (1970) 553–564.
- [9] R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochet, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J.-F. Mueller, M. Barberi-Heyob, *Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy*, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 2799–2808.

Hijacking of the Enterobactin Pathway by a Synthetic Catechol Vector Designed for Oxazolidinone Antibiotic Delivery in *Pseudomonas aeruginosa*

Lucile Moynié, Françoise Hoegy, Stefan Milenkovic, Mathilde Munier, Aurélie Paulen, Véronique Gasser, Aline L. Faucon, Nicolas Zill, James H. Naismith, Matteo Ceccarelli, Isabelle J. Schalk, and Gaëtan L.A. Mislin*



Cite This: *ACS Infect. Dis.* 2022, 8, 1894–1904



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Enterobactin (ENT) is a tris-catechol siderophore used to acquire iron by multiple bacterial species. These ENT-dependent iron uptake systems have often been considered as potential gates in the bacterial envelope through which one can shuttle antibiotics (Trojan horse strategy). In practice, siderophore analogues containing catechol moieties have shown promise as vectors to which antibiotics may be attached. Bis- and tris-catechol vectors (BCVs and TCVs, respectively) were shown using structural biology and molecular modeling to mimic ENT binding to the outer membrane transporter PfeA in *Pseudomonas aeruginosa*. TCV but not BCV appears to cross the outer membrane via PfeA when linked to an antibiotic (linezolid). TCV is therefore a promising vector for Trojan horse strategies against *P. aeruginosa*, confirming the ENT-dependent iron uptake system as a gate to transport antibiotics into *P. aeruginosa* cells.

KEYWORDS: enterobactin, siderophore, linezolid, Trojan horse strategy, iron uptake, *Pseudomonas aeruginosa*



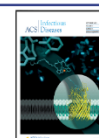
Pathogenic bacteria remain a potent threat to humans despite the discovery of antibiotics which had appeared to promise the end of bacteria as the cause of human diseases. This is because the accumulated use and misuse of antibiotics has led to the evolution of antibiotic-resistant bacterial strains. Continuing development of new antibiotic compounds and antibacterial strategies is crucial to avoid a return to the pre-antibiotic world, and there is particular concern over Gram-negative bacteria due to the paucity of new approaches. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic Gram-negative bacterium responsible for severe pulmonary infections affecting patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary diseases.^{1,2} This pathogen is also common in infections of severe burns and often occurs in clinical HIV and other immunocompromised patients.^{3,4} *P. aeruginosa* is naturally resistant to many classes of antibiotics due to the low permeability of the outer membrane.⁵ The outer membrane in Gram-negative bacteria in general is a selective barrier that restricts the penetration of many xenobiotic compounds, not just antibiotics. The nutrient uptake systems act as selective openings in the bacterial envelope and have long been thought as a possible route for antibiotic uptake. This so-called Trojan horse strategy should ideally utilize an essential and metabolically unsubstitutable nutrient to have a significant

impact on bacterial proliferation. Iron is the best nutrient that meets these criteria.

The concentration of free Fe(III) in normal human fluids is estimated to be around 10^{-24} M, reflecting the inherent lack of bioavailability of the element. This presents a challenge for pathogenic bacteria where an Fe(III) concentration in the micromolar range was estimated to be optimal for bacterial proliferation.^{6,7} To surmount this challenge, bacteria have evolved with efficient uptake systems that are able to give them access to iron from their environment.⁸ One example is the ubiquitous siderophore-dependent iron transport systems. Siderophores are small Fe(III) chelating secondary metabolites secreted by bacteria, with diverse chemical structures and metal-to-ligand stoichiometries.^{9,10} The ferric complexes are next recognized by specific bacterial outer membrane transporters and imported back into the bacteria.^{11,12} The energy necessary for this active uptake through the outer membrane is provided by the TonB machinery and inner membrane proton-

Received: April 17, 2022

Published: July 26, 2022



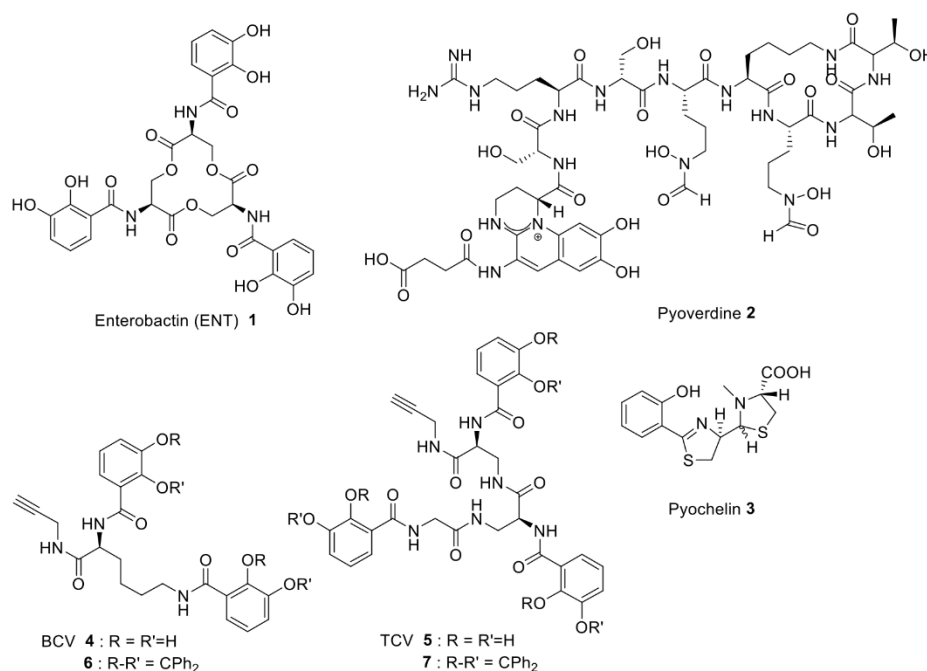


Figure 1. Structures of siderophores ENT 1, pyoverdine 2, and pyochelin 3 and of ENT-inspired vectors BVCV 4 and TCV 5 and their respective protected forms 6 and 7.

motive force.^{11–14} Some siderophores release iron in the bacterial periplasm, whereas other siderophores cross the inner membrane before delivering the iron. In both scenarios, iron release from siderophores involves a reductive process sometimes coupled to a chemical modification or hydrolysis of the siderophore.^{15,16}

Conjugates between siderophores and antibiotics were shown to hijack these uptake systems, leading to the accumulation of the drug in the bacterial inner compartments.¹⁷ In many cases, these sideromycins behave similarly to Trojan horses and have a significantly higher antibacterial activity compared to the unconjugated drug.^{17–31} Catechol siderophores are attractive vectors because of their (1) high affinity for iron(III), (2) occurrence in multiple bacterial species and strains,⁹ and (3) versatile chemical synthesis.^{18,23,32,33} The archetypal catechol siderophore enterobactin (ENT) 1 is a cyclic trimer of *N*-2,3-dihydroxybenzoylserine (DHBS) used by many pathogenic bacteria,³⁴ even those that do not produce this metabolite (iron piracy). For example, *P. aeruginosa*, which produces two siderophores pyoverdine 2 and pyochelin 3 (Figure 1),^{35,36} will operate on ENT secreted by other microorganisms through a specific TonB-dependent outer membrane transporter (TBDT), PfeA.^{37,38} PfeA transports the ferric ENT from the bacterial environment into the periplasm.³⁹ In the absence of PfeA, the TBDT PirA transports ferric ENT complexes across the outer membrane in *P. aeruginosa* cells.⁴⁰ In the bacterial periplasm, the trilactone ring of the ferric ENT is hydrolyzed by the esterase PfeE into the Fe(III)-(DHBS)₃ complex.^{16,41} Iron release from this complex probably requires a reduction step by a yet non-identified reductase. In vitro studies have shown that only the hydrolysis of ENT by PfeE is not enough to dissociate iron from DHBS, but a reduction of iron is also needed.^{16,41}

