

UNIVERSITE DE LILLE 2 – U.F.R. DE PHARMACIE

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Sciences du Médicament

Présentée et soutenue publiquement par

Baptiste Villemagne

Le 28 Septembre 2012

**CONCEPTION, SYNTHÈSE ET DÉVELOPPEMENT D'INHIBITEURS
DU REPRESSEUR TRANSCRIPTIONNEL MYCOBACTERIEN ETHR
SELON UNE APPROCHE PAR FRAGMENTS.
UNE NOUVELLE APPROCHE DANS LA LUTTE CONTRE LA
TUBERCULOSE.**

JURY

Pr. Vincent Lisowski	Université de Montpellier 1	Rapporteur
Pr. Sylvain Routier	Université d'Orléans	Rapporteur
Pr. Pieter Van Der Veken	Université d'Anvers	Examinateur
Dr. Marc Gitzinger	Bioversys	Examinateur
Dr. Marion Flipo	Université de Lille 2	Co-encadrante
Dr. Nicolas Willand	Université de Lille 2	Directeur de thèse

Laboratoire Biostructures et Découverte de Médicament

INSERM U761 - Institut Pasteur de Lille - Université Lille 2 - Université Lille Nord de France

Faculté de Pharmacie de Lille. 3, rue du Professeur Laguesse B.P. 83 59006 LILLE cedex

Remerciements

Messieurs Vincent Lisowski et Sylvain Routier

Je suis très honoré de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant d'être les rapporteurs. Je vous prie de recevoir toute ma gratitude.

Messieurs Pieter Van Der Veken et Marc Gitzinger

Vous avez accepté de juger cette thèse et de faire partie de ce jury. Je vous en suis très reconnaissant.

Monsieur Nicolas Willand et Mademoiselle Marion Flipo

Je vous remercie sincèrement pour votre encadrement pendant ces trois années. Merci d'avoir accepté de juger ces travaux.

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Benoit Deprez de m'avoir accueilli dans son laboratoire il y a trois ans et demi et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je le remercie également pour ses conseils avisés et le regard critique qu'il a pu porter sur ces trois années de travail.

Je remercie mon directeur de thèse, le Dr. Nicolas Willand, de m'avoir permis de travailler sur ce passionnant projet. Merci de m'avoir laissé une certaine liberté dans la réalisation de ce travail, mais d'avoir en même temps été très disponible et présent quand j'en avais besoin. Merci pour ta sympathie, pour tes nombreux conseils et encouragements, j'ai énormément appris pendant ces trois ans, et je t'en suis infiniment reconnaissant.

Je souhaite également remercier Marion Flipo, ma « tutrice pédagogique ». Merci pour ta gentillesse, tes conseils, ta disponibilité, ta patience, merci pour les bonbons, merci pour ton aide et ton soutien lors de l'écriture de ce mémoire. Bref, merci pour tout !

J'ai également une pensée pour toutes les personnes qui ont travaillé avec moi sur le projet EthR et que j'ai vu se succéder dans le bureau : Matthieu Desroses, qui m'a très bien accueilli et intégré lorsque je suis arrivé au laboratoire. Laurence Dutot Agouridas (et sa petite Marie) pour les chansons de Carlos et son aide pour la réalisation de mes posters. Céline Crauste, ma copine Biacore, pour les soirées poisson rouge, le squash, etc...

Je voudrais remercier le Dr. Alain Baulard pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses qualités aussi bien scientifiques que pédagogiques. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi. Je remercie également son thésard Nicolas Blondiaux pour son humour, sa sympathie et pour m'avoir initié au Biacore. Merci aussi à Nathalie Guillet qui m'a enseigné les rudiments de la production et de la purification de protéines. Enfin, merci à tous les gens de l'IBL que j'ai pu rencontrer et qui m'ont toujours accueilli chaleureusement.

Ma gratitude va également à Pierre Marie Danze et Anne-Sophie Drucbert pour leur aide précieuse dans la réalisation des expériences de RPS et pour leur générosité. Merci également à toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer lors de mes semaines chez PIM.

J'adresse tous mes remerciements à Catherine Piveteau, d'une part pour la mesure des paramètres physico-chimiques et ADME des composés, et d'autre part pour son immense disponibilité et sa gentillesse. Rétablis toi vite, et à très bientôt sur une course !

Merci également à Tatiana Vandeputte, Jennifer Matusiak, Nathalie Dekeyne pour leur aide au quotidien, mais surtout un grand merci à Carole Desruelle pour sa gentillesse. J'espère être là quand tu réussiras ton premier semi-marathon.

Merci à « tata » Karen Akin, « tonton » Jacques et petit Paul. J'ai passé d'excellents moments avec vous, et j'espère vous revoir régulièrement.

Je souhaite adresser toute ma reconnaissance au Pr. Hélène Gras, pour ses précieux conseils lors de la préparation de mon oral devant l'école doctorale notamment, au Pr. Jean-Claude Gesquière pour les discussions productives, pour ses conseils, et pour l'aide apportée lors de la rédaction de ce mémoire, et au Pr. André Tartar pour sa célèbre « journée piscine ».

Je veux aussi remercier tous les membres du laboratoire que je n'ai pas encore cités, et dont je garderai un excellent souvenir : Sandra Malaquin, Aurelia Dinut, Nicolas Cousaert, Sébastien Glussock, Antoine Michaut, Christophe Boutillon, Julie Charton, Terence Beghyn, Antoine Henninot, Manuel Lasalle, Gonzague Berthe, Arnaud Bourin, Artur Pinto, Arnaud Mathieu, Maryline Bourotte, Guillaume Laconde, Mouhamad Jida, Olivier Busnel, Gabriel Campagne, Noémie Deguine, Lucie Maingot, Jane Totobenazara, Marion Gauriot, Jamal El Bakali, Rébecca Déprez, Xiaoan Wen, Sylvain Picon, Damien Bosc, Sylvie Leroy, Renelde Leroy, Julie Dumont, Valérie Landry, Florence Leroux, Sandrine Dassonneville, Adrien Herledan, Virginie Pottiez, Cyril Couturier (merci pour les conseils pour le semi !) et tous ceux que j'ai pu oublier.

Merci également à tous les stagiaires, ayant collaboré à ce projet ou non, que j'ai pu croiser : Margaux (René la taupe), Gut, Jonathan, Jérémy (!), Benjamin, Thomas, Pierre-Antoine, Bouchra, Estelle.

J'adresse un remerciement à Nathalie Azaroual, Pierre, Vincent, Jérôme et toutes les personnes du service commun de RMN pour leur sympathie et leur aide précieuse.

Merci à tous les joueurs des équipes de foot d'Eurasanté et de Droit et Santé avec qui j'ai partagé d'excellents moments sur et en dehors des terrains. Un remerciement tout particulier à Saïd, Manu, le grand Nico, Jamal, Richard et surtout Vangelis. Merci pour les nombreux services que tu as pu me rendre au cours de ces trois années.

Je souhaiterais également adresser un remerciement à mes parents qui m'ont toujours soutenu pour que j'en arrive là aujourd'hui. Je remercie également mes grands-parents et toute ma famille pour leur soutien avec une pensée particulière pour tous ceux qui nous ont quittés trop tôt et avec qui j'aurais

également aimé partager ce moment. J'ai également une pensée pour ma petite nièce Nala qui vient de nous rejoindre.

J'associe à ces remerciements tous mes amis. Tout d'abord, les deux autres membres du trio à savoir maître DA et maître lapus. Vient ensuite la « Team bassine » avec Jennifer le coléoptère, Nico l'escargot, Renaud le hedgehogax, Manou le hibou, Florian le hareng, Marion le saumon, Ombeline la langoustine, Jodus l'octopus, Laetitia le piranha, Charline la sardine, Aurélien le pingouin, Johanna le koala et Decax le Maquerax. Merci à eux pour les nombreuses crémaillères et soirées arrosées. Merci à Jean-Jacques Goldman, Shakira, LMFAO, Notre-Dame, Pulco citron et le sirop Teisseire grenadine entre autres d'avoir rythmé ces soirées.

Un remerciement tout particulier à MarionD, pour son soutien important dans les derniers instants de la rédaction.

Merci également à Vdax et sa vieille (est-ce que vous fuuuuuuumez ?) pour ces 6 années de vie commune.

Puis je souhaiterais remercier tous mes amis fontaniod ou assimilés : Antho, Clém, Aymeric, Cathy, Julien, Mick, Ben, Net, Axelle, Matt, c'est toujours un plaisir de vous retrouver quand je rentre à Sainté!

Enfin, j'adresse tous mes remerciements à la « Ploxx Team » : Sonico, Ketchoupi, GeffMed et Icedodo pour les nombreux fails en tout genre et les longues soirées de geeks passées ensemble. Let's Ploxx !

Mes derniers remerciements vont à Sophie pour m'avoir supporté et soutenu pendant ces 3 années. Merci pour ton soutien et pour tout le reste.

Résumé

Avec plus d'un million et demi de morts chaque année, la tuberculose reste aujourd'hui la seconde cause de mortalité liée à un agent infectieux. De plus l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé en 2011 qu'un tiers de la population mondiale était porteuse du bacille *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la maladie. Depuis la fin des années 1980, une recrudescence du nombre de cas de tuberculose est observée à l'échelle mondiale. Cette recrudescence est due à la fois à l'apparition de souches résistantes, mais également à l'épidémie de VIH qui est un facteur de prédisposition au déclenchement de la maladie.

En 2000, le répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR a été identifié comme étant un régulateur clé dans la bioactivation de l'éthionamide (ETH), un antituberculeux utilisé pour le traitement de seconde intention. En 2009, l'inhibition de ce répresseur par le développement de molécules « drug-like » a permis de potentialiser l'activité de l'éthionamide d'un facteur 3 chez la souris infectée et a permis de valider cette cible pour une future approche thérapeutique.

Ce travail repose sur la découverte et l'optimisation de nouveaux inhibiteurs de ce répresseur transcriptionnel mycobactérien, à partir d'une petite molécule appelée « fragment » qui a été co-cristallisée avec la protéine. Par la combinaison d'un criblage *in silico*, d'un criblage *in vitro* des touches identifiées, de l'étude des structures radiocristallographiques des complexes ligands/protéines et de la chimie médicinale, le développement de trois approches complémentaires dites « fragment-growing », « fragment-merging » et « fragment-linking » a permis de développer des composés présentant de fortes activités. Ces résultats permettront très prochainement de sélectionner une nouvelle molécule issue de ce travail dans la perspective de nouveaux essais sur le modèle murin.

MOTS CLÉS : tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, EthR, éthionamide, potentialisation, répresseur transcriptionnel, approche par fragments, criblage *in silico*, conception rationnelle.

Abstract

USE OF FRAGMENT-BASED APPROACHES FOR THE DESIGN, SYNTHESIS AND DEVELOPMENT OF NEW EthR INHIBITORS AS A NEW STRATEGY TO FIGHT TUBERCULOSIS

Tuberculosis (TB) remains the leading cause of death due to a single infective agent with more than 1.5 million people killed each year. In 2011, the world health organization (WHO) estimated that one third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, the pathogen responsible for the disease. This phenomenon may be due to an explosive escalation of TB incidence that occurred in the 1980s due to the emergence of both resistant strains and HIV epidemic.

In 2000, EthR, a mycobacterial transcriptional repressor, was identified as a key modulator of ethionamide (ETH) bioactivation. ETH is one of the main second-line drugs used to treat drug resistant strains.

In 2009, it was shown that co-administration of ETH and drug-like inhibitors of EthR was able to boost ETH activity threefold in a mouse-model of TB-infection, thus validating the target for a new therapeutic strategy.

This work deals with the discovery and optimisation of new EthR inhibitors, based on a small molecule, called a "fragment", co-crystallized with the protein. We combined *in silico* screening, *in vitro* evaluation of the hit compounds, study of co-crystal structures and medicinal chemistry to develop three complementary approaches called "fragment growing", "fragment merging" and "fragment linking" that led to the discovery of very potent inhibitors. Based on these results, we are currently selecting a potential candidate for new *in vivo* experiments.

KEY WORDS: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, EthR, ethionamide, boosting strategy, transcriptional repressor, Fragment-based approaches, *in silico* screening, Structure-based drug design.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
RESUME	9
ABSTRACT.....	10
TABLE DES MATIERES.....	11
GLOSSAIRE	19
INTRODUCTION GENERALE	25
CHAPITRE 1. TUBERCULOSE : DESCRIPTION, TRAITEMENTS ET PERSPECTIVES	29
I DESCRIPTION DE LA PATHOLOGIE	31
I.1 DONNEES CHIFFREES	31
I.1.1 <i>Prévalence, incidence et mortalité</i>	32
I.1.2 <i>Tuberculose résistante</i>	34
I.2 LES MYCOBACTERIES.....	35
I.2.1 <i>Généralités</i>	35
I.2.2 <i>Structure pariétale</i>	36
I.2.2.1 La membrane plasmique.....	37
I.2.2.2 La paroi.....	37
I.2.2.3 La capsule.....	39
I.3 PRIMO-INFECTION ET TRANSMISSION	39
I.3.1 <i>Cas des patients immuno-compétents</i>	39
I.3.2 <i>Cas des patients immunodéprimés</i>	41
I.4 SYMPTOMES	42
I.4.1 <i>Tuberculose pulmonaire</i>	42
I.4.2 <i>Tuberculoses miliaire et extra-pulmonaire</i>	42
I.5 DIAGNOSTIC	42
II ARSENAL THERAPEUTIQUE	44
II.1 VACCINATION PAR LE BACILLE DE CALMETTE ET GUERIN	44
II.2 LES TRAITEMENTS DE PREMIERE INTENTION	45
II.2.1 <i>L'isoniazide</i>	46
II.2.2 <i>La rifampicine</i>	50
II.2.3 <i>Le pyrazinamide</i>	52
II.2.4 <i>L'éthambutol</i>	55
II.2.5 <i>La stréptomycine</i>	56
II.3 LES TRAITEMENTS DE SECONDE INTENTION	57
II.3.1 <i>Groupe I : les composés de première intention</i>	58
II.3.2 <i>Groupe II : les agents injectables</i>	59
II.3.3 <i>Groupe III : les fluoroquinolones</i>	60
II.3.4 <i>Groupe IV : les composés bactériostatiques administrés par voie orale</i>	62
II.3.4.1 L'acide para-aminosalicylique.....	62
II.3.4.2 Cycloserine et Terizidone.....	63
II.3.4.3 Les thioamides.....	64
II.4 LA STRATEGIE DOTS	65