This has been confirmed in *Escherichia coli* where the dissociation of iron from ENT involves a NADPH-dependent reductase YdjH and the esterase Fes.^{42–44} How iron is then transported further across the inner membrane into the bacterial cytoplasm remains unknown. The expression of PfeA and PfeE is induced by the presence of ferric ENT by a two-component regulation system PfeS/PfeR, where PfeS is the inner membrane sensor and PfeR the transcriptional activator (Figure 2).^{37,45,46} The 3D structure of PfeA has been recently reported.³⁸ The PfeA protein harbors a TBDT fold

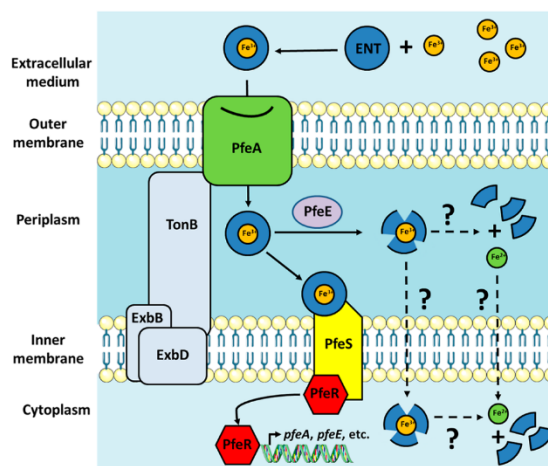


Figure 2. ENT-dependent iron uptake pathway in *P. aeruginosa*. For more details, see Introduction.

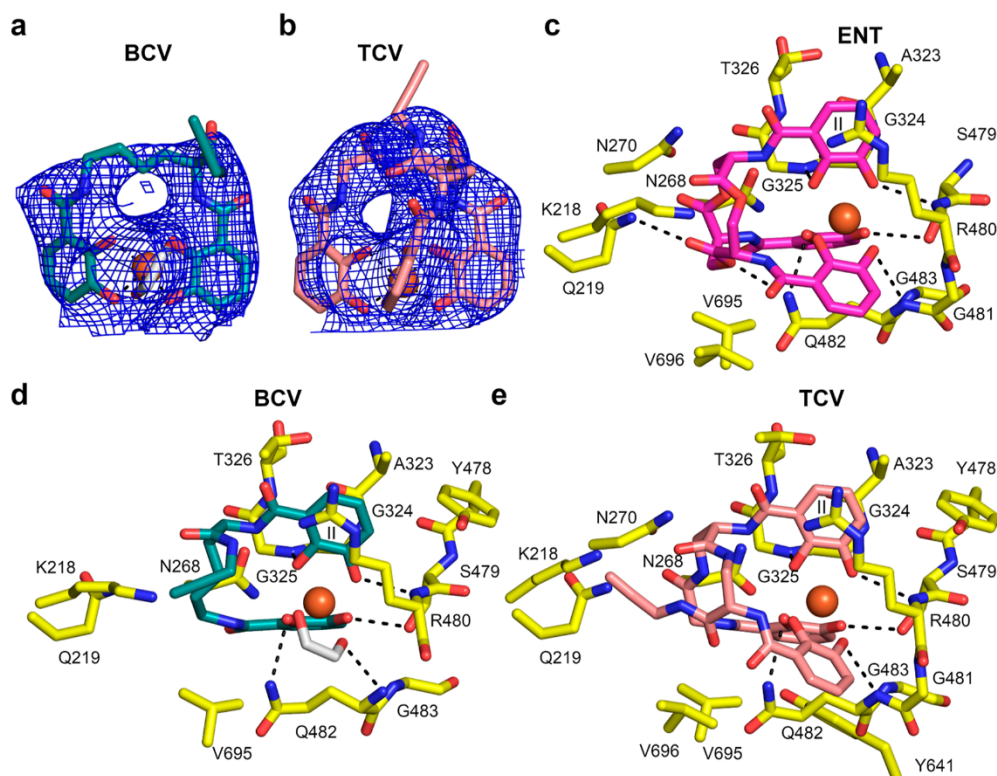


Figure 3. Structure of Fe^{3+} -BCV and Fe^{3+} -TCV in complex with PfeA. (a,b) Final $2F_o - F_c$ electron density map contoured at a 1σ level around Fe^{3+} -BCV and Fe^{3+} -TCV, respectively. Molecules are shown as sticks with carbon atoms colored in deep teal (BCV) or salmon (TCV), nitrogen in dark blue, and oxygen in red. Fe^{3+} is represented as an orange sphere. In the PfeA- Fe^{3+} -BCV complex, one ethylene glycol molecule (white sticks) completes the coordination shell of the iron. (c-e) Comparison of the binding site of Fe^{3+} -ENT (pink, from 6QSE),³⁸ Fe^{3+} -BCV, and Fe^{3+} -TCV, respectively. Residues within 4.0 Å of the siderophores are displayed, and hydrogen bonds are shown as black broken lines.

with a barrel composed of 22 transmembrane β strands obstructed by the N-terminal plug domain. The structure of PfeA loaded with ferric ENT has confirmed a biphasic recognition process, with a first binding site located in the extremity of the extracellular loops and a second deeper in the barrel located on the top of the plug domain.³⁸ The mechanism of translocation of ferric siderophore complexes through TBDT is still unclear, but the current model suggests that the binding of ferric ENT to PfeA triggers the interaction between the PfeA “TonB box” and the inner membrane TonB complex, which provides the energy needed for the conformation change of the plug domain and the translocation of the ferric siderophore complex through the transporter. Such a mechanism has been proposed for other TonB-dependent siderophore transporters.^{47,48}

Catechol vectors linked to oxazolidinones have shown activity against Gram-negative pathogens including *P. aeruginosa*.^{49,50} An improved knowledge of the molecular mechanisms involved in the uptake of catechol type siderophore-antibiotic conjugates across the outer membrane will enhance further development of next-generation conjugates. We report here how PfeA interacts with different synthetic catechol siderophore-antibiotic conjugates, BCV 4 and TCV 5 (bis- and tris catechol vectors, respectively)⁵¹ coupled to linezolid (inactive against *P. aeruginosa* when unconjugated). We have previously shown³⁹ that BCV 4 and TCV 5 both

induce the expression of the proteins of the ENT-dependent iron uptake pathway (PfeA and PfeE) in *P. aeruginosa* cells.^{39,51} Here, BCV- and TCV-conjugates proved to be invaluable molecular tools to investigate, for the first time, the molecular basis of the interaction of siderophore-antibiotic conjugates with the outer membrane transporter.

RESULTS AND DISCUSSION

BCV and TCV Interaction with the PfeA Transporter.

We determined the structure of PfeA- Fe^{3+} -BCV and PfeA- Fe^{3+} -TCV to be of 2.7 and 2.6 Å resolutions, respectively (Figures 3a,b, S1 and S2 and Table S1 in the Supporting Information). Both BCV 4 and TCV 5 bind to the PfeA first binding site located in the extracellular loops reported for ENT (Figures 3c-e, S1 and S2 in the Supporting Information). Two of the catecholate rings occupy the same position as rings 2 and 3 of ENT. Key hydrogen bonds involved in the recognition between the catecholates of ENT and Gly325, Ser479, Arg480, and Gln482 are conserved. In the Fe^{3+} -TCV complex, the third catecholate slightly shifts toward Arg480 (relative to ENT) to accommodate the propargyl arm. The stacking interaction of Arg480 with catecholate 2 is preserved. The two last atoms of the propargyl group were not clearly defined in the electron density map and were assumed to be disordered due to mobility. However, based on the well-ordered portion, the propargyl group points to the surface of

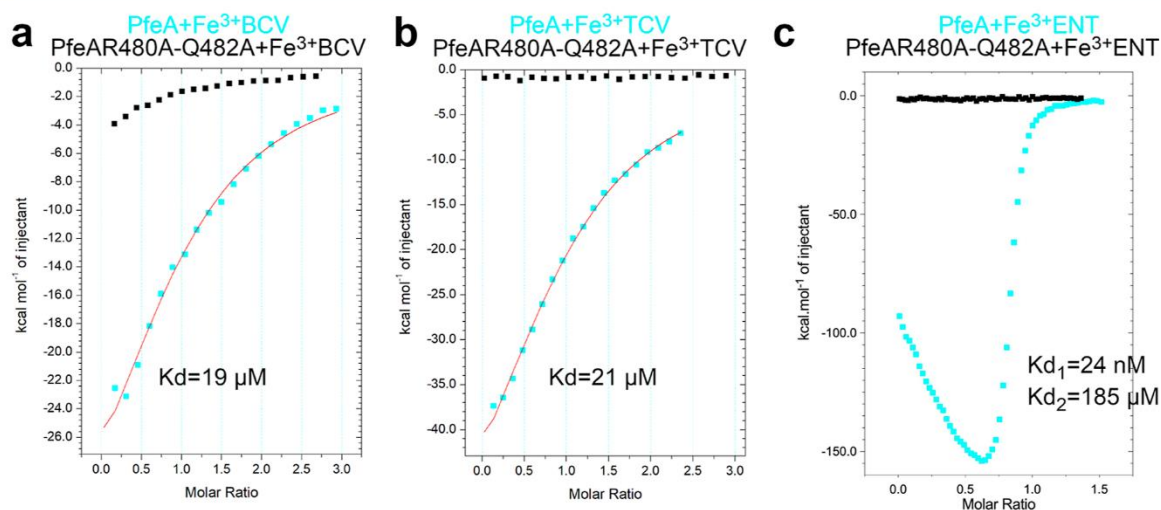


Figure 4. Comparison of the isothermal calorimetry titration of Fe³⁺–BCV (a), Fe³⁺–TCV (b), and Fe³⁺–ENT (c) (shown for comparison but underlying data are previously reported³⁸) with PfeA (cyan) and mutants R480A–Q482A (black) shows that Fe³⁺–BCV and Fe³⁺–TCV bind to PfeA specifically. The heats of dilution measured from injection of the ligands into the buffer were subtracted and TCV and BCV titration have been fitted with a one-site interaction model instead of two binding sites.

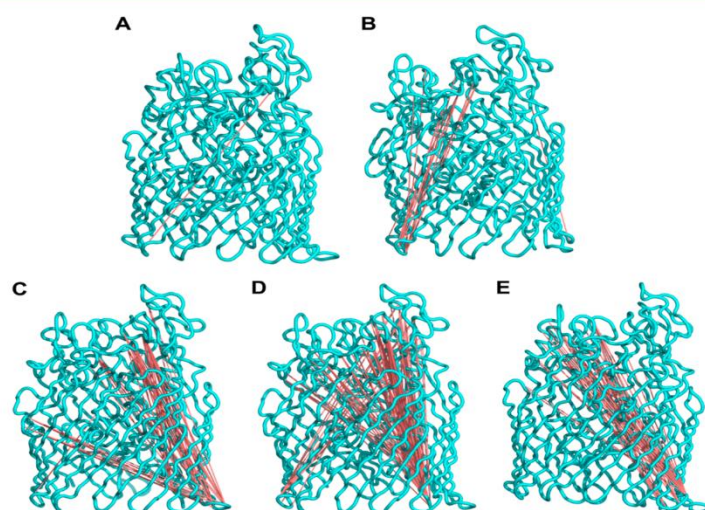


Figure 5. Cα-correlation (>0.5) of distant residue pairs in (A) empty PfeA, (B) PfeA R480A–Q482A, (C) PfeA–Fe³⁺–ENT complex, (D) PfeA–Fe³⁺–BCV complex, and (E) PfeA–Fe³⁺–TCV complex.

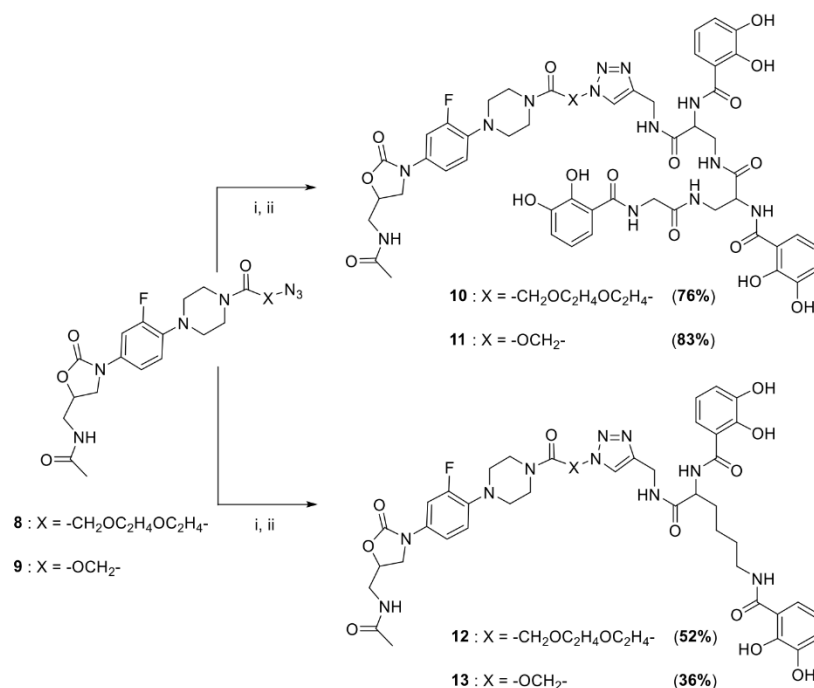
the protein (Lys218 of L2), which is slightly displaced compared to the Fe³⁺–ENT structure (Figure S1 in the Supporting Information). In the Fe³⁺–BCV complex, the iron coordination sphere is completed by interaction with a molecule of ethylene glycol from a buffer (seen in the PfeA–Fe³⁺–azotochelin complex).³⁸ In the BCV ferric complex, the propargyl group also points to Lys218.

A previous thermodynamic analysis (isothermal titration calorimetry, ITC) of ENT titrated into PfeA showed a biphasic heat profile. Coupled to modeling studies, this was interpreted as two cooperating binding sites, one high affinity site (~30 nM) and one lower affinity site (~190 μM), within PfeA.³⁸ Titrations of both Fe³⁺–BCV and Fe³⁺–TCV into PfeA by ITC were best fitted to a single site-binding model with a

much-reduced enthalpy (–50 to 60 kcal mol⁻¹) and lower affinity (19 μM for BCV and 21 μM for TCV) (Figures 4, S6 and S7, and Table S2 in the Supporting Information). ITC was repeated with a PfeA double mutant (R480A–Q482A) and showed no binding for Fe³⁺–TCV and considerably weaker binding for Fe³⁺–BCV. These observations support the structural biology data that both catecholates bind to the first binding site of PfeA, which governs siderophore recognition but does so with a significant reduction in affinity compared to that of the native ligand.

Signaling through the Outer Membrane Promoted by BCVs and TCVs. Molecular dynamics (MD) simulations previously reported³⁸ suggest that upon binding of Fe³⁺–ENT to PfeA, a signal transmits from extracellular loops to the N-

Scheme 1. Synthesis of TCV–Oxazolidinone Conjugates **10** and **11** and of BCV–Oxazolidinone Conjugates **12** and **13**; (i) **6** or **7**, CuSO₄, Sodium Ascorbate, THF/H₂O, 20 °C; (ii) TFA/CH₂Cl₂ 20%, TIPS, EtOH, 20 °C



terminal TonB box located in the periplasm.³⁸ This signal was indicated by means of a $\alpha\alpha$ correlation, a method that allows the detection of correlated concerted motions between distant sites in proteins,^{52,53} which was performed in the same way as described in the Materials and Methods section of this work. The concerted motions between the binding site and the TonB box region were confirmed by a detailed analysis of crystallographic and simulation data where the chain of events leading to signal propagation was identified.³⁸ Here, judged by the $\alpha\alpha$ correlation in the MD structures, both BCV **4** (Figure 5D) and TCV **5** (Figure 5E) mimic the ENT (Figure 5C) signal transmission pathway, in that they showed strongly correlated pairs of residues separated by an average distance of at least 50 Å connected via red lines (Figure 5C). In the empty transporter³⁸ and double mutant, there is no such correlation (Figure 5A,B, respectively).