II.5	CONCLUSION : LIMITES DES TRAITEMENTS EXISTANTS ET BESOINS.....	66
III	LES COMPOSES EN DEVELOPPEMENT.....	67
III.1	LES COMPOSES EN PHASE III.....	67
III.2	LES COMPOSES EN PHASE II.....	67
III.2.1	<i>TMC207</i>	67
III.2.2	<i>Les nitroimidazoles</i>	68
III.2.3	<i>SQ109</i>	70
III.2.4	<i>Les oxazolidinones</i>	71
III.3	LES COMPOSES EN PHASE I.....	72
IV	APPROCHES PAR POTENTIALISATION DE MEDICAMENTS EXISTANTS.....	73
IV.1	STRATEGIE.....	73
IV.2	CAS DES B-LACTAMES.....	74
IV.2.1	<i>Généralités</i>	74
IV.2.2	<i>β-lactames et Mycobacterium tuberculosis</i>	75
IV.2.3	<i>Potentialisation des β-lactames chez Mycobacterium tuberculosis</i>	76
IV.3	CAS DE L'ETHIONAMIDE.....	77
IV.3.1	<i>Découverte de l'enzyme EthA</i>	78
IV.3.2	<i>Bioactivation de l'éthionamide</i>	78
IV.3.3	<i>Régulation de l'activité de l'éthionamide</i>	81
IV.3.3.1	Rôle de la protéine EthR.....	81
IV.3.3.2	Structure de la protéine EthR.....	81
IV.3.3.3	Structure dimérique de la protéine EthR.....	82
IV.3.3.3.1	Etude du domaine de régulation.....	83
IV.3.3.3.2	Etude du domaine HTH.....	84
IV.3.3.4	Validation de la protéine EthR comme cible thérapeutique.....	85
IV.4	DEVELOPPEMENT D'INHIBITEURS DE LA PROTEINE ETHR.....	86
IV.4.1	<i>Approche basée sur la structure de ligands connus</i>	86
IV.4.2	<i>Approche basée sur la structure du domaine de régulation</i>	87
IV.4.2.1	Hypothèse de pharmacophore.....	87
IV.4.2.2	Découverte d'un hit et preuve de concept <i>in vivo</i>	87
IV.4.2.3	Optimisation vers un candidat médicament.....	90
V	CONCLUSION.....	92
VI	BIBLIOGRAPHIE.....	94
	CHAPITRE 2. LE CONCEPT DE L'APPROCHE PAR FRAGMENTS.....	105
I	L'APPROCHE PAR FRAGMENTS.....	107
I.1	HISTORIQUE ET APPARITION DU CONCEPT DE FRAGMENTS.....	108
I.2	DEFINITION D'UN FRAGMENT.....	111
I.3	STRATEGIE D'APPROCHE PAR FRAGMENTS VS. CRIBLAGE A HAUT DEBIT.....	112
I.4	NOTION DE LIGAND EFFICIENCY ET AUTRES ECHELLES APPARENTES.....	114
I.5	METHODES D'IDENTIFICATION DE FRAGMENTS.....	118
I.6	CIBLES BIOLOGIQUES.....	119
I.7	STRATEGIES D'OPTIMISATION EN APPROCHE PAR FRAGMENTS.....	121
I.7.1	<i>La stratégie de « fragment growing »</i>	121
I.7.2	<i>La stratégie de « fragment linking »</i>	122

I.7.3	La stratégie de « fragment self-assembly »	123
I.7.4	La stratégie de « fragment merging »	124
I.8	LIMITES DE L'APPROCHE PAR FRAGMENTS ET PERSPECTIVES.....	124
I.9	LES « FRAGMENTS » EN DEVELOPPEMENT CLINIQUE	126
I.9.1	Les médicaments et candidats cliniques issus d'approches par fragments.....	126
I.9.2	Approche par fragments et tuberculose	128
II	BIBLIOGRAPHIE	129
CHAPITRE 3. APPROCHE PAR FRAGMENTS POUR LA DECOUVERTE D'INHIBITEURS D'ETHR		131
I DECOUVERTE D'UN COMPOSE HIT.....		133
I.1	IDENTIFICATION DU COMPOSE 1.....	133
I.2	EVALUATION BIOLOGIQUE DES COMPOSES	134
I.2.1	Le test de TSA (Thermal Shift Assay)	134
I.2.2	Le test de Résonance Plasmonique de Surface (RPS)	135
I.2.3	Le test cellulaire de potentialisation de l'éthionamide.....	137
I.3	EVALUATION DU COMPOSE 1	139
I.4	ETUDE DU MODE DE LIAISON DU COMPOSE 1	139
II	LES STRATEGIES D'OPTIMISATION ENVISAGEES	142
III	BIBLIOGRAPHIE	143
CHAPITRE 4. STRATEGIE DE « FRAGMENT GROWING »		145
I MISE EN PLACE DE LA STRATEGIE «FRAGMENT GROWING ».....		147
I.1	CONCEPTION DE LA CHIMIOTHEQUE VIRTUELLE	147
I.2	RESULTATS DU CRIBLAGE ET CONFIRMATION DES HITS	148
I.3	ETUDE DU COMPOSE 6	151
I.4	STRATEGIE D'OPTIMISATION DU COMPOSE 6	153
II	PREMIERE PHASE D'OPTIMISATION.....	156
II.1	MODIFICATION DU SUBSTITUANT EN POSITION 2 DU CYCLE THIAZOLE	156
II.1.1	Stratégie	156
II.1.2	Synthèses	157
II.1.3	Résultats et discussion.....	161
II.2	MODIFICATION DE LA NATURE DE LA CHAÎNE SULFONAMIDE	163
II.2.1	Stratégie	163
II.2.2	Première modification de la chaîne sulfonamide.....	164
II.2.2.1	Synthèses.....	164
II.2.2.2	Résultats et discussion.....	166
II.2.3	Seconde modification de la chaîne sulfonamide.....	167
II.2.3.1	Synthèses.....	167
II.2.3.2	Résultats et discussion.....	168
II.2.4	Conclusion.....	169
II.3	MODIFICATION DU THIAZOLE ET DU SUBSTITUANT EN POSITION 2	171
II.3.1	Stratégie	171
II.3.2	Modification du substituant en position 2 du cycle thiazole.....	172
II.3.2.1	Synthèses.....	172

II.3.2.2	Résultats et discussion.....	176
II.3.3	<i>Modification du cycle thiazole</i>	177
II.3.3.1	Résultats et discussion.....	180
II.3.4	<i>Conclusion</i>	181
III	SECONDE PHASE D’OPTIMISATION	183
III.1	MODIFICATION DE LA FONCTION SULFONAMIDE	183
III.1.1	<i>Stratégie</i>	183
III.1.2	<i>Synthèses</i>	184
III.1.3	<i>Résultats et discussion</i>	186
III.1.4	<i>Conclusion</i>	187
III.2	COMPARAISON DU COMPOSE 43 AVEC LE PROFIL ENVISAGE	190
III.3	MODIFICATION DU SUBSTITUANT EN POSITION 2 DU CYCLE THIAZOLE	192
III.3.1	<i>Stratégie</i>	192
III.3.2	<i>Synthèses</i>	192
III.3.3	<i>Résultats et discussion</i>	197
III.3.4	<i>Conclusion</i>	202
IV	TROISIEME PHASE D’OPTIMISATION	205
IV.1	MODIFICATION DE LA POSITION 5 DU CYCLE THIAZOLE	205
IV.1.1	<i>Stratégie d’optimisation de la stabilité des analogues thiazole</i>	205
IV.1.2	<i>Synthèses</i>	207
IV.1.3	<i>Résultats et discussion</i>	211
IV.1.4	<i>Conclusion</i>	212
IV.2	MODIFICATION DU CYCLE PHENYLE.....	213
IV.2.1	<i>Stratégie</i>	213
IV.2.2	<i>Synthèses</i>	213
IV.2.3	<i>Résultats et discussion</i>	217
IV.3	MODIFICATION DE L’HETEROCYCLE THIAZOLE	218
IV.3.1	<i>Stratégie</i>	218
IV.3.2	<i>Synthèses</i>	218
IV.3.2.1	Synthèse de l’oxazole	218
IV.3.2.2	Synthèse des deux analogues 1,2,4-oxadiazole	221
IV.3.2.3	Synthèse de l’analogue 1,3,4 oxadiazole.....	223
IV.3.2.4	Synthèse de l’analogue 1,3,4-thiadiazole	223
IV.3.2.5	Synthèse des analogues 1,2,4-thiadiazole.....	225
IV.3.2.6	Synthèse des analogues 1,2,3-triazole	231
IV.3.2.7	Synthèse de l’analogue 1,3,4-triazole.....	233
IV.3.3	<i>Résultats et discussion</i>	235
V	BILAN DE LA STRATEGIE GROWING	241
VI	BIBLIOGRAPHIE	243
CHAPITRE 5. STRATEGIES DE « FRAGMENT MERGING » ET « FRAGMENT LINKING ».....		247
I	INTRODUCTION	249
I.1	STRATEGIE DE « FRAGMENT MERGING ».....	249
I.1.1	<i>Stratégie</i>	249
I.1.2	<i>Synthèses</i>	251

I.1.3	<i>Résultats et discussion</i>	253
I.2	STRATEGIE DE «FRAGMENT LINKING »	255
I.2.1	<i>Stratégie</i>	255
I.2.2	<i>Synthèses</i>	258
I.2.3	<i>Résultats et discussion</i>	263
I.3	CONCLUSION	266
II	BIBLIOGRAPHIE	267
	CONCLUSION GENERALE	269
	PARTIE EXPERIMENTALE	277
I	ANALYSES ET PURIFICATIONS	279
I.1	SYNTHESE MICRO-ONDES	279
I.2	ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	279
I.3	ANALYSES LC-MS	279
I.4	ANALYSES RMN	280
I.5	PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE PREPAQUEE	280
I.6	PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION (HPLC)	280
I.7	POINT DE FUSION	280
II	SYNTHESES	281
III	EVALUATION BIOLOGIQUE DES COMPOSES	353
III.1	LE TEST DE TSA (THERMAL SHIFT ASSAY)	353
III.2	LE TEST DE RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE	353
III.2.1	<i>Principe du test</i>	353
III.2.2	<i>Optimisation de la méthode</i>	358
III.2.3	<i>Mode opératoire</i>	360
III.3	TEST DE POTENTIALISATION DE L'ÉTHIONAMIDE	361
III.4	LA TECHNIQUE BACTEC	362
IV	EVALUATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET ADME DES COMPOSES ...	363
IV.1	MESURE DE LA SOLUBILITE.....	363
IV.2	MESURE DU LOGD	363
IV.3	MESURE DE LA STABILITE MICROSOMALE.....	363
IV.4	MESURE DE LA STABILITE PLASMATIQUE.....	364
V	STRUCTURE DES REACTIFS UTILISES POUR LA CONCEPTION DE LA CHIMIOTHEQUE VIRTUELLE	365

Glossaire

AcOEt :	acétate d'éthyle
ACP :	acyl carrier protein
ADME :	absorption distribution métabolisme excrétion
ADN :	acide désoxyribonucléique
AG :	arabinogalactane
Alr :	alanine racémase
AM :	arabinomannane
ARN :	acide ribonucléique
ATP :	adénosine triphosphate
BAAR :	bacille acido-alcool-résistant
BCG :	bacille de Calmette et Guérin
BEI :	binding efficiency index
BK :	bacille de Koch
BTZ :	benzothiazinone
Cbz :	carbobenzyloxy
CCM :	cromatographie sur couche mince
CMI :	concentration minimale inhibitrice
DAST :	diethylaminosulfur trifluoride
DCE :	dichloroéthane
DCM :	dichlorométhane
Ddl :	D-alanine/D-alanine ligase
DHFR :	dihydrofolate reductase
DIEA :	diisopropyléthylamine
DMAP :	diméthylaminopyridine
DMF :	diméthylformamide
DOTS :	directly observed treatment short-course
DSC :	differential scanning calorimetry
DSF :	differential scanning fluorimetry
EC ₅₀ :	concentration efficace 50
EMB :	éthambutol
ESI-MS :	electrospray ionisation- mass spectroscopy
ETH :	éthionamide
EtOH :	éthanol

FBDD :	fragment-based drug design (ou discovery)
FDA :	food and drug administration
GE :	group efficiency
GFP :	green fluorescent protein
HA :	heavy atom
HBTU :	O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate
HCS :	high content screening
HDNIB :	[hydroxy(2,4-dinitrobenzènesulfonyloxy)iodo]benzene
HOBt :	hydroxybenzotriazole
HPLC :	high performance liquid chromatography
HPOA :	acide pyrazinoïque
HRMAS :	high resolution magic angle spin
HTH :	helix turn helix
HTIB :	[hydroxy(tosyloxy)iodo]-benzène
HTS :	high-throughput screening
IC ₅₀ :	concentration inhibitrice 50
IDR :	intradermoréaction
INH :	isoniazide
ITC :	isothermal titration calorimetry
LAM :	lipoarabinomannane
LE :	ligand efficiency
LELP :	ligand-efficiency-dependent lipophilicity
LLE :	ligand lipophilicity efficiency
LM :	lipomannane
MA :	macrophage alvéolaire
mAGP :	mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane
MDR-TB :	tuberculose multi-drug resistant
MeOH :	méthanol
MW :	molecular weight
NAD:	nicotinamide adenine dinucleotide
NADP :	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NdhII :	NAD déshydrogénase II
NEC :	nouvelle entité chimique
NIAID :	national institute of allergy and infectious diseases
OMS :	organisation mondiale de la santé
PAS :	acide para-aminosalicylique
PDB :	protein data bank

PEI :	per cent efficiency index
PG :	peptidoglycane
PIM :	phosphatidylinositol mannoside
PIT :	primo-infection tuberculeuse
PLP :	protéines liant les pénicilines
POA :	pyrazinoate
PTH :	prothionamide
PZA :	pyrazinamide
PZase :	pyrazinamidase
QSAR :	quantitative structure activity relationship
RFLP :	restriction fragment length polymorphism
RIF :	rifampicine
RMN :	résonance magnétique nucléaire
RPS :	résonance plasmonique de surface
SAR :	structure-activity relationship
SEI :	surface efficiency index
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise
SM :	streptomycine
STD :	saturation transfer difference
$t_{1/2}$:	temps de demi-vie
t_R :	temps de rétention
TA :	température ambiante
TDM :	tréhalose di-mycolate
TEA :	triéthylamine
TES :	triéthylsilane
TFA :	acide trifluoroacétique
THF :	tétrahydrofurane
TMM :	tréhalose mono-mycolate
TMSCl :	chlorure de triméthylsilyle
TSA :	thermal shift assay
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
XDR-TB :	tuberculose extensively drug-resistant
Å :	angström
g :	gramme
mg :	milligramme

mL :	millilitre
μL :	microlitre
s :	seconde
min :	minute
h :	heure
mM :	millimolaire
μM :	micromolaire
nM :	nanomolaire
ppm :	partie par million

<i>Ala</i> :	alanine	<i>Phe</i> :	phénylalanine
<i>Arg</i> :	arginine	<i>Pro</i> :	proline
<i>Asn</i> :	asparagine	<i>Thr</i> :	thréonine
<i>Glu</i> :	acide glutamique	<i>Trp</i> :	tryptophane
<i>Ile</i> :	isoleucine	<i>Tyr</i> :	tyrosine
<i>Leu</i> :	leucine	<i>Val</i> :	valine
<i>Met</i> :	méthionine		

La représentation des structures radiocristallographiques présentes dans ce mémoire a été réalisée grâce au logiciel PyMol (DeLano Scientific LLC). Pour toutes les images, les codes couleurs sont les suivants :

- Pour la protéine : surface des résidus en gris, atomes de carbone en jaune clair, atomes d'oxygène en rouge, atomes d'azote en bleu, atomes de soufre en jaune foncé.
- Pour les ligands : atomes de carbone en vert ou cyan, atomes d'oxygène en rouge, atomes d'azote en bleu, atomes de soufre en jaune foncé, atomes de fluor en bleu pâle, atome d'iode en violet.
- Liaisons hydrogène en pointillés magenta.

Le travail décrit dans cette thèse a été réalisé en collaboration avec plusieurs équipes de biologistes, de cristallographes et d'analystes :

Les lots de protéine His₆-EthR ont été produits par Nathalie Guillet, Nicolas Blondiaux et Eve Willery (Unité INSERM U1019). Le test TSA a été réalisé par Nathalie Guillet. Le test Bactec a été réalisé par Nicolas Blondiaux.

L'évaluation des composés sur *M. tuberculosis* et macrophages infectés a été réalisée par l'équipe de Priscille Brodin (Institut Pasteur de Corée).

Concernant le test Biacore, j'ai réalisé l'optimisation du protocole et le criblage des différents produits, sur un appareil Biacore 3000 mis à notre disposition par la plateforme d'interactions moléculaires du CHR de Lille, dirigée par Pierre-Marie-Danzé.