The correlation between the different structures can be visualized in full detail plotting the $\alpha\alpha$ -correlation among all pairs of residues as a function of their separation (Figure S8A–E in the Supporting Information). The long-distance signaling across different systems manifested in the rise of correlation above 50 Å, a distance comparable to the membrane thickness. Finally, the data are summarized in the form of a cumulative histogram (Figure S8F in the Supporting Information), which allows for the quantification of the effect counting the pairs with a correlation larger than 0.4 and with a separation larger than 50 Å. We see a clear difference between systems with weak signaling (empty and double mutant PfeA) and systems with strong signaling (ferric ENT, ferric BCV **4**, and ferric TCV **5**). Interestingly, the strongest signal is detected in the PfeA–Fe³⁺–TCV **5** complex.

Conjugation of Oxazolidinones with BCVs and TCVs.

Since both **4** and **5** were bound by PfeA and appeared to stimulate TonB signaling, we synthesized BCV– and TCV–oxazolidinone compounds. Protected BCV **6** and TCV **7** were reacted with oxazolidinone azides **8** and **9**⁵⁴ using a copper(I)-catalyzed alkyne–azide cycloaddition.^{55,56} Deprotection of the catechol functions of the resulting compounds in the presence of TFA led to the expected conjugates **10** to **13** isolated in, respectively, 76, 83, 52, and 36% yield over two combined synthetic steps. In conjugates **10** to **13**, vectors and antibiotics are connected through a 1,2,3-triazole moiety (Scheme 1). The linkers were selected since the use of these conjugates as molecular tools requires a stability of the conjugation all along the uptake and signaling process. We also selected these structures to investigate the effect of linkers of different sizes on the recognition of the conjugates and proteins involved in the uptake and signaling system.

Antibacterial Activity of Oxazolidinone Conjugates.

The oxazolidinone antibiotic family, of which linezolid serves as an example,⁵⁷ exerts its effect by binding to the ribosomal 50S subunit. In *S. aureus*, the conjugates **10** (MIC = 64 μM) and **11** (MIC = 16 μM) retained some of the antibiotic activity of linezolid (MIC = 4 μM), showing that (1) the conjugates were transported into the *S. aureus* cytoplasm and (2) oxazolidinone linked to the vector can still bind but with a lower activity than the oxazolidinone alone presumably due to the presence of the siderophore. Conjugates **10** to **13** had no significant antibiotic activity on *P. aeruginosa* (MIC > 64 μM), suggesting that these molecules are unable to interact with their target and/or unable to reach the ribosome in this pathogen (Table S3 in the Supporting Information).

Interaction of Catechol Vector–Oxazolidinone Conjugates with the PfeA Transporter. The X-ray structure between PfeA and the linezolid conjugates **10**, **11**, **12**, and **13** showed the presence in the transporter first binding site of BCV and TCV moieties, but no density was observed for the antibiotic conjugate (Figure S3 in the [Supporting Information](#)). The entire conjugate was observed with good electron density at the crystallographic interface between three molecules of PfeA in the complex structure with **11** (Figure S4 in the [Supporting Information](#)). This finding, consistent with analytical data, suggests that the conjugate was not degraded but rather disordered due to flexibility. Of course, the molecule bound at the crystal interface is a crystallization artifact and does not inform about transport. If the antibiotic is disordered, then the conjugate does not alter the recognition by PfeA (Figures S1, S2, and S5 in the [Supporting Information](#)). In the TCV conjugates **10** and **11**, a water molecule has been identified between two of the catecholates making hydrogen bonds with Arg480 and two amides of the TCV backbone (Figure S5e,f in the [Supporting Information](#)). A close inspection of the TCV complex map suggests that a water molecule may occupy the same position in the structure but was not included as this was ambiguous. The titrations of Fe³⁺–TCV **5** and Fe³⁺–BCV **4** into PfeA by ITC show a much weaker binding compared to that of Fe³⁺–ENT. The addition of the linezolid connected by a short linker (TCV-L6 **11** and BCV-L6 **13**) has little additional effect (38 and 20 μ M, respectively), but a longer linker (TCV-L5 **10** and BCV-L5 **12**) does further reduce binding (100 and 37 μ M) (Figure S6 and Table S2 in the [Supporting Information](#)). MD simulations of PfeA in complex with ferric TCV-L6 **11** suggest that very fast after the initial equilibration, TCV-L6 **11** moves into the second binding site (Figure S9 in the [Supporting Information](#)). This suggests that when merged, the first and the second binding sites could host molecules significantly larger than the ENT if the initial interaction between PfeA and the molecule induces a proper signal. By superimposing the poses of TCV-L6 on PfeA sampled with MD simulations (Figure 6), we see that the linezolid part fluctuates much more than the TCV part. Thus, it can be considered disordered, explaining the difficulties to catch it with X-ray diffraction (XRD).



Figure 6. Dynamics of TCV-L6 **11** interaction with PfeA as extracted from MD simulations. The linezolid part of the molecule is shown in magenta, the TCV part is shown in cyan, and PfeA is given in orange. The linezolid part fluctuates much more than the TCV part and it can be considered disordered, explaining the difficulties to catch it with XRD.

Presence of the TCV–Oxazolidinone Conjugates in the Growth Media of *P. aeruginosa* Efficiently Promotes the Induction of the Expression of PfeA and PfeE.

Crystallography and ITC indicate that conjugates **10** to **13** bind their cognate outer membrane transporter PfeA. However, we were unable to carry out radioactive iron (⁵⁵Fe) uptake assays with sufficiently strong signal-to-noise ratio (SNR) to confirm transport. The SNR arises from precipitation of iron-loaded conjugates. Consequently, we investigated whether conjugates **12** and **13** activate the same two-component system PfeS/PfeR as Fe-ENT.^{45,46} Periplasmic ferric ENT binds to the PfeS sensor at the inner membrane, activating the transcriptional regulator PfeR, which upregulates the expression of the *pfeA* gene.^{45,46} Induction of *pfeA* transcription in the presence of the conjugates implies that the compounds have crossed the bacterial outer membrane since they can interact with PfeS only in the periplasm. Previous studies have shown that BCV **4** and TCV **5** vectors induce the transcription and expression of *pfeA* and *pfeE*.¹⁶ In the present work *pfeA* and *pfeE* transcriptions are stronger with TCV than with BCV, suggesting that either more TCV is transported than BCV or that the PfeS binding site has a preference for the geometry of the Fe³⁺–TCV complex rather than that of the Fe³⁺–BCV complex. RT-qPCR analysis revealed that TCV conjugates **10** and **11** induced *pfeA* and *pfeE* transcription, indicating transport (Figure 7). Thus, the

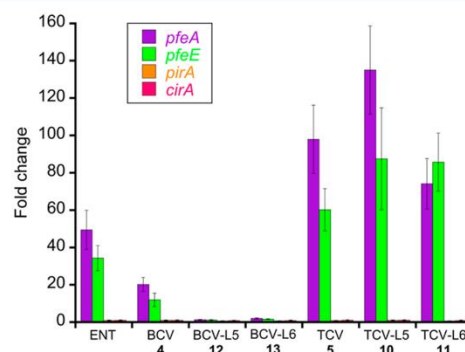


Figure 7. Analysis of changes in the transcription of the TBTD genes. RT-qPCR was performed on RNA from *P. aeruginosa* PAO1 cells grown in CAA medium, with and without supplementation with 10 μ M ENT, BCV, TCV, or conjugates **10** to **13**. The data are normalized relative to the reference gene *uvrD* and are representative of three independent experiments performed in triplicate ($n = 3$). *pfeA* encodes for the TBTD of ENT, *pfeE* for the esterase involved in ENT hydrolyses, and *pirA* and *cirA* for TBTD involved in iron acquisition by catechol siderophores.

payload has not prevented transport into the periplasm or binding to the sensor. The induction of *pfeA* and *pfeE* transcription by TCV **5** and its conjugates **10** and **11** appeared stronger than the induction by ENT itself, a fact we attribute to the non-hydrolyzable TCV **5** scaffold by PfeE.¹⁶ Ferric complexes of TCV **5** and of TCV–oxazolidinone conjugates **10** and **11** accumulate in the bacterial periplasm, leading to a sustained stimulation of the sensor, but they do not cross the inner membrane to inhibit the ribosome. In contrast, although BCV **4** induces the expression of the main proteins of the ENT pathway, it is weaker than the natural siderophore ENT and the TCV.³⁹ The BCV–oxazolidinone conjugates **12** and **13**

show no induction of *pfeA* and *pfeE* and either are not transported or do not bind to PfeS. Neither ENT, TCV, and BCV nor their conjugates induced the expression of CirA and PirA, two TBDTs previously described to be involved in the uptake of catechol siderophore and related conjugates (Figure 7).^{40,58}

CONCLUSIONS

Catechol siderophores are used to access iron by many bacterial species, even those unable to produce them. This predominance appears to be related to the extremely high affinity of catechol siderophores for iron in comparison to other natural chelators, yielding a selective advantage in the competition for iron.⁵⁹ *P. aeruginosa* does not produce ENT but can use it as a siderophore by expressing PfeA, a dedicated outer-membrane transporter and PfeE, a periplasmic esterase involved in the hydrolysis of the trilactone ring to facilitate iron release. These two proteins have their expression induced when *P. aeruginosa* is grown in the presence of ENT. Several research groups developed cargo based on the ENT or closely related molecule (salmochelin) to efficiently deliver antibiotic and other xenobiotics into Gram-negative bacteria.^{18,23,32,33} BCV 4 and TCV 5, alternative ENT vectors used in the present study, are easy to prepare on the gram scale and chemically stable compared to the trilactone core of the native siderophore. Moreover, the terminal alkyne of these vectors is a versatile chemical function to the conjugation of a broad range of linkers and payloads. We report here the synthesis of their conjugates 10 to 13 with an oxazolidinone antibiotic. These conjugates proved to be invaluable molecular tools to investigate, for the first time, the recognition process by the specific outer membrane transporter PfeA and the signaling induced across the transporter to get the uptake of the compounds through the bacterial outer membrane. The BCV vector 4 was shown to mimic ENT in the PfeA first binding site, but the related conjugates failed to activate the two-component system PfeS/PfeR located in the inner membrane and involved in the regulation of *pfeA* transcription. However, TCV 5 as a vector in Trojan horse strategies against *P. aeruginosa* showed more promise; both the ferric-vector and the ferric-oxazolidinone conjugates bind to PfeA at the same site as ferric ENT and both result in the activation of the PfeS/PfeR system, suggesting that they are transported inside the bacterial periplasm. These are the properties required for a siderophore-based Trojan horse approach. Since the TCV derivatives are able to enter the bacterial periplasm, these conjugates are most suited to deliver antibiotics with periplasmic targets or whose linker specifically breaks down in the periplasm (thus allowing further transport into the cytoplasm).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. ENT and linezolid used as references were purchased from Sigma-Aldrich. BCV 4 and TCV 5 and their respective protected versions 6 and 7 were prepared according to previously described protocols.⁵¹ Linezolid-azide derivatives 8 and 9 were synthesized according to previously described protocols.⁴⁹ Conjugates 10 to 13 were prepared according to procedures described in the Supporting Information.

Structural Biology. PfeA was produced and crystallized as previously described.³⁸ Apo crystals have been cross-linked by diffusion of a 25% glutaraldehyde prior to being soaked for a

few hours in the mother liquor containing 5 mM of either Fe^{3+} -BCV, Fe^{3+} -BCV-L5, Fe^{3+} -BCV-L6, Fe^{3+} -TCV, Fe^{3+} -TCV-L5, or Fe^{3+} -TCV-L6. Data were collected at the beamline IO3, IO4, and IO4-1 at Diamond Light Source. Data were processed with XIA2.^{60–64} Structures of the complexes and mutant proteins have been solved using the apo structure.³⁸ Models were adjusted with COOT,⁶⁵ and refinement was carried out using REFMAC in the CCP4 program suite with TLS (Translation/Libration/Screw) parameters.⁶⁶ ProSMART has been used for refinement. Coordinates and topologies of ligands were generated using PRODRG.⁶⁷ Atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (5N3C, 6Z33, 7OBW, 6YY5, 6Z2N, and 6Y47). The quality of the structure was checked with MOLPROBITY.⁶⁸ Figures were drawn using PYMOL.⁶⁹

Isothermal Titration Calorimetry. Affinities of PfeA wild-type and mutants for the Fe^{3+} -siderophore were measured by ITC using an ITC200 instrument (Microcal) at 25 °C. Titrations were performed using $19 \times 2 \mu\text{L}$ injections of $\sim 450 \mu\text{M}$ Fe^{3+} -siderophore into $\sim 45 \mu\text{M}$ protein. The heats of dilution measured from the injection of the ligands into the buffer were subtracted, and titration curves were fitted with a one-site binding model using Origin software with and without the N fixed at 1 and cell adjusted to $\sim 30 \mu\text{M}$. Determination of thermodynamic parameters is not fully accurate because of the errors in the Fe^{3+} complex, active PfeA concentrations, and non-sigmoidal profile. Fe^{3+} -ENT into PfeA titration has been fitted previously with a cooperative two binding site model using AFFINImeter.

Computational Methods. MD simulations were set up such that the PfeA protein was inserted in a phospholipid membrane and fully solvated using the CHARMM-GUI web server.⁷⁰ In particular, the lipid bilayer consists of 233 POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) molecules with *xy* planar dimensions of $100 \text{ \AA} \times 100 \text{ \AA}$. The whole system was then immersed in an explicit water solution adding KCl ions to match a concentration of 0.15 M. MD trajectories were produced by using the ACEMD software,⁷¹ whereas AMBER14 and the LIPID14 were chosen as the force fields,^{72,73} respectively, for the protein and the lipids. For the explicit solvent, we have used the TIP3P model.⁷⁴ Fe^{3+} -ENT complex parameterization was performed using the Metal Center Parameter Builder.⁷⁵ After the initial heating, the system was equilibrated in the NPT ensemble by gradually releasing the constraints that had been initially applied to the protein *Ca/C β* atoms and phosphorus atoms of the lipid head groups. After several stages of equilibration, we performed 300 ns long MD simulations under the NVT ensemble, using as fixed volume the average volume of the last equilibration stage. Pressure and temperature were kept at 1 atm and 310 K using the isotropic Berendsen barostat and the Langevin thermostat, respectively. Electrostatic interactions were computed using the particle mesh Ewald approach, with a cut-off of 9.0 Å for the short-range evaluation in direct space and with frequency set to 2. Non-bonded interactions were addressed with a switch function where the switch-distance was set to 7.5 Å and cut-off at 9.0 Å. In order to accelerate the simulations, mass of hydrogen atoms were scaled to 4 AMU, which allowed an integrating time step of 4 fs. The *Ca* correlation was computed by using the bio3d package within R.⁷⁶ and a statistical mechanical approach invariant to relative atomic motions known as linear mutual information (LMI),⁵³ ranging from 0

(no correlation or random movements) to 1 (complete correlation or concerted movements). The beneficial side of the LMI over the conventional methods for detecting correlation in protein motions is its invariance to a relative orientation of atomic fluctuations. Due to this property, the LMI captures a more detailed picture of how protein motions are coupled. Moreover, the LMI omits undesired non-linear correlations and makes a perfect candidate for considering the protein dynamics. The convergence of the LMI was tested by performing a block analysis where the total trajectory was divided into 50 ns windows, and an LMI matrix was calculated for each window. All figures and plots were produced using the VMD⁷⁷ and R⁷⁸ software.