La cristallogénèse des composés en présence de His₆-EthR ainsi que le retraitement des données radiocristallographiques ont été réalisés par les équipes de Vincent Villeret (IRI, Lille) et Alexandre Wohlkonig (Université libre de Bruxelles).

Le criblage *in silico* a été réalisé par l'équipe de Bruno Villoutreix (UMR-S 973, Université Paris Diderot).

La mesure des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés a été effectuée par la plateforme ADME de l'unité U761 (Florence Leroux, Catherine Piveteau et Sandrine Dassonneville).

Les analyses RMN ont été réalisées au Laboratoire d'Application RMN de l'Université de Lille 2.

Introduction générale

La tuberculose est une maladie infectieuse extrêmement contagieuse, causée essentiellement par le pathogène *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch. L'apparition du vaccin BCG au début du XX^{ème} siècle et des premiers antituberculeux dans les années 1950 ont permis de contenir la propagation de la maladie et même de réduire fortement le nombre de cas jusque dans les années 1980. Par la suite, l'épidémie du virus du SIDA ainsi que l'apparition de formes résistantes ont engendré une nouvelle recrudescence de la maladie. C'est ainsi qu'en 1993 l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déclaré la tuberculose comme problème de santé publique majeur au niveau mondial.

Malgré la mise en place d'une stratégie de lutte mondiale uniformisée (stratégie DOTS), la tuberculose est encore en 2010 la seconde cause de mortalité par maladie infectieuse dans le monde. Elle touche principalement les pays les plus pauvres d'Afrique et d'Asie du Sud-Est, où elle se développe préférentiellement chez les personnes immunodéprimées et notamment chez les populations contaminées par le virus du SIDA.

Les traitements antituberculeux actuels se présentent sous la forme de cocktails de plusieurs antibiotiques. Ces traitements sont très lourds et s'accompagnent généralement de nombreux effets secondaires. Leur mauvaise observance conduit à l'apparition de souches résistantes, qui sont plus difficiles à combattre et en partie responsables de la recrudescence du nombre de nouveaux cas. Bien qu'un nombre important de composés soient actuellement à l'étude en essais cliniques, aucun nouvel antituberculeux n'a fait son apparition sur le marché depuis plus de 40 ans. Il y a donc toujours un réel besoin en alternatives thérapeutiques nouvelles afin de lutter contre ce fléau.

La stratégie originale développée conjointement par les équipes des unités INSERM U761 et U1019, dans le cadre du projet «TB Drug Boost», consiste en la mise au point de composés permettant de potentialiser l'activité d'antituberculeux déjà existants.

L'éthionamide, un antituberculeux utilisé depuis plus de 40 ans, est une prodrogue dont la bioactivation est réalisée par la monooxygénase bactérienne EthA. La production de cette enzyme est régulée par le répresseur transcriptionnel EthR, limitant ainsi la bioactivation et donc l'activité de l'éthionamide.

Il a tout d'abord été montré que des souches de *Mycobacterium tuberculosis* EthR KO présentaient une sensibilité accrue à l'éthionamide. Par la suite, l'obtention de la structure cristallographique d'EthR a permis de concevoir des inhibiteurs puissants de ce répresseur transcriptionnel. La coadministration d'un inhibiteur d'EthR et d'éthionamide à des souris infectées par *Mycobacterium tuberculosis* a permis de potentialiser l'activité de l'éthionamide d'un facteur trois *in vivo*, validant ainsi EthR comme une cible thérapeutique d'intérêt dans la lutte contre la tuberculose.

L'objectif de ce travail a été de développer une nouvelle famille d'inhibiteurs de la protéine EthR possédant un profil de risque différent des inhibiteurs connus actuellement. Pour cela, une stratégie originale basée sur une approche par fragments a été mise en place.

A partir d'un petit fragment identifié lors de travaux de « click-chemistry *in situ* » sur la protéine, et possédant une faible activité, trois approches d'optimisation ont été développées.

Tout d'abord, une stratégie dite de « fragment growing » basée sur la conception et le criblage *in silico* d'une chimiothèque d'analogues du fragment a été mise en place. Cela a conduit à l'identification d'un nouveau composé hit. L'optimisation rationnelle de ce composé hit a été guidée par le mode de liaison des analogues avec EthR. Tout au long de l'optimisation, les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques des meilleurs inhibiteurs ont été évalués.

En parallèle, une stratégie dite de « fragment merging » reposant sur la connexion d'un ligand connu de la protéine et d'un second fragment a été développée. Enfin, une troisième stratégie dite de « fragment linking » qui consiste à relier ensemble deux fragments se liant dans des poches de liaison voisines, a également été utilisée.

Les molécules issues de ces différentes stratégies ont été comparées entre elles afin de déterminer quelle approche a permis de conduire aux inhibiteurs présentant le meilleur profil recherché.

Chapitre 1. Tuberculose : Description, Traitements et Perspectives

I Description de la pathologie ^{1,2,3}

La tuberculose est une maladie infectieuse transmissible, liée à la présence d'une mycobactérie du « complexe *tuberculosis* » dans l'organisme. Le complexe *tuberculosis* est constitué de trois espèces du genre *Mycobacterium* :

- *Mycobacterium tuberculosis*, qui a une propagation strictement humaine et qui est responsable de la très grande majorité des cas de tuberculose recensés.

- *Mycobacterium bovis*, qui est l'agent de la tuberculose bovine, mais qui peut être également pathogène pour l'homme. La transmission de l'animal à l'homme peut se faire par voie aérienne ou par contamination du lait par exemple.

- *Mycobacterium africanum*, qui est présent essentiellement en Afrique de l'Ouest. Sa propagation se limite également à l'homme et est responsable du quart des cas de tuberculose dans certains pays africains.

I.1 Données chiffrées

Consomption, phtisie, scrofule, maladie de Pott ou peste blanche sont autant de noms qui ont été utilisés pour nommer cette maladie connue depuis des siècles. Le terme de « tuberculose » ne sera prononcé qu'à partir de 1834 par l'allemand Johann Lucas Schönlein, qui s'inspirera de l'appellation de « tubercule » donnée aux nodules pulmonaires présents lors de la pathologie.

De nombreuses vagues de contamination ont été recensées dans l'histoire, et ce n'est qu'à partir du 20^{ème} siècle avec l'utilisation du vaccin de Calmette et Guérin, la découverte des premiers antituberculeux et le développement de conditions de vies plus salubres que la maladie va commencer à reculer dans les pays « développés ». Cette amélioration va se poursuivre jusque dans les années 1980 où la maladie est quasiment éradiquée notamment en Europe. A partir de cette date, le nombre de cas de tuberculose recensés va de nouveau augmenter, du fait de la multiplication des formes résistantes de la maladie et du développement du virus du SIDA.

¹ F. Denis, *et al.*, 2004.

² P. Marquette, *et al.*, 2004.

³ L. Prescott, *et al.*, 2007.

On distingue quatre types de souches résistantes :

- Les souches résistantes à un seul antibiotique provoquant une tuberculose mono-résistante.
- Les souches résistantes à plusieurs antibiotiques, mais pas à la combinaison Isoniazide/Rifampicine. Ces souches sont responsables des cas de tuberculose poly-résistante.
- Les souches résistantes au moins à la combinaison Isoniazide/Rifampicine. Ces souches sont responsables des cas de tuberculose MDR (pour multi-drug resistant).
- Les souches MDR également résistantes à tous les composés de type fluoroquinolone et au moins à un des trois composés injectables (Amikacine, Kanamycine, Capreomycine). Ces souches sont responsables des cas de tuberculose XDR-TB (pour extensively drug resistant).

1.1.1 Prévalence, incidence et mortalité

Aujourd'hui, l'OMS estime qu'un tiers de la population mondiale est infectée par la tuberculose. La prévalence était estimée à 12 millions en 2010,⁴ soit environ 178 cas pour 100 000 habitants, ce qui correspond à une augmentation par rapport aux 11,1 millions (165/100 000) de cas prévalents en 2008.⁵

Cependant, l'incidence de la tuberculose est en baisse puisque l'OMS estimait à 8,8 millions le nombre de nouveaux cas de tuberculose en 2010 contre 9,4 millions en 2009. Le taux d'incidence (pour 100 000 habitants) a également chuté de 1,3% en moyenne chaque année depuis 2002. Ces chiffres encourageants sont le fruit des nombreuses mesures mises en place par l'OMS.

⁴ World Health Organization, **2011**.

⁵ World Health Organization, **2010**.

Sur les nouveaux cas recensés en 2010, la plupart l'ont été en Asie (59%) et en Afrique (26%). La répartition des nouveaux cas de tuberculose recensés en 2010 est représentée en Figure 1.

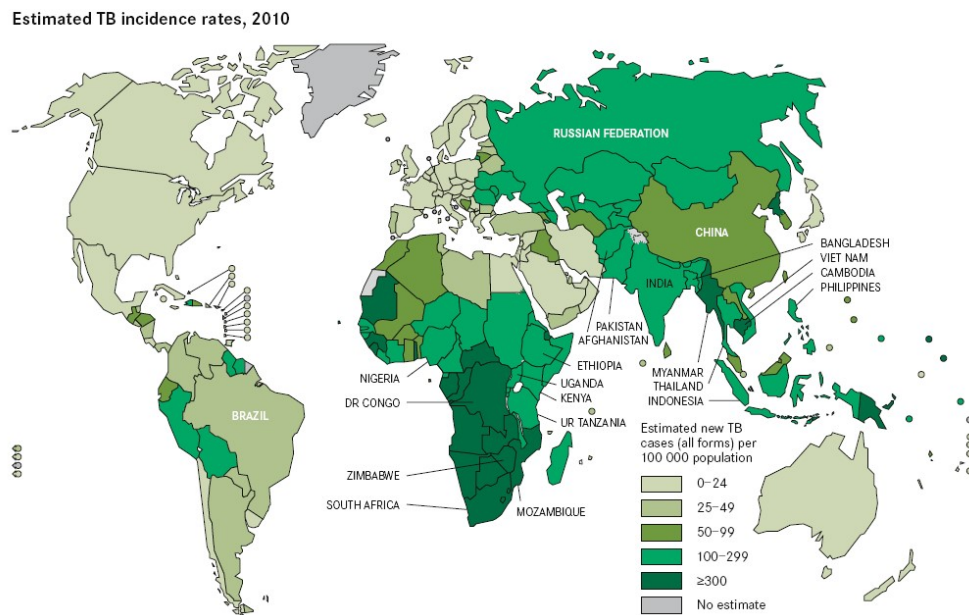


Figure 1 : Estimation des nouveaux cas de tuberculose en 2010 selon l'OMS, répartition par pays.

Comme nous l'avons déjà mentionné, le virus du SIDA est un facteur important dans la transmission et le développement de la tuberculose. Ainsi, l'OMS suit avec attention l'évolution de la coinfection par ces deux maladies et tente de mettre en place de nombreuses mesures afin de lutter contre ce tandem meurtrier.

Sur les 8,8 millions de nouveaux cas incidents recensés en 2010, l'OMS estime entre 12 et 14% (1,0-1,2 millions) le nombre de séropositifs, soit une légère baisse par rapport à 2008 (13-16%). Parmi ces malades infectés par le virus du SIDA, 82% se trouvent en Afrique et 13% en Asie du Sud-Est. La Figure 2 présente le pourcentage de personnes séropositives dans les cas de tuberculose enregistrés en 2010.

L'OMS a établi depuis quelques années une liste des 22 pays les plus sévèrement touchés par la tuberculose, et qui font l'objet d'une attention toute particulière. En 2010, ces 22 pays principalement situés en Afrique et Asie du Sud-Est, qui représentent environ 63% de la population mondiale, regroupaient 78% des morts et 82% des nouveaux cas déclarés de tuberculose.

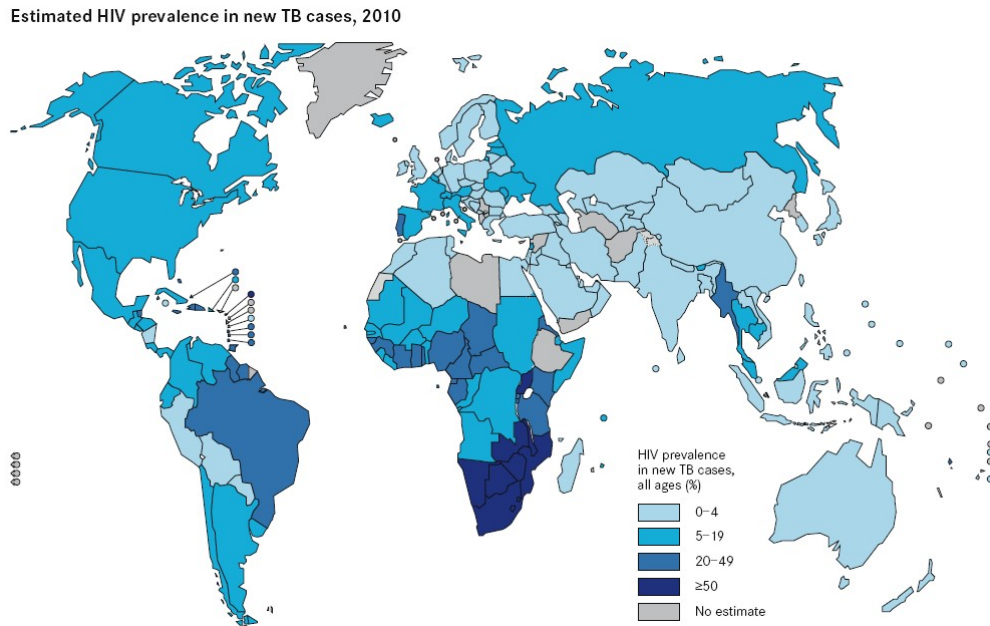


Figure 2 : Pourcentage du nombre de nouveaux cas de tuberculose porteurs du virus du SIDA en 2010 selon l’OMS.

En 2010, 1,42 millions de personnes sont mortes de la tuberculose, dont 320 000 patients séropositifs. Ce chiffre est significativement plus faible que pour l’année 2008 où 1,3 million de morts chez les patients séronégatifs, auxquels s’ajoutaient 400 000 morts de tuberculose chez les patients séropositifs, étaient recensés. La tuberculose reste néanmoins la première cause de mortalité chez les personnes infectées par le VIH.

Enfin, il faut noter que la tuberculose touche principalement les adultes (les 15-59 ans représentent en effet plus de 2/3 des cas de tuberculose), ce qui a comme conséquence qu’en 2009, 9,7 millions d’enfants étaient orphelins de parents décédés de la tuberculose.

1.1.2 Tuberculose résistante

En 2007, 27 pays (dont 15 en Europe) concentraient 85% des formes de tuberculose MDR. En Azerbaïdjan notamment, la proportion de ces cas de tuberculose MDR était de 22,3% sur l’ensemble des cas de tuberculose déclarés en 2007.

En Novembre 2009, 57 pays avaient déjà rapporté un cas de tuberculose XDR. Ce chiffre s’élevait à 77 fin 2011.

Enfin, en 2010, l’OMS estimait à 650 000 le nombre de cas de MDR-TB sur les 12 millions de cas de tuberculose.⁶

⁶ World Health Organization, 2010.

En conclusion, si les chiffres globaux de la tuberculose sont plutôt en nette amélioration ces dernières années, les chiffres concernant les formes résistantes (et donc difficilement curables) de la maladie sont inquiétant. Il y a donc un réel besoin en nouveaux traitements afin de combattre ces formes résistantes.

I.2 Les Mycobactéries

I.2.1 Généralités

Le genre *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae* dans le sous ordre des *Corynebacterinae* dans l'ordre des Actinomycétales. Les mycobactéries se présentent comme des bacilles droits ou légèrement incurvés de 2 à 5µm de long sur 0.2 à 0.5µm de large, non mobiles et non sporulants. Ce sont des protozoaires aérobies qui répondent négativement au test de coloration de Gram. Néanmoins, elles peuvent être considérées comme des bactéries Gram-positives à cause de la séquence de leur ARN 16S ribosomal, qui est utilisée pour la classification phylogénétique et qui se rapproche de celui des autres bactéries à Gram positif. Le débat quant à la classification de *M. tuberculosis* est actuellement relancé depuis le séquençage complet de son génome.⁷

On dénombre plus de 90 espèces du genre *Mycobacterium*. La définition du genre *Mycobacterium* repose essentiellement sur trois caractéristiques :

- L'acido-alcool-résistance des bacilles, qui permet leur identification par la coloration de Ziehl-Neelsen.
- Un pourcentage élevé en Guanine-Cytosine dans l'ADN (entre 62-70%, 65,6% pour *M. tuberculosis*).
- La présence d'acides mycoliques de structure particulière au sein de la paroi. Les acides mycoliques ne sont pas spécifiques des mycobactéries. En effet, les familles proches de la famille des *Mycobacteriaceae* possèdent aussi ces acides gras α -ramifiés β -hydroxylés. Cependant, les acides mycoliques mycobactériens présentent une structure fine singulière. Ils possèdent un poids moléculaire élevé (de 60 à 90 atomes de carbone) et sont les seuls à porter des fonctions oxygénées supplémentaires, on parle alors d'acide méthoxy-mycolique, céto-mycolique, etc.

⁷ L. M. Fu, *et al.*, *Tuberculosis* **2002**, 82 (2), 85-90.

Les mycobactéries sont des micro-organismes à croissance lente avec un temps de réplication compris entre 16 et 24 heures selon les espèces.

Enfin, les mycobactéries se distinguent par leur enveloppe cellulaire, beaucoup plus épaisse et beaucoup plus complexe que celle des autres bactéries. Cette enveloppe particulière leur confère notamment leur grande résistance à de nombreux traitements antibiotiques et leur permet de survivre à l'intérieur des cellules immunitaires après phagocytose.

Chez *M. tuberculosis*, H37Rv est la souche de référence.

I.2.2 Structure pariétale

L'enveloppe mycobactérienne peut être schématiquement divisée en trois parties (Figure 3) :

- La membrane cytoplasmique
- La paroi cellulaire, composée d'un complexe de peptidoglycane, d'arabinogalactane et d'acides mycoliques liés de façon covalente.
- La capsule, composée de lipides, de protéines, de peptides et de chaînes glycaniques.

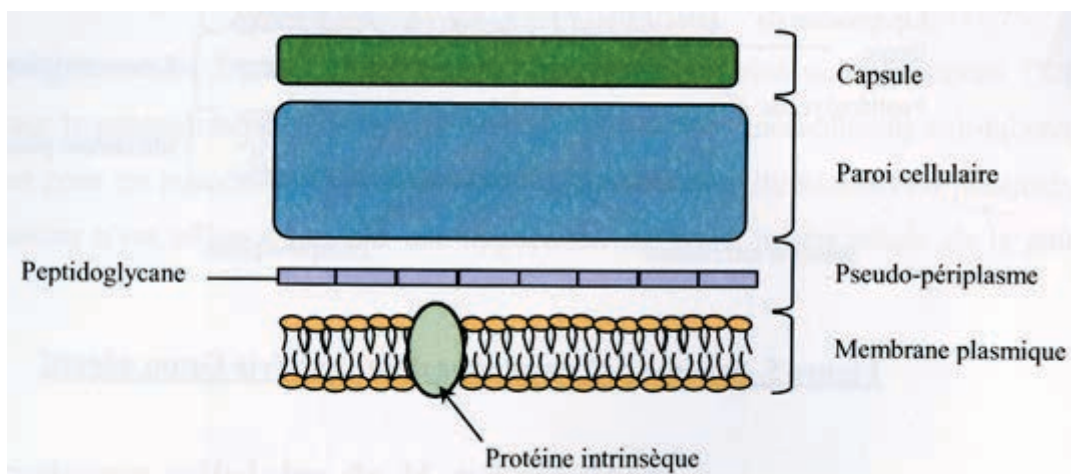


Figure 3 : Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne.

I.2.2.1 La membrane plasmique

Comme pour les autres bactéries, la membrane plasmique mycobactérienne consiste en une bicouche lipidique composée de lipides polaires et de phospholipides associés à des protéines. Les lipides présents dans la membrane contiennent des acides gras de longueur inférieure à 20 atomes de carbone tels que l'acide palmitique (C_{16:0}), l'acide oléique (C_{18:1}) et l'acide tuberculostéarique (ou acide 10-méthyl-octadécanoïque).

La phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol et le phosphatidylinositol mannoside (PIM) sont les principaux phospholipides présents dans la membrane cytoplasmique.

I.2.2.2 La paroi

La paroi cellulaire est constituée de trois composants majeurs (Figure 4)⁸ :

- Le mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (mAGP) composé d'acides mycoliques qui sont estérifiés sur l'arabinogalactane (AG), qui est lui-même en interaction avec le peptidoglycane (PG). L'AG est le constituant principal de la paroi (35% du poids sec). Le PG chez *M. tuberculosis* possède une structure analogue au PG des autres bactéries. Il est responsable de la rigidité et de la forme des bacilles.

Les acides mycoliques sont des acides gras α -ramifiés et β -hydroxylés. On en retrouve dans la paroi de nombreuses bactéries à Gram positif. Ils sont un des constituants majeurs de la paroi mycobactérienne. Chaque souche mycobactérienne contient un mélange différent d'acides mycoliques, ce qui peut constituer un critère d'identification. Chez *M. tuberculosis*, on retrouve trois des six classes d'acides mycoliques :

- Les acides α -mycoliques qui sont la forme la plus abondante (> 70%)
- Les acides méthoxy-mycoliques
- Les acides céto-mycoliques

- Le lipoarabinomannane (LAM) qui est un polysaccharide de taille hétérogène. Il est ancré dans la membrane plasmique via une tête phosphatidyl-inositol-mannoside et interagit avec le mAGP de manière non covalente. Il constitue l'un des facteurs de virulence en intervenant dans la reconnaissance cellulaire, modifiant ainsi la réponse immunitaire de l'hôte.

⁸ L. B. Kremer, *et al.*, **1999**, *15* (6-7), 842-850.

I.2.2.3 La capsule

La mise en évidence de la présence d'une capsule mycobactérienne remonte au début des années 1950.¹ Cette dernière est principalement constituée de polysaccharides (30 à 55%), de protéines (40 à 55%) et de lipides (3 à 8%). Au niveau des polysaccharides, on retrouve des glycanes formés par l'adjonction linéaire de D-glucoses liés en α -1,4 et de l'arabinomannane (AM).

I.3 *Primo-Infection et Transmission*

I.3.1 *Cas des patients immuno-compétents*

L'agent de la tuberculose, ou bacille de Koch (BK), se transmet presque exclusivement par voie aérienne. Les gouttelettes infectantes, ou microgouttelettes de Pflügge, sont produites sous forme d'aérosol par les patients contagieux lors de la toux, la parole ou les éternuements. Ces patients sont dits bacillifères. En pratique, on estime qu'environ 50% des tuberculoses pulmonaires sont bacillifères (Figure 5). Le nombre minimum de bacilles nécessaires pour entraîner une infection n'est pas connu avec certitude mais est estimé à une centaine. Bien évidemment, ce nombre dépend de la capacité de l'organisme infecté à se défendre et de la virulence de la souche bactérienne.

L'infection (également appelée primo-infection tuberculeuse (PIT) ou tuberculose-infection) entraîne la mise en place d'une réponse immunologique spécifique au BK.

Les personnes nouvellement infectées vont, pour la plupart, demeurer asymptomatiques (Latent Infection, Figure 5). En effet, environ 5% seulement des patients développent une "tuberculose maladie" dans l'année qui suit leur PIT et 5% supplémentaires développent une "tuberculose maladie" (Active Infection, Figure 5) au delà de ce délai. Le risque de passage de la tuberculose-infection à la tuberculose-maladie est plus important chez l'enfant et varie en fonction de l'âge. Ce risque peut s'élever jusqu'à 50% chez les personnes immunodéprimées.

Les quelques bacilles infectants déposés au niveau des espaces alvéolaires distaux sont phagocytés par les macrophages alvéolaires (MA) au sein desquels ils peuvent se multiplier. Cette résistance à l'action bactéricide du macrophage est due à une inhibition de la fusion du phagosome et des lysosomes par la mycobactérie.

Ces micro-colonies intracellulaires conduisent à la lyse du macrophage qui libère des bacilles de nouveau phagocytés par d'autres cellules. Un petit foyer inflammatoire contenant quelques centaines de bacilles se constitue localement. Certaines de ces bactéries sont, par l'intermédiaire des cellules phagocytaires, drainées vers les ganglions lymphatiques proches du territoire infecté. A ce niveau, une réponse immunitaire spécifique va se mettre en place. Elle est principalement sous la

dépendance des lymphocytes T. Cette réponse immunitaire conduit le plus souvent à un arrêt de la multiplication des bacilles et à l'apparition d'une hypersensibilité retardée aux protéines de *M. tuberculosis* contenues dans la tuberculine et quantifiables par une intradermoréaction (IDR ou test de Mantoux). Il faut environ six semaines après le contagage pour voir apparaître cette réponse immunitaire spécifique.

C'est à ce moment que se forment les granulomes qui consistent en une accumulation de cellules monocytaires entourées de lymphocytes, avec au centre, une nécrose au contenu riche en lipides (nécrose caséuse). Ces lésions ont tendance à se calcifier, mais conservent en leur sein des bacilles tuberculeux dits « quiescents » ou « dormants », responsables des rechutes (par exemple chez les patients immunodéprimés).

Le développement de la maladie par réactivation d'un foyer quiescent s'observe surtout chez les sujets âgés. L'immunodépression est également un facteur majeur de réactivation. La contamination par le virus du SIDA, la malnutrition, l'alcoolisme, les situations de précarité, la toxicomanie intraveineuse, la promiscuité, le diabète, l'insuffisance rénale avancée ou encore les greffes d'organes sont donc autant de situations qui favorisent le passage du stade d'infection tuberculeuse quiescente à la tuberculose-maladie.

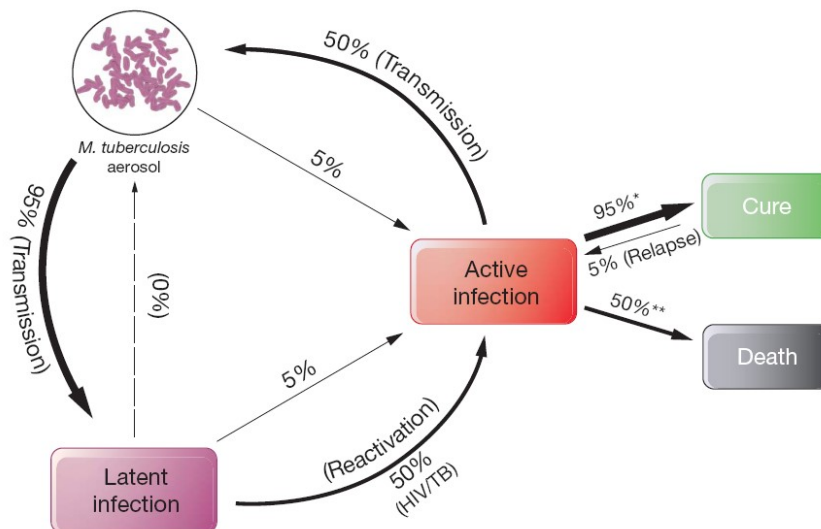


Figure 5 : Les différentes étapes de la tuberculose, selon Koul *et al.*¹⁰

Pour les individus infectés n'ayant pas évolués d'emblée vers la maladie tuberculeuse, il s'établit donc un équilibre entre *M. tuberculosis* et l'immunité protectrice et spécifique de l'individu. Ces personnes infectées par la forme latente ne sont pas contagieuses. Nous venons de voir qu'une baisse plus ou moins importante de cette immunité protectrice facilite la rupture de cet équilibre et les

¹⁰ A. Koul, *et al.*, *Nature* **2011**, 469 (7331), 483-490.

lésions se réactivent, le caséum se ramollit et les bacilles quiescents recommencent à se multiplier : le processus d'évolution vers la tuberculose-maladie est enclenché.

Au niveau pulmonaire, cela va se traduire par une évolution progressive et relativement lente de la lésion pour aboutir en quelques mois à la constitution d'une nécrose unique ou multiple contenant un très grand nombre de bacilles (10^7 à 10^9). Lorsque cette lésion s'ouvre vers une bronche, les bacilles sont évacués avec les crachats et sont souvent accompagnés d'une hémoptysie lorsqu'un territoire vasculaire est concerné. La destruction des tissus infectés est suivie de fibrose cicatricielle avec insuffisance respiratoire irréversible.

L'évolution spontanée en dehors de tout traitement comporte trois possibilités. Dans les deux ans qui suivent le début de la maladie² :

- 50% des patients meurent
- 25% des patients guérissent
- 25% deviennent malade chronique et constituent un réservoir pérenne de bacilles.

Très exceptionnellement, des transmissions d'un animal infecté à l'homme sont rapportées. L'ingestion de produits laitiers contaminés par le bacille tuberculeux bovin est principalement à l'origine de la forme digestive de la maladie. On rapporte aussi l'existence de formes cutanées de la tuberculose des membres inférieurs qui auraient pour source le sol contaminé par des crachats de patients tuberculeux.

1.3.2 Cas des patients immunodéprimés

Les personnes dont le système immunitaire est altéré sont beaucoup plus susceptibles de développer une tuberculose-maladie à la suite d'une tuberculose-infection, après une guérison apparente ou une réinfection. Par exemple, il a été montré qu'en cas de coinfection avec le virus du SIDA, le risque de passage au stade de tuberculose-maladie peut-être multiplié jusqu'à 300 fois par rapport aux patients immunocompétents.¹ En Afrique Sub-saharienne, l'incidence de la tuberculose-maladie peut ainsi atteindre 50 à 60% chez les personnes positives au VIH.

I.4 Symptômes

I.4.1 Tuberculose pulmonaire

Les premiers symptômes de la tuberculose peuvent apparaître très tardivement (la phase de PIT étant la plus souvent asymptomatique) et sont bien souvent communs à de nombreuses maladies ou à un état de surmenage, ce qui a valu à cette maladie le surnom de « grande trompeuse ». De plus, les symptômes peuvent varier énormément d'un individu à un autre.

On observe principalement un affaiblissement de l'état général avec de l'asthénie, un amaigrissement, un état fébrile, des sudations nocturnes ou encore des règles irrégulières, ainsi que de nombreux signes respiratoires : toux prolongée, expectoration mucopurulente ou hémoptoïque, ainsi que des douleurs thoraciques, le plus souvent unilatérales et majorées à l'inspiration.

Tous ces symptômes ne suffisent cependant pas toujours à aiguiller le diagnostic, le patient attribuant souvent son état à du surmenage et cela conduit souvent au diagnostic tardif de la maladie.

I.4.2 Tuberculoses miliaire et extra-pulmonaire

La tuberculose miliaire correspond à une infection généralisée, disséminée par voie hématogène et pouvant toucher de nombreux organes (poumons, foie, rate, moelle osseuse, méninges, etc.) et faite de multiples granulomes de la taille d'un grain de mil. La tuberculose miliaire apparaît généralement peu de temps après la PIT ou à un stade terminal d'évolution d'une tuberculose chronique non traitée. Une forme suraiguë entraîne un syndrome de détresse respiratoire aiguë (aussi appelée miliaire asphyxiante). Les autres symptômes dépendent évidemment des organes infectés.