Quantitative Real-Time PCR Assays. The quantitative real-time PCR assay was carried out as described previously.³⁹ The bacteria were first grown in LB medium overnight at 30 °C and then washed and resuspended in casamino acid medium (CAA), which is an iron-restricted medium, having the following composition: 5 g L⁻¹ low-iron CAA (Difco), 1.46 g L⁻¹ K₂HPO₄·3H₂O, and 0.25 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O and grown overnight at 30 °C. Afterward, the bacteria were diluted to an optical density at 600 nm of 0.1 units and grown for 8 h in fresh CAA medium at 30 °C in the absence or presence of 10 μM ENT, vectors, or conjugates. An aliquot of 2.5 × 10⁸ cells from this culture was added to two volumes of RNA protect Bacteria Reagent (Qiagen), and the same protocol was used for RNA extraction as previously described.⁵⁹ 1 μg of total RNA was then reverse-transcribed with the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit, in accordance with the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The amounts of specific complementary DNAs were assessed using a StepOne Plus instrument (Applied Biosystems) with Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the appropriate primers (see Table S4 in the Supporting Information). Primer efficiencies were determined using serially diluted genomic DNA, and the double ΔC_T method was used to analyze qPCR data.

Evaluation of the Antibiotic Activities. Evaluation of the antibiotic activities of the different compounds was carried out in Mueller–Hinton II Broth (MHB) using the two-fold serial dilution method with an inoculum of 10⁵ bacteria per milliliter. The strains used in this assay are *P. aeruginosa* PAO1 and *S. aureus* HG001. Data are reported as minimum inhibitory concentration (MIC), which corresponds to the lowest concentration of antibiotic that inhibits the visible cell growth after an 18 h culture at 37 °C.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.2c00202>.

General considerations for structural biology, computational, chemical, and microbiology experiments; crystallographic data and refinement statistics; comparison of PfeA–siderophore structures; Ligplot diagrams showing PfeA–siderophore interactions; final 2F_O–F_C electron density map; crystal packing of the PfeA–Fe³⁺–TCV–L6 11 complex; PfeA binding sites of the different complexes; comparison of the isothermal calorimetry titrations of the different complexes; raw data of isothermal calorimetry titrations; thermodynamic parameters of the Fe³⁺ siderophore to PfeA; distribution of the Ca correlation strength; molecular graphics of the

progression of TCV–L6 11 toward the second binding site of PfeA; MICs measured in MHB medium with *P. aeruginosa* PAO1 and *S. aureus* HG001 strains; primers used for RT-qPCR analysis; experimental procedures for the synthesis of compounds 10 to 13; and ¹H, ¹⁹F, and ¹³C NMR and LC/HRMS spectra of compounds 10 to 13 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Gaëtan L.A. Mislin – CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, F-67412 Illkirch, France; Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (IREBS), F-67412 Illkirch, France; orcid.org/0000-0002-5646-3392; Email: mislin@unistra.fr

Authors

Lucile Moynié – The Rosalind Franklin Institute, Oxfordshire OX11 0QS, U.K.

Françoise Hoegy – CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, F-67412 Illkirch, France; Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (IREBS), F-67412 Illkirch, France

Stefan Milenkovic – Department of Physics, University of Cagliari, 09042 Monserrato, Italy

Mathilde Munier – CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, F-67412 Illkirch, France; Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (IREBS), F-67412 Illkirch, France

Aurélien Paulen – CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, F-67412 Illkirch, France; Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (IREBS), F-67412 Illkirch, France

Véronique Gasser – CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, F-67412 Illkirch, France; Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (IREBS), F-67412 Illkirch, France

Aline L. Faucon – CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, F-67412 Illkirch, France; Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (IREBS), F-67412 Illkirch, France

Nicolas Zill – CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, F-67412 Illkirch, France; Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (IREBS), F-67412 Illkirch, France

James H. Naismith – The Rosalind Franklin Institute, Oxfordshire OX11 0QS, U.K.; Division of Structural Biology, Wellcome Trust Centre of Human Genomics, Oxford OX3 7BN, U.K.; orcid.org/0000-0001-6744-5061

Matteo Ceccarelli – Department of Physics, University of Cagliari, 09042 Monserrato, Italy; IOM/CNR, Sezione di Cagliari, University of Cagliari, 09042 Monserrato, Italy; orcid.org/0000-0003-4272-902X

Isabelle J. Schalk – CNRS, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, F-67412 Illkirch, France; Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'Ecole de

Biotechnologie de Strasbourg (IREBS), F-67412 Illkirch, France; orcid.org/0000-0002-8351-1679

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acsinfectdis.2c00202>

Author Contributions

G.L.A.M., L.M., I.J.S., J.H.N., and M.C. wrote the manuscript with inputs from the others. L.M. performed structural biology and biophysic analysis. F.H., N.Z., A.P., M.M., and A.L.F. designed the target molecules, did the chemical experiments, purified, and characterized compounds **10** to **13** and their synthetic precursors. V.G. performed antibiotic assays and qRT-PCR experiments. I.J.S. supervised the microbiology experiments. S.M. designed, performed, and analyzed the MD simulations. I.J.S., G.L.A.M., M.C., and J.H.N. obtained the grants.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

G.L.A.M. and I.J.S. warmly thank Vaincre la Mucoviscidose and the Association Grégory Lemarchal (French associations against cystic fibrosis) for repeated financial support. G.L.A.M. acknowledges the Agence Nationale pour la Recherche (VECTRIUM project, ANR 19-CE18-0011-02) for financial support and for a Ph.D. fellowship attributed to A.L.F. G.L.A.M. and I.J.S. also acknowledge the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) InnoVec (Innovative Vectorization of Biomolecules, IdEx, ANR-10-IDEX-0002) and SFRI (ANR-20-SFRI-0012). A.P. acknowledges the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR) for a PhD fellowship. Authors also acknowledge the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for general financial support. L.M., S.M., M.M., and N.Z. acknowledge the Translocation consortium for their post-doctoral fellowships: the research leading to these results was conducted as part of the Translocation consortium (www.translocation.com) and benefited from support from ND4BB ENABLE. All teams involved in the present work have received support from the Innovative Medicines Joint Undertaking under grant agreement nos 115525 and 115583, resources which are composed of financial contributions from the European Union's seventh framework program (FP7/2007-2013) and EFPIA companies in kind contribution. Finally, the authors acknowledge the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and AstraZeneca for granting the AnBre project (IMMI_2014014). This work is supported by a Wellcome Trust Investigator (100209/Z/12/Z) award. M.C. and S.M. would like to thank Giuliano Mallocci for providing the AMBER topology for the simulated molecules. M.C. thanks computer facilities at CINECA provided by the project "IscrB_PREDICT". Work at the Rosalind Franklin Institute was supported by core funding by EPSRC. We would like to thank the Membrane Protein Laboratory at Diamond Light (funded by Wellcome Trust grant 223727/Z/21/Z) for help and support.

REFERENCES

(1) Murphy, T. F. Editorial Commentary: The Many Faces of *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *47*, 1534–1536.