Il existe de nombreuses formes extra-pulmonaires de tuberculose. On recense notamment des infections ganglionnaires, osseuses, neuroméningées, urogénitales ou digestives. Les symptômes dépendent des organes et tissus infectés mais sont très souvent peu spécifiques.

I.5 Diagnostic

Actuellement, la radiographie est l'élément clé qui permet d'orienter le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Cependant, il est impossible de diagnostiquer une infection à mycobactéries sans confirmation par un diagnostic bactériologique de prélèvements biologiques. Ces prélèvements

sont effectués sur les crachats et expectorations du patient. En cas d'absence de ces manifestations, les prélèvements peuvent être obtenus par tubage gastrique, les bacilles pouvant être déglutis et accumulés au niveau de l'estomac. Si trois examens par tubage gastrique sont négatifs, on peut avoir recours à la fibroscopie bronchique.

Ensuite, le diagnostic bactériologique visant à mettre en évidence des bacilles appartenant au complexe *tuberculosis* comporte quatre étapes :

- La première étape est un examen microscopique direct qui permet la détection de BAAR (Bacilles Acido-Alcool-Résistants). Ce test utilise les techniques de coloration à la fuschine de Ziehl-Neelsen ou à l'auramine par fluorescence. Il est très peu sensible (seuil de détection 10^4 - 10^5 bacilles/mL) mais donne un résultat rapide et est nécessaire afin d'évaluer la contagiosité des patients.

- La culture : la croissance relativement lente des mycobactéries et la nécessité d'apport de lipides requiert l'utilisation de milieux spécifiques et complexes. On utilise soit un milieu solide de Lowestein-Jensen soit des techniques en milieu liquide comme les techniques Bactec 460, basées sur la radiométrie ou le Bactec MGIT 960 basée sur la fluorescence. Ces techniques permettent d'obtenir un résultat après une à quatre semaines en fonction de la quantité de bacilles présents dans le prélèvement.

- L'identification des milieux de culture : la technique de référence est la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette technique est assez contraignante puisqu'elle nécessite l'utilisation de culture pure de bacilles et elle est relativement longue à mettre en œuvre. Elle permet l'identification précise des espèces par comparaison de séquences conservées au sein de leur ARN 16S.

- L'antibiogramme : cette dernière étape est indispensable afin de déterminer la présence ou non de formes résistantes. L'antibiogramme est souvent réalisé sur milieu solide en présence de différents antituberculeux et donne des résultats après quatre semaines environ.

Pour les cas de tuberculose extra-pulmonaire, les prélèvements sont fonction de l'organe concerné : l'urine pour la tuberculose rénale ou encore le liquide céphalo-rachidien pour la méningite tuberculeuse par exemple.

II Arsenal thérapeutique

II.1 Vaccination par le Bacille de Calmette et Guérin

Le bacille de Calmette et Guérin, ou BCG, est un vaccin bactérien vivant dérivé d'une souche de *M. bovis* cultivée par Calmette et Guérin à partir de 1908. Après avoir vérifié son innocuité chez l'homme et son efficacité à prévenir l'apparition de la maladie chez de jeunes bovins vivants au contact d'animaux tuberculeux, le BCG a été utilisé chez le nourrisson avec efficacité pour la première fois en 1921. Rapidement, une diminution de plus de 50% de la mortalité due à la tuberculose a été observée chez les nourrissons ainsi vaccinés, par rapport à un groupe contrôle. Du fait de sa large distribution de par le monde, les souches de BCG utilisées dans les différents pays ne sont pas identiques entre elles malgré l'appellation commune. En 2005, l'OMS estimait qu'environ un milliard de personnes avaient reçu le BCG. Actuellement, le BCG est un vaccin très paradoxal puisqu'il est à la fois le plus répandu au monde mais également le plus controversé quant à son efficacité. Les principales causes de réticence à son utilisation sont les suivantes:

- Premièrement, son efficacité s'est révélée très disparate selon les pays, et quasiment nulle dans les régions à forte endémie de tuberculose.
- Deuxièmement, les personnes vaccinées deviennent réactives au test d'IDR à la tuberculine. En cas de positivité de ce test, il est donc difficile de distinguer la vaccination par le BCG d'une contamination par *M. tuberculosis*.

Les nombreuses études réalisées dans le monde entier décrivent des résultats très hétérogènes pour ce vaccin. Il a été montré que la vaccination par le BCG permettait de prévenir les formes miliaires et méningites de la tuberculose chez l'enfant entre 64 et 86%, avec un pouvoir protecteur légèrement supérieur à 50% chez l'enfant contre toutes les formes de la maladie. En revanche, le BCG n'a qu'un effet protecteur modeste sur la tuberculose pulmonaire de l'adulte, qui constitue le principal réservoir de sujets bacillifères. Le BCG est contre-indiqué chez l'enfant en cas d'immunodépression ou de maladie évolutive.

Actuellement, neuf nouveaux vaccins sont en développement clinique (Figure 6). Deux approches différentes sont développées. La première stratégie consiste à créer des vaccins appelés « boost » pour lesquels le BCG serait classiquement administré aux nouveaux-nés, puis le vaccin en question serait donné quelques mois plus tard pour venir améliorer son efficacité. L'autre stratégie consiste à développer des vaccins « prime » qui viendraient remplacer le BCG.

The development pipeline for new vaccines, 2011

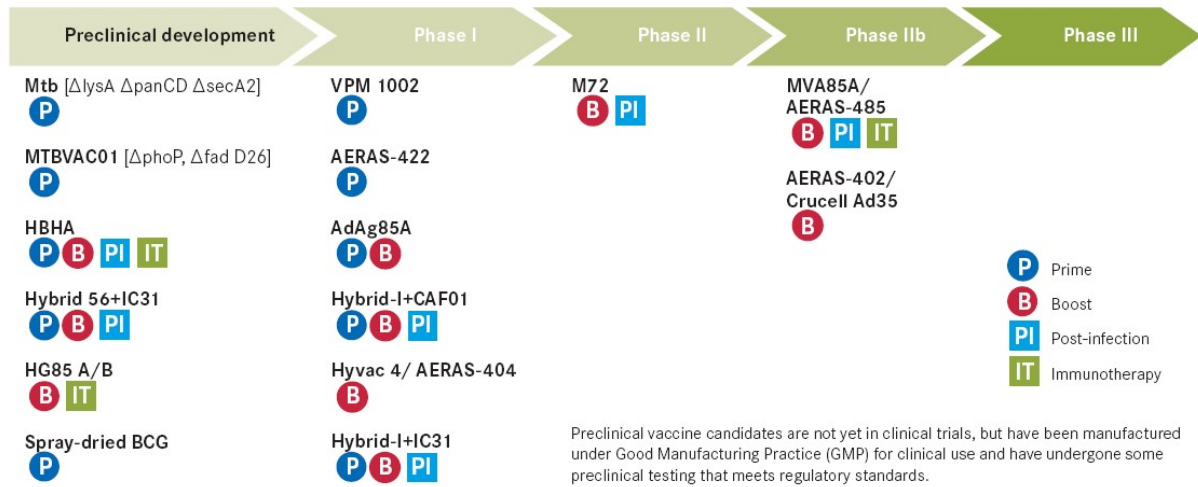


Figure 6 : Les vaccins anti-TB en développement clinique et préclinique en Juillet 2011, selon l'OMS.

L'OMS espère que d'ici 2020 un des vaccins actuellement en phase II ou IIb pourra être mis sur le marché. Le vaccin MVA85A, développé par des chercheurs de l'Université d'Oxford, est actuellement le plus avancé de tous.

II.2 Les traitements de première intention

Depuis la découverte en 1944¹¹ de la streptomycine et de sa première utilisation en 1946¹² comme antituberculeux, la chimiothérapie de première intention utilisée dans le traitement de la tuberculose a beaucoup évolué.¹³ Au cours des nombreux essais cliniques qui ont été réalisés, deux traitements de première intention pour la tuberculose pulmonaire non résistante se sont dégagés^{14,15} : on utilise ainsi un cocktail d'isoniazide, rifampicine et pyrazinamide en présence soit de streptomycine, soit d'éthambutol. Dans chaque cas, le traitement se décompose en deux phases : deux mois de phase intensive (ou phase initiale) où les quatre antibiotiques sont administrés, puis quatre mois de phase de continuation où seules l'isoniazide et la rifampicine sont utilisées. La combinaison d'un grand nombre de médicaments lors de la phase initiale s'explique par le fait que le nombre de bactéries est beaucoup plus important au début du traitement, et qu'il y a donc un risque plus élevé de sélectionner des

¹¹ A. Schatz, *et al.*, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. *Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* **1944**, 57 (2), 244-248.

¹² C. Hinshaw, *et al.*, *Journal of the American Medical Association* **1946**, 132 (13), 778-782.

¹³ Y. L. Janin, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2007**, 15 (7), 2479-2513.

¹⁴ D. A. Mitchison, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2005**, 171 (7), 699-706.

¹⁵ World Health Organization, **2010**.

mutants résistants. Après quelques semaines de traitement seulement, les patients ne sont plus contagieux, néanmoins, les derniers mois de traitement sont cruciaux afin d'éliminer la totalité des bacilles dits « dormants » qui sont responsables des rechutes ainsi que de l'apparition d'un grand nombre de cas de résistance.

En 2009, 87% des cas de tuberculose sensible ont pu être soignés grâce à ce traitement.

II.2.1 L'isoniazide

L'isoniazide (INH) (Figure 7) a été découverte en 1952¹⁶, par analogie de structure avec le nicotinamide qui avait montré auparavant un pouvoir antituberculeux sur modèle animal.¹⁷ L'utilisation de l'isoniazide a constitué une avancée considérable dans le traitement de la tuberculose car c'est un composé à la fois très actif, peu coûteux et donnant lieu à très peu d'effets secondaires aux doses administrées. L'INH est bactéricide aux doses prescrites mais cible seulement les bacilles extracellulaires non quiescents.

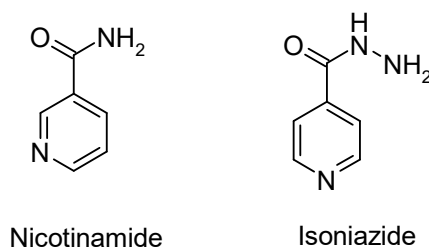


Figure 7 : Structure du nicotinamide et de l'isoniazide.

Le mécanisme d'action de l'isoniazide est resté inconnu jusque dans les années 70, où l'effet de l'isoniazide sur la biosynthèse des acides mycoliques^{18,19} et nucléiques²⁰ a été découvert. Des études génétiques sur des mutants de *M. tuberculosis* résistants à l'INH ont permis de mettre en évidence deux gènes liés au mécanisme d'action de l'INH.

Le premier est le gène *katG*, qui code pour l'enzyme mycobactérienne KatG, une catalase-péroxydase jouant notamment le rôle de NADH oxydase²¹ ou encore de peroxyntitase.²² Après son

¹⁶ J. Bernstein, *et al.*, *Am Rev Tuberc* **1952**, 65 (4), 357-364.

¹⁷ V. Chorine, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1945**, 220, 150-151.

¹⁸ F. G. Winder, *et al.*, *Journal of General Microbiology* **1970**, 63 (1), 41-48.

¹⁹ K. Takayama, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1972**, 2 (1), 29-35.

²⁰ P. R. J. Gangadharam, *et al.*, *Nature* **1963**, 198 (4881), 712-714.

²¹ R. Singh, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279 (41), 43098-43106.

²² N. L. Wengenack, *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, 256 (3), 485-487.

entrée par diffusion passive au sein de la bactérie²³ l'INH est activée par KatG^{24,25} pour donner lieu à plusieurs radicaux organiques extrêmement réactifs, comme le radical isonicotinoyl^{26,27,28} (composé A, Figure 8) ou le radical hydrazylisonicotinique²⁹ (composé B, Figure 8). Lors de ce processus d'activation de l'INH, il y a également formation d'autres espèces radicalaires réactives, notamment du radical libre NO[•].^{30,31} Ce radical est supposé jouer un rôle dans l'activité de l'INH mais le mode d'action n'est pas encore bien déterminé. Il impliquerait notamment le mycothiol,³² principal anti-oxydant de faible poids moléculaire chez *M. tuberculosis*.

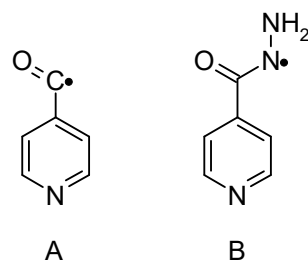


Figure 8 : Produits d'activation de l'INH par l'enzyme KatG.

Le second gène, *inhA*, code pour l'énoyl acyl carrier protein (ACP) réductase InhA impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques.³³ Les radicaux organiques (Figure 8) produits lors de l'activation de l'INH sont capables de réagir avec le NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) (Figure 9) pour former différents dérivés acylés du NAD.^{34,35,36}

²³ F. Bardou, *et al.*, *Microbiology* **1998**, 144 (9), 2539-2544.

²⁴ Y. Zhang, *et al.*, *Nature* **1992**, 358 (6387), 591-593.

²⁵ B. Heym, *et al.*, *Molecular Microbiology* **1995**, 15 (2), 235-245.

²⁶ K. Johnsson, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116 (16), 7425-7426.

²⁷ K. Johnsson, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117 (17), 5009-5010.

²⁸ M. Nguyen, *et al.*, *Comptes Rendus Chimie* **2002**, 5 (4), 325-330.

²⁹ H. J. Sipe, *et al.*, *Chemical Research in Toxicology* **2004**, 17 (2), 226-233.

³⁰ G. S. Timmins, *et al.*, *Journal of Bacteriology* **2004**, 186 (16), 5427-5431.

³¹ G. S. Timmins, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, 48 (8), 3006-3009.

³² G. S. Timmins, *et al.*, *Molecular Microbiology* **2006**, 62 (5), 1220-1227.

³³ A. Banerjee, *et al.*, *Science* **1994**, 263 (5144), 227-230.

³⁴ M. Nguyen, *et al.*, *ChemBioChem* **2001**, 2 (12), 877-883.

³⁵ S. Broussy, *et al.*, *Chemistry – A European Journal* **2003**, 9 (9), 2034-2038.

³⁶ D. A. Rozwarski, *et al.*, *Science* **1998**, 279 (5347), 98-102.

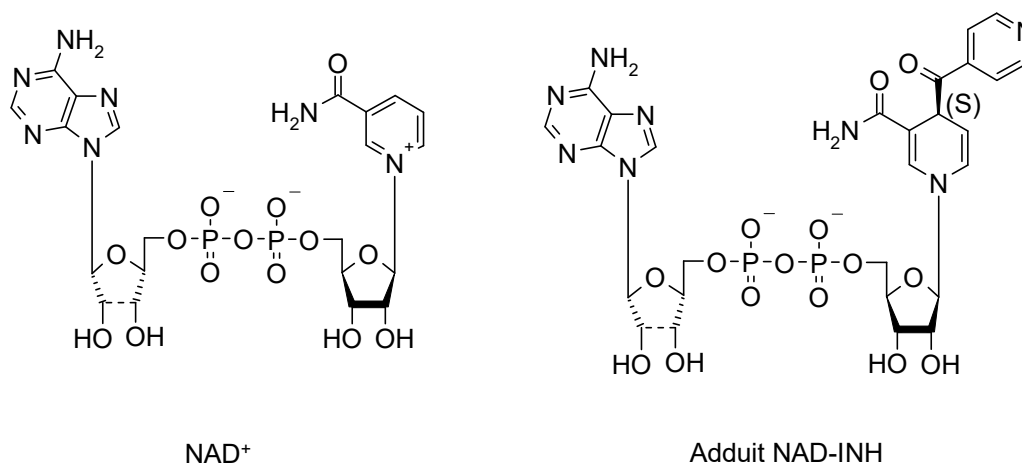


Figure 9 : Structure du NAD⁺ (à gauche) et de l'adduit acylé de configuration S (à droite).