- (2) Folkesson, A.; Jelsbak, L.; Yang, L.; Johansen, H. K. O.; Ciofu, N.; Høiby, S.; Molin, S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 841–851.
- (3) Schuster, M.; Norris, A. Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in patients with HIV infection. *AIDS* **1994**, *8*, 1437–1442.
- (4) Church, D.; Elsayed, S.; Reid, O.; Winston, B.; Lindsay, R. Burn wound infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 403–434.
- (5) Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656.
- (6) Raymond, K. N.; Carrano, C. J. Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 183–190.
- (7) Braun, V.; Killmann, H. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 104–109.
- (8) Cornelis, P.; Dingemans, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3*, 75.
- (9) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- (10) Moynié, L.; Serra, I.; Scrociapino, M. A.; Oueis, E.; Page, M. G.; Ceccarelli, M.; Naismith, J. H. Preacinetobactin not acinetobactin is essential for iron uptake by the BauA transporter of the pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Elife* **2018**, *7*, No. e42270.
- (11) Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A.; Brillet, K. Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters. *Curr. Top. Membr.* **2012**, *69*, 37–66.
- (12) Klebba, P. E.; Newton, S. M. C.; Six, D. A.; Kumar, A.; Yang, T.; Nairn, B. L.; Munger, C.; Chakravorty, S. Iron Acquisition Systems of Gram-negative Bacterial Pathogens Define TonB-Dependent Pathways to Novel Antibiotics. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 5193–5239.
- (13) Noinaj, N.; Guillier, M.; Barnard, T. J.; Buchanan, S. K. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, *64*, 43–60.
- (14) Celia, H.; Noinaj, N.; Zakharov, S. D.; Bordignon, E.; Botos, I.; Santamaria, M.; Barnard, T. J.; Cramer, W. A.; Lloubes, R.; Buchanan, S. K. Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature* **2016**, *538*, 60–65.
- (15) Schalk, I. J.; Guillon, L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids* **2013**, *44*, 1267–1277.
- (16) Perraud, Q.; Moynié, L.; Gasser, V.; Munier, M.; Godet, J.; Hoegy, F.; Mély, Y.; Mislin, G. L. A.; Naismith, J. H.; Schalk, I. J. A Key Role for the Periplasmic PfeE Esterase in Iron Acquisition via the Siderophore Enterobactin in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 2603–2614.
- (17) Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics* **2014**, *6*, 408–420.
- (18) Neumann, W.; Sassone-Corsi, M.; Raffatellu, M.; Nolan, E. M. Esterase-catalyzed siderophore hydrolysis activates an enterobactin-ciprofloxacin conjugate and confers targeted antibacterial activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5193–5201.
- (19) Fardeau, S.; Dassonville-Klimpt, A.; Audic, N.; Sasaki, A.; Pillon, M.; Baudrin, E.; Mullié, C.; Sonnet, P. Synthesis and antibacterial activity of catecholate-ciprofloxacin conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4049–4060.
- (20) Ji, C.; Miller, P. A.; Miller, M. J. Iron Transport-Mediated Drug Delivery: Practical Syntheses and In Vitro Antibacterial Studies of Tris-Catecholate Siderophore-Aminopenicillin Conjugates Reveals Selectively Potent Antipseudomonal Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9898–9901.
- (21) Möllmann, U.; Heinisch, L.; Bauernfeind, A.; Köhler, T.; Ankel-Fuchs, D. Siderophores as drug delivery agents: application of the "Trojan Horse" strategy. *BioMetals* **2009**, *22*, 615–624.
- (22) Milner, S. J.; Seve, A.; Snelling, A. M.; Thomas, G. H.; Kerr, K. G.; Routledge, A.; Duhme-Klair, A.-K. Staphyloferrin A as side-

rophore-component in fluoroquinolone-based Trojan horse antibiotics. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3461–3468.

(23) Sanderson, T. J.; Black, C. M.; Southwell, J. W.; Wilde, E. J.; Pandey, A.; Herman, R.; Thomas, G. H.; Boros, E.; Duhme-Klair, A.-K.; Routledge, A. A Salmochelin S4-Inspired Ciprofloxacin Trojan Horse Conjugate. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 2532–2541.

(24) Scorciapino, M. A.; Mallocci, G.; Serra, I.; Milenkovic, S.; Moynié, L.; Naismith, J. H.; Desarbre, E.; Page, M. G.; Ceccarelli, M. Complexes formed by the siderophore-based monosulfactam antibiotic BAL30072 and their interaction with the outer membrane receptor PiuA of *P. aeruginosa*. *BioMetals* **2019**, *32*, 155–170.

(25) de Carvalho, C. C. C. R.; Fernandes, P. Siderophores as “Trojan Horses”: tackling multidrug resistance? *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 290.

(26) Kong, H.; Cheng, W.; Wei, H.; Yuan, Y.; Yang, Z.; Zhang, X. An overview of recent progress in siderophore-antibiotic conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111615.

(27) Negash, K. H.; Norris, J. K. S.; Hodgkinson, J. T. Siderophore-Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs? *Molecules* **2019**, *24*, 3314.

(28) Lin, Y. M.; Ghosh, M.; Miller, P. A.; Möllmann, U.; Miller, M. J. Synthetic sideromycins (skepticism and optimism): selective generation of either broad or narrow spectrum Gram-negative antibiotics. *BioMetals* **2019**, *32*, 425–451.

(29) Górka, A.; Sloderbach, A.; Marszall, M. P. Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the “Trojan horse” strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 442–449.

(30) Liu, R.; Miller, P. A.; Miller, M. J. Conjugation of Aztreonam, a Synthetic Monocyclic β -Lactam Antibiotic, to a Siderophore Mimetic Significantly Expands Activity Against Gram-Negative Bacteria. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7*, 2979–2986.

(31) Pinkert, L.; Lai, Y. H.; Peukert, C.; Hotop, S. K.; Karge, B.; Schulze, L. M.; Grunenberg, J.; Brönstrup, M. Antibiotic Conjugates with an Artificial MECAM-Based Siderophore Are Potent Agents against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Pathogens. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 15440–15460.

(32) Zscherp, R.; Coetzee, J.; Vornweg, J.; Grunenberg, J.; Herrmann, J.; Müller, R.; Klahn, P. Biomimetic enterobactin analogue mediates iron-uptake and cargo transport into *E. coli* and *P. aeruginosa*. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 10179–10190.

(33) Klahn, P.; Zscherp, R.; Jimidar, C. C. Advances in the Synthesis of Enterobactin, Artificial Analogues, and Enterobactin-Derived Antimicrobial Drug Conjugates and Imaging Tools for Infection Diagnosis. *Synthesis* **2022**, DOI: 10.1055/a-1783-0751, in press.

(34) Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 3584–3588.

(35) Cox, C. D.; Rinehart, K. L., Jr.; Moore, M. L.; Cook, J. C., Jr. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 4256–4260.

(36) Abdallah, M. A.; Pfestorf, M.; Döring, G. *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine: structure and function. *Antibiot. Chemother.* **1989**, *42*, 8–14.

(37) Dean, C. R.; Poole, K. Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* **1993**, *8*, 1095–1103.

(38) Moynié, L.; Milenkovic, S.; Mislin, G. L. A.; Gasser, V.; Mallocci, G.; Baco, E.; McCaughan, R. P.; Page, M. G. P.; Schalk, I. J.; Ceccarelli, M.; Naismith, J. H. The complex of ferric-enterobactin with its transporter from *Pseudomonas aeruginosa* suggests a two-site model. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3673.

(39) Gasser, V.; Baco, E.; Cunrath, O.; August, P.; Perraud, Q.; Zill, N.; Schleberger, C.; Schmidt, A.; Paulen, A.; Bumann, D.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. Catechol siderophores repress the pyochelin pathway and activate the enterobactin pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: an opportunity for siderophore-antibiotic conjugates development. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 819–832.

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

(41) Gasser, V.; Kuhn, L.; Hubert, T.; Aussel, L.; Hammann, P.; Schalk, I. J. The Esterase PfeE, the Achilles’ Heel in the Battle for Iron between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2814.

(42) Brickman, T. J.; McIntosh, M. A. Overexpression and Purification of Ferric Enterobactin Esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of Enzymatic Hydrolysis of Enterobactin and Its Iron Complex. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12350–12355.

(43) Lin, H.; Fischbach, M. A.; Liu, D. R.; Walsh, C. T. In Vitro Characterization of Salmochelin and Enterobactin Trilactone Hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11075–11084.

(44) Miethke, M.; Hou, J.; Marahiel, M. A. The Siderophore-Interacting Protein YqjH Acts as a Ferric Reductase in Different Iron Assimilation Pathways of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2011**, *50*, 10951–10964.

(45) Dean, C. R.; Neshat, S.; Poole, K. PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5361–5369.

(46) Crosa, J. H. Signal Transduction and Transcriptional and Posttranscriptional Control of Iron-Regulated Genes in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 319–336.

(47) Josts, I.; Veith, K.; Tidow, H. Ternary structure of the outer membrane transporter FoxA with resolved signalling domain provides insights into TonB-mediated siderophore uptake. *Elife* **2019**, *8*, No. e48528.