L'adduit responsable de l'inhibition de la protéine InhA est celui représenté en Figure 9. Cet adduit est issu de la réaction entre le radical B (Figure 8) et le NAD⁺ (Figure 9). Lors de cette réaction il y a création d'un centre de chiralité et il a été observé que seul l'isomère de configuration S se lie à InhA³⁶ avec une très forte affinité ($K_i = 0.75\text{nM}$ ³⁷, $K_d < 0.4\text{nM}$ ³⁸), inhibant ainsi la synthèse des acides mycoliques.

Certains analogues synthétiques du NAD (Figure 10) ont également été brevetés pour leur activité antimycobactérienne.³⁹ Actuellement, la synthèse d'analogues de l'adduit INH-NAD est un axe toujours exploré dans la recherche de nouveaux composés anti-tuberculeux.^{40,41} Cependant, le développement d'analogues complets de l'adduit INH-NAD s'avère difficile, la synthèse étant complexe et les composés possédant un poids moléculaire important. La recherche d'inhibiteurs directs d'InhA se tourne donc également vers des analogues restreints de l'adduit INH-NAD⁴² ou possédant une structure chimique complètement différente.⁴³

³⁷ R. Rawat, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100 (24), 13881-13886.

³⁸ B. Lei, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275 (4), 2520-2526.

³⁹ M. Yatvin, B., *et al.*, **2002**, WO/2002/004478

⁴⁰ S. Broussy, *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70 (25), 10502-10510.

⁴¹ S. Broussy, *et al.*, *Organic and Biomolecular Chemistry* **2005**, 3 (4), 666-669.

⁴² C. Deraeve, *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2011**, 19 (21), 6225-6232.

⁴³ G. Subba Rao, *et al.*, *Chemical Biology and Drug Design* **2008**, 72 (5), 444-449.

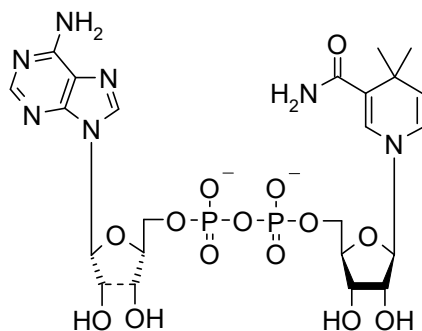


Figure 10 : Analogue synthétique de l'adduit NAD-INH.

Les espèces radicalaires réactives issues de l'activation de l'INH sont également capables de former des adduits avec le NADP⁺ (Figure 11). Le complexe ainsi formé est capable d'inhiber fortement ($K_i < 1\text{nM}$) la dihydrofolate réductase (DHFR)⁴⁴, une enzyme impliquée dans la synthèse des acides nucléiques. A l'inverse de l'adduit INH-NAD, l'énantiomère le plus actif est ici le composé de configuration R (Figure 11).

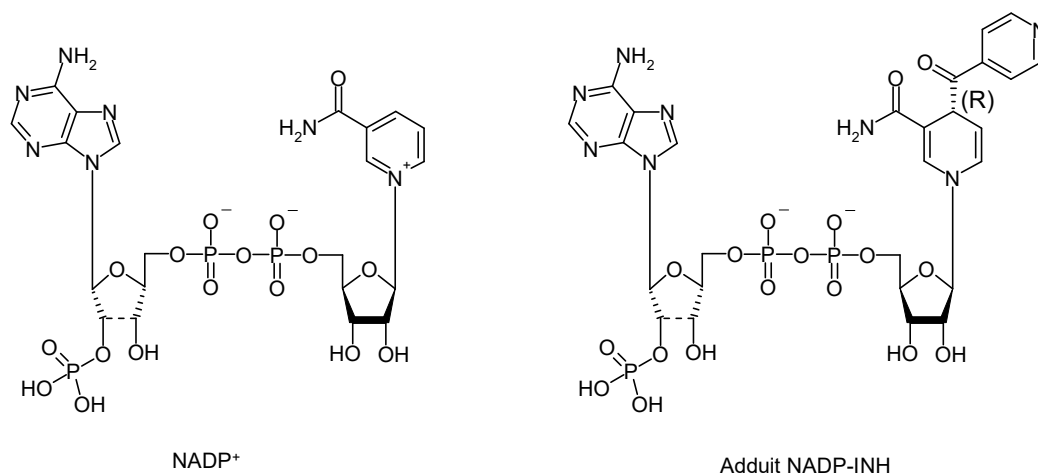


Figure 11 : Structure du NADP⁺ et de l'adduit NADP-INH

Les principales causes de résistance à l'INH ont fait l'objet de revues récentes.^{45,46,47} Elles sont principalement dues à des mutations au niveau des enzymes KatG^{24,48,49} et InhA.³³ Des mutations au niveau de l'enzyme NdhII^{50,51} (NAD déshydrogénase II), qui permet la régulation du ratio

⁴⁴ A. Argyrou, *et al.*, *Nature Structural and Molecular Biology* **2006**, 13 (5), 408-413.

⁴⁵ M. M. Wade, *et al.*, *Frontiers in Bioscience* **2004**, 9, 975-994.

⁴⁶ Y. Zhang, *et al.*, *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2009**, 13 (11), 1320-1330.

⁴⁷ P. E. Almeida Da Silva, *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**, 66 (7), 1417-1430.

⁴⁸ D. A. Rouse, *et al.*, *Infection and Immunity* **1995**, 63 (4), 1427-1433.

⁴⁹ S. V. Ramaswamy, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, 47 (4), 1241-1250.

⁵⁰ L. Miesel, *et al.*, *Journal of Bacteriology* **1998**, 180 (9), 2459-2467.

NADH/NAD, sont également observables. Les mutations au niveau de l'enzyme KatG sont néanmoins les plus récurrentes et apparaissent dans plus de la moitié des cas de résistance à l'INH.^{46,49}

On observe comme principaux effets secondaires des nausées, des problèmes hépatiques (simple élévation des transaminases ou hépatite médicamenteuse dose-dépendante, pouvant nécessiter l'arrêt du médicament). On peut également observer des polyneuropathies sensitivo-motrices (surtout en cas de carence en vitamine B6), des troubles neuropsychiques, des névralgies cervico-brachiales (syndrome épaule-main) et des syndromes rhumatoïdes.²

II.2.2 La rifampicine

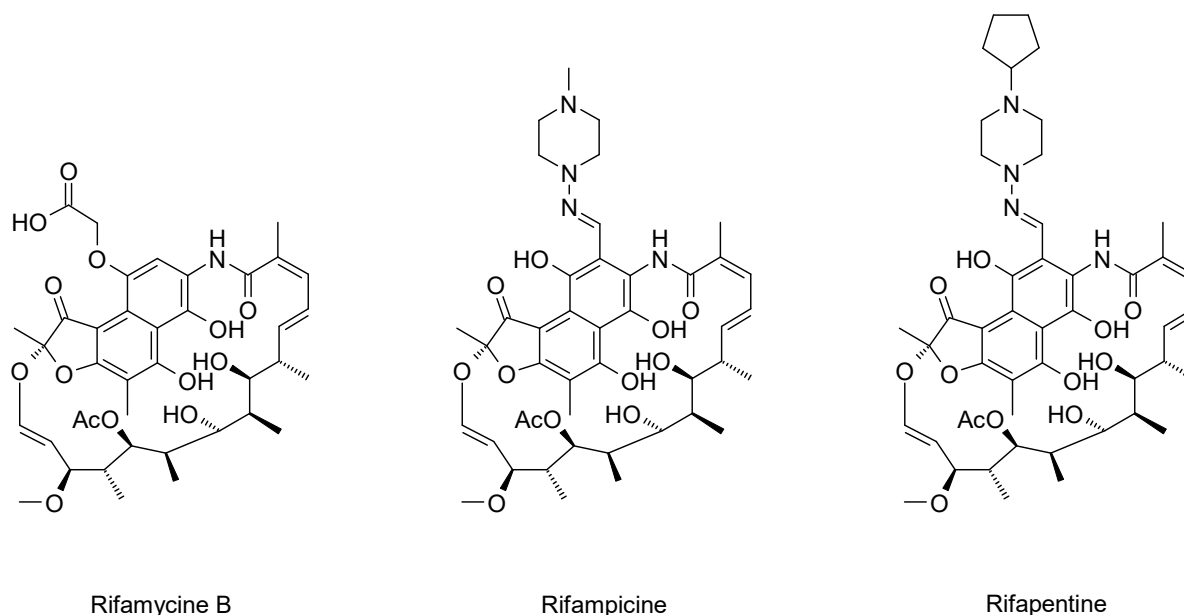


Figure 12 : Structure de la rifamycine B, de la rifampicine et de la rifapentine.

La rifampicine ou rifampin (RIF) (Figure 12) est un antibiotique à large spectre hémisynthétique de la famille des rifamycines découvert en 1966.⁵² La rifampicine est un analogue de la rifamycine B, une molécule naturelle isolée à partir de *Nocardia Mediteranei*⁵³ possédant un faible pouvoir antimycobactérien. La grande majorité des analogues de cette classe de composés conservent le macro-cycle constant et se différencient par les substituants au niveau du noyau naphthyle.

⁵¹ A. S. G. Lee, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2001**, 45 (7), 2157-2159.

⁵² N. Maggi, *et al.*, *Chemotherapy* **1966**, 11 (5), 285-292.

⁵³ P. Sensi, **1983**, 5 (History of the Development of Rifampin), S402-S406.

Les rifamycines agissent en inhibant la synthèse de l'ARN bactérien en bloquant physiquement l'élongation de la chaîne ARN par liaison à la sous unité β de l'ARN polymérase ADN-dépendante bactérienne, encodée par le gène *rpoB*.⁵⁴ A ce jour, ce sont les seuls antibiotiques cliniquement utilisés possédant ce mode d'action.

La rifampicine est indiquée dans le traitement de la tuberculose mais également pour d'autres infections à mycobactéries comme la lèpre, ainsi qu'en cas de brucellose ou dans la prévention d'infections à méningocoques. La rifampicine est bactéricide aux doses utilisées. C'est le seul antibiotique de la poly-chimiothérapie actif sur les bacilles dits « quiescents » ou « dormants » au sein du caséum, c'est pourquoi la rifampicine est utilisée tout au long des six mois du traitement de première intention en combinaison avec l'INH. C'est également une des raisons qui permet d'expliquer pourquoi l'utilisation de la rifampicine a permis de réduire considérablement les temps de traitement.⁵⁵

La fréquence d'apparition de résistances à la rifampicine est comprise entre 10^{-7} et 10^{-8} . La quasi-totalité des mutants résistants à la rifampicine possède une mutation sur le gène *rpoB*, et plus particulièrement dans une région bien identifiée de 81 paires de bases où apparaissent 96% des mutations.⁵⁶ Ces mutations entraînent un changement de conformation de la sous unité β de l'ARN polymérase, provoquant une diminution de l'affinité de la rifampicine. Les souches résistantes à la rifampicine sont également souvent résistantes aux autres membres de la famille des rifamycines.

La rifampicine et certains de ses analogues se sont révélés être de forts inducteurs des cytochromes P450 (notamment CYP3A), ce qui entraîne de nombreuses interactions médicamenteuses notamment avec les inhibiteurs de protéases ainsi qu'avec les inhibiteurs de transcriptase inverse non-nucléosidiques anti-HIV utilisés chez les patients coinfectés.^{57,58} Des problèmes peuvent également survenir avec les œstrogénostatifs (risque d'inactivation de la pilule contraceptive, nécessité de changer de méthode contraceptive), les anticoagulants oraux, les anesthésiques généraux, les corticoïdes, les digitaliques, les benzodiazépines et les barbituriques. D'autres effets secondaires comme des phénomènes immuno-allergiques sont également observables.²

La rifapentine (Figure 12) est un analogue de la rifampicine, approuvé par la FDA en 1998 dans le traitement de la tuberculose, avec un temps de demi-vie amélioré, qui permet de réduire

⁵⁴ W. R. McClure, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1978**, 253 (24), 8949-8956.

⁵⁵ M. D.A, *Tubercle* **1985**, 66 (3), 219-225.

⁵⁶ A. Telenti, *et al.*, *The Lancet* **1993**, 341 (8846), 647-651.

⁵⁷ W. Burman, *et al.*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2001**, 164 (1), 7-12.

⁵⁸ A. P. Li, *et al.*, *Chemico-Biological Interactions* **1997**, 107 (1-2), 17-30.

considérablement la fréquence d'administration. Cependant, la rifapentine n'est pas active sur les souches résistantes à la rifampicine⁵⁹ et elle présente les mêmes problèmes d'induction des cytochromes P450 CYP3A.⁵⁷

II.2.3 Le pyrazinamide

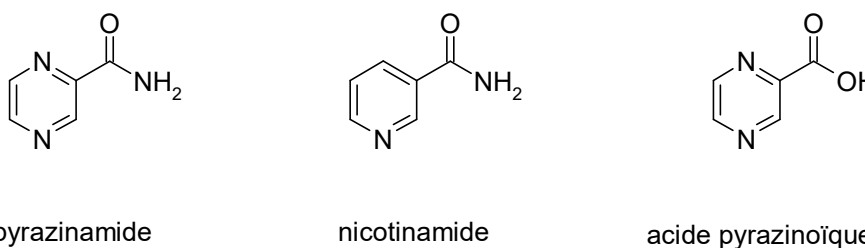


Figure 13 : Structure du pyrazinamide, du nicotinamide et de l'acide pyrazinoïque.

Chorine a démontré en 1945 l'action du nicotinamide (Figure 13) contre *M. tuberculosis* sur modèle animal.¹⁷ Tout comme pour l'INH, la synthèse d'analogues du nicotinamide a permis la découverte du pyrazinamide (PZA) (Figure 13) en 1952.^{60,61} De manière étrange, le PZA n'est pas actif sur *M. tuberculosis* dans des conditions classiques de culture, à pH neutre.⁶² Cependant, en culture à pH acide⁶³ ainsi que sur modèle murin⁶⁴ le PZA s'est révélé être le plus actif des analogues dérivés du nicotinamide. Il faut également noter que le PZA est plus actif sur les bacilles dans des conditions pauvres en oxygène ou anaérobies.⁶⁵ L'acide pyrazinoïque est lui actif sur *M. tuberculosis* dans n'importe quelle condition.⁶⁶ Le PZA est le seul composé antituberculeux capable de tuer les bacilles persistants au sein des macrophages.

Deux mécanismes d'entrée du PZA dans la bactérie sont pour le moment proposés : Zhang *et al.*⁶⁷ proposent une entrée par diffusion passive alors que Raynaud *et al.*⁶⁸ suggèrent que le passage membranaire du PZA s'effectue par transport actif impliquant l'ATP. Malgré le rôle primordial du PZA dans le traitement de la tuberculose, son mécanisme d'action reste l'un des plus flous parmi les

⁵⁹ D. L. Williams, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, 42 (7), 1853-1857.

⁶⁰ S. Kushner, *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* **1948**, 13 (6), 834-836.

⁶¹ S. Kushner, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* **1952**, 74 (14), 3617-3621.

⁶² Y. Zhang, *et al.*, *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2003**, 7 (1), 6-21.

⁶³ Y. Zhang, *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2003**, 52 (5), 790-795.

⁶⁴ L. Malone, *et al.*, *Am Rev Tuberc* **1952**, 65 (5), 511-518.

⁶⁵ M. M. Wade, *et al.*, *Journal of Medical Microbiology* **2004**, 53 (8), 769-773.

⁶⁶ L. B. Heifets, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, 33 (8), 1252-1254.

⁶⁷ Y. Zhang, *et al.*, *Journal of Bacteriology* **1999**, 181 (7), 2044-2049.

⁶⁸ C. Raynaud, *et al.*, *Microbiology* **1999**, 145 (6), 1359-1367.

composés antituberculeux. Néanmoins, un mécanisme d'action a été proposé par Zhang *et al.*⁶² sur la base des récentes observations décrites dans la littérature.^{67,69,70} Le PZA est une prodrogue qui, une fois entrée dans la bactérie, a besoin d'être activée en acide pyrazinoïque (HPOA) par une nicotinamidase/pyrazinamidase (PZase), encodée par le gène *pncA*. Dans le cytoplasme, dans des conditions de pH neutre, c'est le pyrazinoate (POA^-), sans activité bactéricide, qui est formé. Le POA^- sort de la cellule par diffusion passive ou par un système d'efflux qui s'avère être déficient chez *M. tuberculosis*. En cas de milieu extracellulaire acide, ce qui est le cas au sein des macrophages par exemple, une partie du POA^- extracellulaire redonne la forme acide HPOA. Le HPOA ainsi formé est capable de retraverser la membrane cellulaire par diffusion passive. Ce phénomène de diffusion de l'espèce HPOA étant supérieur au phénomène d'efflux du POA^- , il y a accumulation au sein de la cellule, entraînant une acidification du milieu intracellulaire (Figure 14).

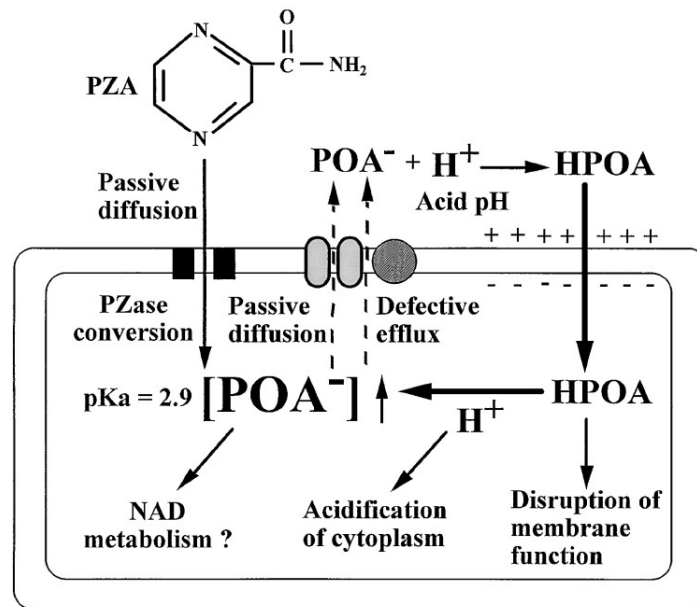


Figure 14 : Mécanisme d'action du PZA selon Zhang *et al.*⁶²

Cette acidification cytoplasmique joue très certainement un rôle inhibiteur sur plusieurs enzymes vitales de la bactérie. Zhang *et al.*⁶³ ont également montré que l'accumulation d'HPOA entraîne une diminution du potentiel membranaire, responsable d'une diminution de la production d'ATP.

Très récemment, Shi *et al.*⁷¹ ont mis en évidence l'inhibition du phénomène de trans-translation comme nouveau mode d'action du PZA. Cette inhibition met en jeu la protéine RpsA, la

⁶⁹ Y. Zhang, *et al.*, *Journal of Medical Microbiology* **2002**, 51 (1), 42-49.

⁷⁰ A. Scorpio, *et al.*, *Nature Medicine* **1996**, 2 (6), 662-667.

⁷¹ W. Shi, *et al.*, *Science* **2011**, 333 (6049), 1630-1632.

plus grande protéine de la sous unité ribosomale 30S. La trans-traduction est un mécanisme de secours qui permet l'élimination des ARN messagers défectueux en ajoutant un tag à l'extrémité C-terminale du peptide en cours de traduction, entraînant à la fois le peptide et la protéine sur la voie de la dégradation (Figure 15).⁷² Ce processus n'est pas indispensable à la bactérie en conditions normales de croissance, mais s'avère essentiel en conditions de stress.^{73,74} En se liant à la protéine RpsA, l'acide pyrazinoïque empêche la fixation de l'ARNtm mis en jeu et donc le phénomène de trans-traduction, interférant ainsi dans la survie des bacilles « quiescents » en condition de stress. Ceci explique l'activité plus élevée du PZA sur *M. tuberculosis* dans des conditions de stress comme un milieu de culture acide ou des conditions anaérobies, mais également son activité *in vivo* plus marquée que celle *in vitro*, en raison du stress dû à l'environnement intra-macrophagique.^{63,69} Cependant, l'importance du processus de trans-traduction dans la survie de *M. tuberculosis* chez l'hôte étant mal connue, et vu les faibles augmentations (deux à trois fois) de CMI observées sur des souches portant des mutations de la protéine RspA, on ne peut exclure la possibilité que le PZA possède d'autres cibles qui contribueraient à son activité globale.

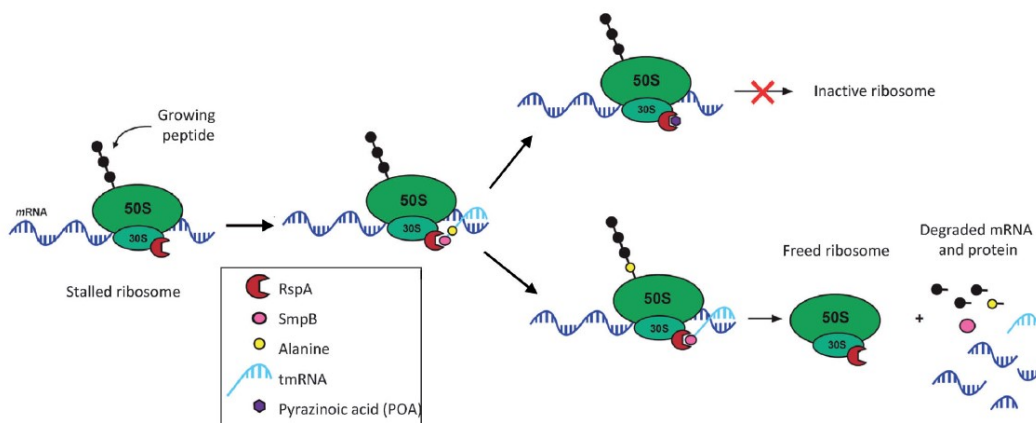


Figure 15 : Inhibition du phénomène de trans-traduction par l'acide pyrazinoïque selon Kalinda *et al.*⁷⁵

⁷² K. C. Keiler, *et al.*, *Biochimie* **2011**, 93 (11), 1993-1997.

⁷³ M. Thibonnier, *et al.*, *PLoS ONE* **2008**, 3 (11), e3810.

⁷⁴ K. C. Keiler, *Annual Review of Microbiology* **2008**, 62 (1), 133-151.

⁷⁵ A. S. Kalinda, *et al.*, *ChemMedChem* **2012**, 558-560.

Il a été montré que les souches résistantes au PZA perdent toute activité pyrazinamidase.⁴⁶ Les mutations au niveau du gène *pncA* sont les principales sources de résistance au PZA.^{76,77} Cependant, quelques souches résistantes au PZA, déficientes en activité PZase ne possédaient pas de mutation au niveau du gène *pncA*. Il a été fait l'hypothèse d'une mutation sur un gène régulateur inconnu du *pncA* pour expliquer ce résultat.⁷⁸

Les principaux effets secondaires observés sont une toxicité hépatique dose-dépendante, une hyperuricémie ainsi que des troubles digestifs.²

II.2.4 L'éthambutol

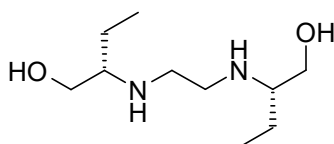


Figure 16 : Structure de l'éthambutol

L'éthambutol (EMB) (Figure 16) est un composé comportant un motif éthylènediamine découvert en 1961.⁷⁹ En plus de son utilisation dans le traitement de première intention de la tuberculose, l'EMB est utilisé pour traiter les infections à *M. avium*. Ce composé est bactériostatique aux doses utilisées. Ce n'est que plus tard que son action sur la biosynthèse des arabinogalactanes et des lipoarabinomannanes, principaux composants de la paroi membranaire, sera découverte.^{80,81} En 1996, Belanger *et al.*⁸² ont identifié la cible exacte de l'EMB, une arabinosyle transférase codée par le gène *embB*.

Chez *M. tuberculosis*, le gène *embB* forme un opéron avec les gènes *embA* et *embC* dans l'ordre *embCAB*. Les gènes *embA*, *embB*, *embC* partagent plus de 65% d'homologie. Les mutations au sein de l'opéron *embCAB* représentent près de 65% des cas de résistance à l'EMB.^{83,84} Plus

⁷⁶ A. Scorpio, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, 41 (3), 540-543.

⁷⁷ P. Juréen, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, 52 (5), 1852-1854.

⁷⁸ S.-J. Cheng, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, 44 (3), 528-532.

⁷⁹ J. P. Thomas, *et al.*, *Am Rev Respir Dis* **1961**, 83, 891-893.

⁸⁰ K. Takayama, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, 33 (9), 1493-1499.

⁸¹ K. Mikusová, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, 39 (11), 2484-2489.

⁸² A. E. Belanger, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, 93 (21), 11919-11924.

⁸³ S. Sreevatsan, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, 41 (8), 1677-1681.

récemment, Sharma *et al.*⁸⁵ ont montré que l'opéron *embCAB* était sous le contrôle du répresseur transcriptionnel EmbR, lui-même régulé par la sérine/thréonine kinase PknH. L'étude de l'influence de ces deux protéines sur la résistance à l'EMB est en cours.

La principale complication lors de la prise d'éthambutol est ophtalmologique, avec une névrite optique rétrobulbaire se manifestant initialement par un trouble de la vision des couleurs (dyschromatopsie) puis par une baisse de l'acuité visuelle.

II.2.5 La stréptomycine

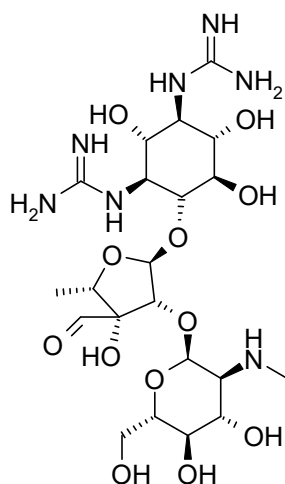


Figure 17 : structure de la stréptomycine.

La streptomycine (SM) (Figure 17) est un antibiotique de la famille des aminoglycosides.⁸⁶ Son spectre d'action est assez large, puisqu'elle est active à la fois sur des bactéries gram-positives et gram-négatives.⁸⁷ Son activité inhibitrice sur *M. tuberculosis*¹¹ a été découverte un an après la première extraction de la streptomycine à partir de cultures de *Streptomyces griseus*. La SM est bactéricide aux doses utilisées.

Dans les années 60, il a été montré que la SM interagissait avec la synthèse des protéines en empêchant la traduction de l'ARN⁸⁸ et en favorisant les erreurs de lecture du code génétique.⁸⁹ La SM

⁸⁴ A. Telenti, *et al.*, *Nature Medicine* **1997**, 3 (5), 567-570.

⁸⁵ K. Sharma, *et al.*, *Journal of Bacteriology* **2006**, 188 (8), 2936-2944.

⁸⁶ G. F. Busscher, *et al.*, *Chemical Reviews* **2005**, 105 (3), 775-792.

⁸⁷ D. Jones, *et al.*, *Science* **1944**, 100 (2588), 103-105.

⁸⁸ C. R. Spotts, *et al.*, *Nature* **1961**, 192 (4803), 633-637.

⁸⁹ J. Davies, *et al.*, *Molecular Pharmacology* **1965**, 1 (1), 93-106.

cible la protéine S12 de la sous unité ribosomale 30S ainsi que la sous-unité 16S de l'ARNr.⁹⁰ La liaison de la SM à la sous-unité 30S a été vérifiée par l'obtention de structures cristallographiques.⁹¹

Les mutations au sein des gènes *rpsL* (codant pour la protéine S12) et *rrs* (codant pour la sous-unité 16S de l'ARNr) sont les principales sources de résistance à la SM avec respectivement 50% et 20% de présence au sein de souches résistantes à la SM.^{62,92} Une résistance à la SM entraîne la plupart du temps une résistance aux autres aminoglycosides.⁹³

Actuellement, la streptomycine n'est plus utilisée en première intention dans de nombreux pays en raison de son administration parentérale exclusive, mais également de sa forte toxicité rénale et auditive.

II.3 Les traitements de seconde intention

Les composés utilisés en seconde intention possèdent bien souvent un rapport bénéfices / risques plus faible, ils sont préconisés dans le traitement de la tuberculose MDR.

Un classement de ces composés selon leur efficacité, la classe de médicament et l'expérience d'utilisation a été réalisé afin de faciliter le choix des médicaments lors de la mise en place d'un traitement de seconde intention.¹⁵ Ces médicaments sont divisés en cinq groupes et vont être présentés par la suite. Les principes à suivre selon l'OMS pour concevoir un traitement de seconde intention sont les suivants :

- Utiliser un cocktail d'au moins quatre antibiotiques auxquels le patient n'est pas résistant.
- Ne pas utiliser de médicaments pouvant présenter un phénomène de résistance-croisée.
- Eliminer les médicaments dont la sureté n'est pas assurée.
- Inclure au traitement les médicaments des groupes 1 à 5 dans l'ordre hiérarchique.

La majorité des traitements de seconde intention comporte entre cinq et sept antibiotiques. Les composés du groupe 5 ne sont pas recommandés par l'OMS pour une utilisation en routine. Ils ne sont utilisés que s'il n'est pas possible de constituer un traitement avec les groupes 1 à 4, ou en cas de tuberculose XDR.

⁹⁰ R. T. Garvin, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1974**, 71 (10), 3814-3818.

⁹¹ A. P. Carter, *et al.*, *Nature* **2000**, 407 (6802), 340-348.

⁹² M. Finken, *et al.*, *Molecular Microbiology* **1993**, 9 (6), 1239-1246.

⁹³ C. E. Maus, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, 49 (8), 3192-3197.

II.3.1 Groupe I : les composés de première intention

On retrouve dans ce groupe deux composés utilisés en première intention, le PZA et l'EMB, ainsi que les nouveaux analogues de la RIF comme la rifapentine ou la rifabutine (Figure 18).

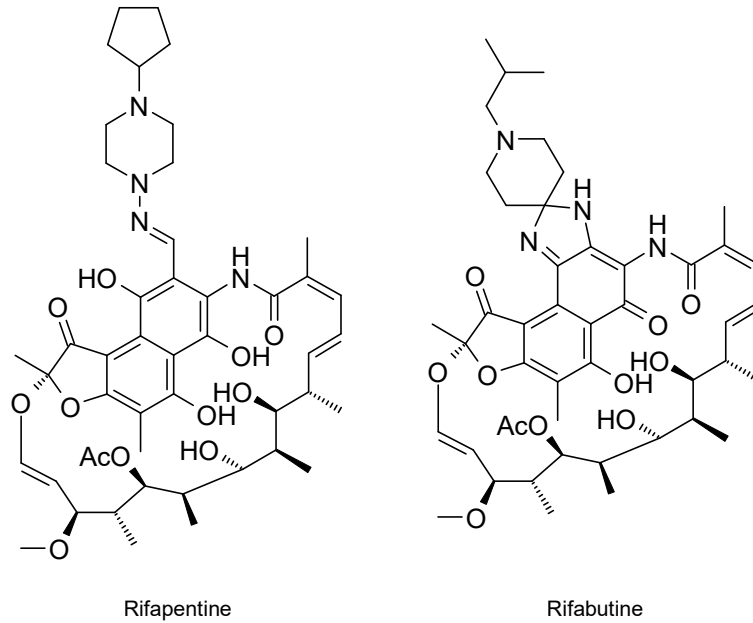


Figure 18 : Structure de la rifapentine et de la rifabutine.