(48) Grinter, R.; Lithgow, T. The structure of the bacterial iron-catecholate transporter Fiu suggests that it imports substrates via a two-step mechanism. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 19523–19534.

(49) Paulen, A.; Gasser, V.; Hoegy, F.; Perraud, Q.; Pesset, B.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Synthesis and antibiotic activity of oxazolidinone-catechol conjugates against *Pseudomonas aeruginosa*. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 11567–11579.

(50) Liu, R.; Miller, P. A.; Vakulenko, S. B.; Stewart, N. K.; Boggess, W. C.; Miller, M. J. A Synthetic Dual Drug Sideromycin Induces Gram-Negative Bacteria To Commit Suicide with a Gram-Positive Antibiotic. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3845–3854.

(51) Baco, E.; Hoegy, F.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Diphenylbenzo[1,3]dioxole-4-carboxylic acid pentafluorophenyl ester: a convenient catechol precursor in the synthesis of siderophore vectors suitable for antibiotic Trojan horse strategies. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 749–757.

(52) Ichiye, T.; Karplus, M. Collective motions in proteins: A covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. *Proteins* **1991**, *11*, 205–217.

(53) Lange, O. F.; Grubmüller, H. Generalized correlation for biomolecular dynamics. *Proteins* **2006**, *62*, 1053–1061.

(54) Paulen, A.; Hoegy, F.; Roche, B.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. Synthesis of conjugates between oxazolidinone antibiotics and a pyochelin analogue. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4867–4870.

(55) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596–2599.

(56) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

(57) Bozdogan, B.; Appelbaum, P. C. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *23*, 113–119.

(58) Luscher, A.; Moynié, L.; Auguste, P.; Bumann, D.; Mazza, L.; Pletzer, D.; Naismith, J. H.; Köhler, T. TonB-Dependent Receptor Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* for Uptake of Siderophore-Drug Conjugates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, No. e00097.

- (59) Perraud, Q.; Cantero, P.; Roche, B.; Gasser, V.; Normant, V. P.; Kuhn, L.; Hammann, P.; Mislin, G. L. A.; Ehret-Sabatier, L.; Schalk, I. J. Phenotypic adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by hacking siderophores produced by other microorganisms. *Mol. Cell. Proteomics* **2020**, *19*, 589–607.
- (60) Winter, G. xia2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction. *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 186–190.
- (61) Zhang, Z.; Sauter, N. K.; van den Bedem, H.; Snell, G.; Deacon, A. M. Automated diffraction image analysis and spot searching for high-throughput crystal screening. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 112–119.
- (62) Sauter, N. K.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D. Robust indexing for automatic data collection. *J. Appl. Crystallogr.* **2004**, *37*, 399–409.
- (63) Kabsch, W. Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795–800.
- (64) Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D* **2006**, *62*, 72–82.
- (65) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **2004**, *60*, 2126–2132.
- (66) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240–255.
- (67) Schüttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1355–1363.
- (68) Chen, V. B.; Arendall, W. B., 3rd; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21.
- (69) Schrodinger, LLC *The PyMOL Molecular Graphics System*, 2010 version.
- (70) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G. W.; Im, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1859–1865.
- (71) Harvey, M. J.; Giupponi, G.; Fabritiis, G. ACEMD: accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 1632–1639.
- (72) Dickson, C. J.; Madej, B. D.; Skjerve, Å. A.; Betz, R. M.; Teigen, K.; Gould, I. R.; Walker, R. C. Lipid14: the amber lipid force field. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 865–879.
- (73) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696–3713.
- (74) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- (75) Li, P.; Merz, K. M., Jr. MCPB.py: A python based metal center parameter builder. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 599–604.
- (76) Grant, B. J.; Rodrigues, A. P. C.; ElSawy, K. M.; McCammon, J. A.; Caves, L. S. D. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 2695–2696.
- (77) William, H.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.
- (78) R Core Team *Language Definition*; R foundation for statistical computing: Vienna, Austria, 2000.

Recommended by ACS

Uptake Mechanisms and Regulatory Responses to MECAM- and DOTAM-Based Artificial Siderophores and Their Antibiotic Conjugates in *Pseudomonas aeruginosa*

Sarah Fritsch, Isabelle J. Schalk, *et al.*

MAY 02, 2022

ACS INFECTIOUS DISEASES

READ 

Antibiotic Conjugates with an Artificial MECAM-Based Siderophore Are Potent Agents against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Pathogens

Lukas Pinkert, Mark Brönstrup, *et al.*

OCTOBER 08, 2021

JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY

READ 

Variable Susceptibility to Gallium Compounds of Major Cystic Fibrosis Pathogens

Daniela Visaggio, Paolo Visca, *et al.*

DECEMBER 29, 2021

ACS INFECTIOUS DISEASES

READ 

Gallium Porphyrin and Gallium Nitrate Synergistically Inhibit *Mycobacterial* Species by Targeting Different Aspects of Iron/Heme Metabolism

Seoung-ryoung Choi, Prabakaran Narayanasamy, *et al.*

AUGUST 26, 2020

ACS INFECTIOUS DISEASES

READ 

Get More Suggestions >

Vectorisation de complexes d'iridium(III) par des analogues de sidérophores : une stratégie de cheval de Troie utilisant la lumière contre les bactéries pathogènes

Résumé

Face à l'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques, des alternatives thérapeutiques doivent être développées. L'utilisation de la lumière au travers de la thérapie photodynamique n'en est qu'à ses balbutiements dans le domaine du traitement des infections, en particulier avec l'utilisation de photosensibilisateurs organométalliques à base d'Ir(III). Afin de pallier la toxicité de telles molécules pour les cellules de l'hôte, la vectorisation de ces complexes par des sidérophores peut permettre d'augmenter l'efficacité et la sélectivité cellulaire. Les sidérophores sont des chélateurs synthétisés par la bactérie pour subvenir à ses besoins en fer et qui peuvent servir de vecteurs dans le cadre d'une stratégie de type cheval de Troie. Nous avons décrit les premiers conjugués entre un sidérophore, la desferrioxamine, et un complexe d'Ir(III), et montré que ces composés présentaient une activité antibactérienne affirmée, validant ainsi notre approche du point de vue chimique. L'extension de ce concept à des vecteurs catécholés mimant le sidérophore entérobactine a été tentée et la synthèse des conjugués attendus reste à finaliser. Enfin, les aléas expérimentaux ont permis de mettre en évidence une nouvelle réactivité et de procéder à une étude méthodologique sur le mécanisme d'hydrolyse de la fonction dipyridyl-amine acétamide (Dpaa) et l'utilisation de ce motif comme groupe protecteur de la fonction amine.

Mots-clés : Sidérophore, stratégie du Cheval de Troie, thérapie photodynamique antibactérienne, organométallique luminescent, iridium(III), ligand di(2-pyridyl)amine

Abstract

Therapeutic alternatives must be developed to cope with the increasing bacterial resistance to antibiotics. The use of light and photodynamic therapy is still in its infancy in the field of infections treatment, particularly using Ir(III)-based organometallic photosensitizers. In order to limit the toxicity of such molecules for host cells, the vectorization of these complexes by siderophores can increase antibacterial efficacy and cell selectivity. Siderophores are chelators synthesized by the bacteria to meet their iron needs and can serve as vectors in antibiotic Trojan horse strategies. We reported here the first conjugates between a siderophore, the desferrioxamine, and an Ir(III) complex, and showed that these compounds exhibited a potent antibacterial activity, thus validating our approach from a chemical point of view. The extension of this concept to catechol vectors mimicking the siderophore enterobactin has been attempted but the synthesis of the expected conjugates remains to be finalized so far. Finally, experimental serendipity has made it possible to discover a new reactivity and to carry out a methodological study on the mechanism of hydrolysis of the dipyridyl-amine acetamide (Dpaa) function and the use of this pattern as a protective group of the amine function.

Keywords: Siderophore, Trojan horse strategy, antibacterial photodynamic therapy, iridium(III), luminescent organometallic, di(2-pyridyl)amine ligand