Leur utilisation peut être utile en cas de souches résistantes à la rifampicine mais sensibles à ces deux composés.

II.3.2 Groupe II : les agents injectables

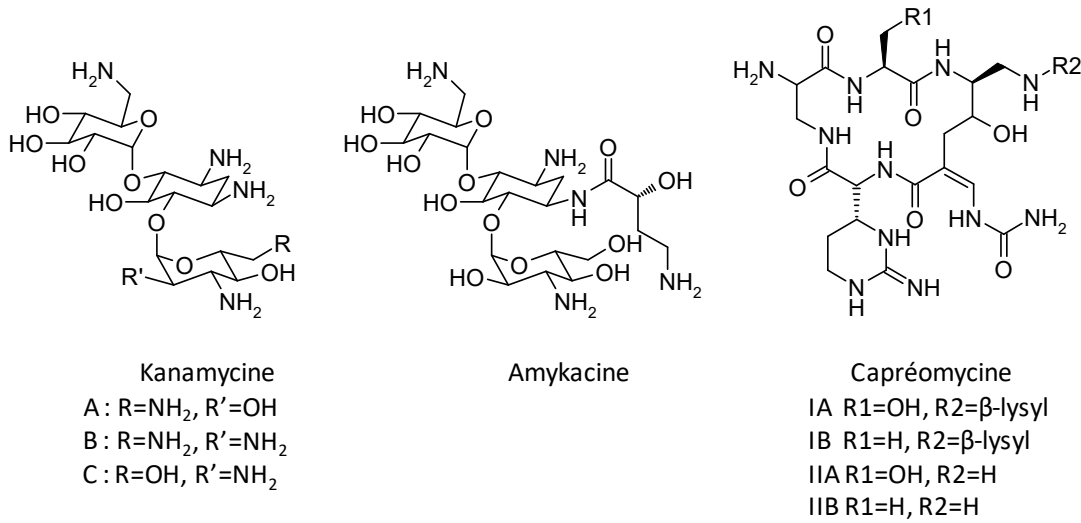


Figure 19 : Structure des composés du groupe II.

Le second groupe rassemble trois composés de la famille des aminoglycosides : la streptomycine (Figure 17), la kanamycine, l'amikacine et un polypeptide : la capréomycine (Figure 19). Ces trois derniers composés ont un mode d'action similaire à celui de la streptomycine, ils interagissent avec le ribosome et inhibent ainsi la synthèse protéique.^{94,95,96,97}

Les souches résistantes à cette classe de médicaments présentent le plus souvent des mutations au niveau du gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S. Il y a donc un fort risque de résistance croisée entre ces quatre composés, mais ceci n'est pas systématique. Par exemple, la kanamycine, l'amikacine et la capréomycine se sont déjà révélées actives sur des souches résistantes à la SM. On retrouve également des souches résistantes aux trois aminoglycosides mais sensibles à l'action de la capréomycine.⁹⁸

L'inactivation de la méthylase ribosomale TlyA, codée par le gène *tlyA*, est un autre phénomène de résistance, propre à la capréomycine.⁹⁴

L'OMS recommande que tous les patients traités pour la tuberculose MDR reçoivent un médicament du groupe 2. L'amikacine et la kanamycine sont les composés de premier choix et doivent être privilégiés si aucune résistance n'est suspectée. Dans le cas contraire, la capréomycine doit être utilisée à la place des aminoglycosides. Il est déconseillé d'utiliser simultanément deux médicaments de cette catégorie.

⁹⁴ S. K. Johansen, *et al.*, *Molecular Cell* **2006**, 23 (2), 173-182.

⁹⁵ *Tuberculosis* **2008**, 88 (2), 87-88.

⁹⁶ *Tuberculosis* **2008**, 88 (2), 117-118.

⁹⁷ *Tuberculosis* **2008**, 88 (2), 89-91.

⁹⁸ Y. I. Ho, *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1997**, 40 (1), 27-32.

II.3.3 Groupe III : les fluoroquinolones

Le troisième groupe rassemble les composés de la famille des fluoroquinolones. Les trois principales fluoroquinolones indiquées pour le traitement de la tuberculose sont la lévofloxacinine, la moxifloxacinine et l'ofloxacinine (Figure 20).

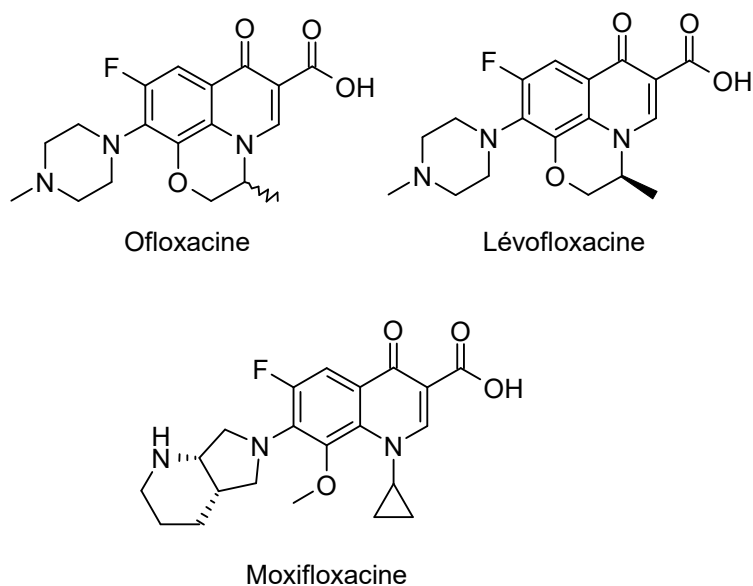


Figure 20 : Structures de l'ofloxacinine, la lévofloxacinine et de la moxifloxacinine.

La structure des fluoroquinolones dérive de celle de la chloroquine (Figure 21). Lors de la synthèse de la chloroquine, une impureté (Figure 21) possédant une faible activité antibactérienne sur les bactéries gram-négatives⁹⁹ a été découverte. La synthèse d'analogues¹⁰⁰ a permis la découverte de l'acide nalidixique, actif sur de nombreuses bactéries gram-négatives, donnant lieu aux quinolones de première génération.¹⁰¹ Par la suite, des quinolones de seconde et troisième générations, avec des spectres d'action beaucoup plus larges, actives sur les bactéries gram-positives, et en conditions anaérobies, ont été découvertes. Il existe actuellement un très grand nombre de fluoroquinolones à pouvoir antibactérien.⁹⁹

⁹⁹ L. A. Mitscher, *Chemical Reviews* **2005**, 105 (2), 559-592.

¹⁰⁰ G. Y. Leshner, *et al.*, *Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry* **1962**, 91, 1063-1065.

¹⁰¹ W. H. Deitz, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1963**, 161, 583-587.

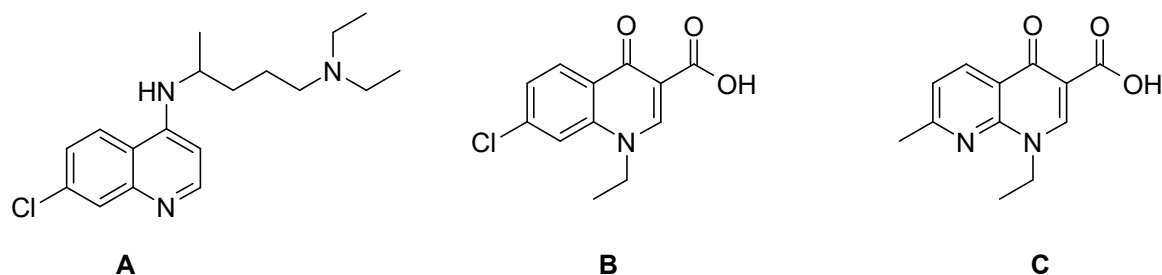


Figure 21 : Structures de la chloroquine (A), de l'impureté présente lors de sa synthèse (B) et de l'acide nalidixique (C).

Le mode d'action des fluoroquinolones n'était pas connu au moment de leur découverte et de leur première utilisation comme antibactérien. Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de l'ADN en se liant à la topoisomérase II¹⁰², une ADN-gyrase ATP-dépendante, et à la topoisomérase IV¹⁰³ ATP-dépendante.

Chez *M. tuberculosis* cependant, la topoisomérase IV n'est pas présente, ce qui explique pourquoi certaines quinolones à large spectre n'ont pas une activité antituberculeuse optimale. Ainsi, Aubry *et al.*¹⁰⁴ ont montré une très bonne corrélation entre l'activité inhibitrice de la topoisomérase II et l'effet sur la pousse mycobactérienne.

Les souches résistantes aux fluoroquinolones possèdent des mutations au niveau des gènes *gyrA* et *gyrB* codant pour les deux sous-unités de la topoisomérase II.¹⁰⁵

L'OMS recommande que tous les patients traités pour la tuberculose MDR reçoivent un médicament du groupe 3. Les fluoroquinolones de dernière génération comme la lévofloxacine et la moxifloxacine sont les composés de premier choix et doivent être privilégiés si aucune résistance n'est suspectée.

¹⁰² A. Sugino, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, 74 (11), 4767-4771.

¹⁰³ A. B. Khodursky, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (42), 27668-27677.

¹⁰⁴ A. Aubry, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, 48 (4), 1281-1288.

¹⁰⁵ H. E. Takiff, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, 38 (4), 773-780.

II.3.4 Groupe IV : les composés bactériostatiques administrés par voie orale

Le quatrième groupe rassemble des composés bactériostatiques, actifs par voie orale et possédant un faible indice thérapeutique. Pour venir compléter le traitement constitué avec les composés des groupes 1 à 3, on ajoute souvent l'éthionamide ou le prothionamide car ils sont plutôt bon marché. Si le coût n'est pas un problème, on préférera alors utiliser l'acide para-aminosalicylique (PAS), notamment grâce à l'absence de résistance croisée avec des médicaments d'autres groupes. Si deux agents du groupe 4 doivent être utilisés, on ajoutera la cylosérine ou son analogue la térizidone. Le PAS et l'éthionamide (ou le prothionamide) ne seront utilisés simultanément qu'en dernier recours si trois composés du groupe 4 sont nécessaires.

II.3.4.1 L'acide para-aminosalicylique

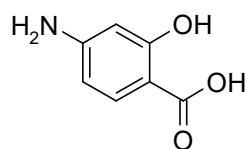


Figure 22 : Structure de l'acide para-aminosalicylique (PAS).

L'acide para-aminosalicylique (PAS) (Figure 22) a été utilisé dans le traitement de la tuberculose dès les années 40.¹⁰⁶ A partir de 1955, la combinaison INH-SM-PAS était le traitement de premier choix dans la lutte contre la tuberculose, diminuant fortement l'apparition de souches résistantes. Néanmoins, en raison de son efficacité moyenne et des effets secondaires gastro-intestinaux importants, l'utilisation du PAS a progressivement été abandonnée, avant de refaire surface pour le traitement de la tuberculose MDR. Actuellement, son mode d'action reste inconnu. Tout d'abord, en raison de sa ressemblance chimique avec l'acide para-aminobenzoïque, une action par inhibition de la dihydroptérate synthase a été envisagée, avant d'être infirmée.¹⁰⁷ Par la suite, des souches de *M. tuberculosis* résistantes au PAS possédant des mutations au niveau du gène *thyA*, codant pour la thymidilate synthase, ont été identifiées. Ceci semblait donc indiquer une inhibition de la synthèse de la thymidine monophosphate. Cependant, deux récentes publications ont remis en cause cette hypothèse.^{108,109} Il existe une troisième hypothèse de mode d'action selon laquelle le PAS

¹⁰⁶ L. Jörgen, *The Lancet* **1946**, 247 (6384), 15-16.

¹⁰⁷ V. Nopponpunth, *et al.*, *Journal of Bacteriology* **1999**, 181 (21), 6814-6821.

¹⁰⁸ S. Feuerriegel, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, 54 (11), 4794-4798.

¹⁰⁹ V. Mathys, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, 53 (5), 2100-2109.

diminuerait l'assimilation de fer par la bactérie en inhibant la synthèse de la mycobactine, impliquée dans le transport du fer.^{110,111,112,113}

II.3.4.2 Cycloserine et Terizidone

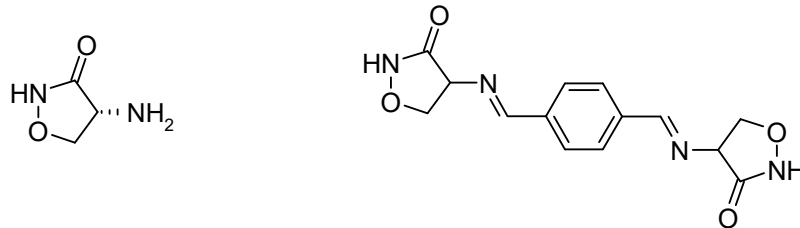


Figure 23 : Structures de la D-cycloserine et de la térizidone

La D-cycloserine (Figure 23), historiquement isolée à partir de cultures de *Streptomyces orchidaceus* est un analogue cyclique de la D-alanine, un composant essentiel dans la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne.

L'alanine naturellement disponible de configuration L est transformée par l'enzyme alanine racémase (Alr) en D-alanine qui sert de substrat à la D-alanine/D-alanine ligase (Ddl). La D-cyclosérine mime l'alanine et agit en inhibant à la fois les enzymes Alr et Ddl.^{114,115}

L'inactivation chez *M. smegmatis* des deux gènes *alrA*¹¹⁶ et *ddl*¹¹⁷, codant respectivement pour les enzymes Alr et Ddl, provoque une augmentation de la sensibilité à la D-cycloserine. Inversement, la surexpression de ces deux enzymes¹¹⁵ confère aux souches de *M. smegmatis* une résistance à la D-cycloserine, avec un caractère plus marqué pour l'Alr, indiquant que cette enzyme pourrait être la cible principale de la D-cycloserine. Néanmoins, les mécanismes de résistances exacts à cet antibiotique sont encore mal connus.

¹¹⁰ C. Ratledge, *et al.*, *American Review of Respiratory Disease* **1972**, 106 (5), 774-776.

¹¹¹ K. A. Brown, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1975**, 385 (2), 207-220.

¹¹² T. Adilakshmi, *et al.*, *Journal of Bacteriology* **2000**, 182 (2), 264-271.

¹¹³ R. Colin, *Tuberculosis* **2004**, 84 (1-2), 110-130.

¹¹⁴ H. L. David, *et al.*, *American Review of Respiratory Disease* **1969**, 100 (4), 579-581.

¹¹⁵ Z. Feng, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, 47 (1), 283-291.

¹¹⁶ O. Chacon, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, 46 (1), 47-54.

¹¹⁷ A. E. Belanger, *et al.*, *Journal of Bacteriology* **2000**, 182 (23), 6854-6856.

La ressemblance structurale de la D-cycloserine avec certains acides aminés neuro-exciteurs¹¹⁸ est probablement à l'origine de sa toxicité au niveau du système nerveux central, ce qui rend la synthèse d'analogues difficile et risquée. Cependant, la récente résolution de la structure cristallographique de l'Alr¹¹⁹ permet d'envisager la conception d'inhibiteurs allostériques, sans analogie de structure avec la D-cycloserine et donc dépourvus de ses effets secondaires importants sur le système nerveux central.

II.3.4.3 Les thioamides

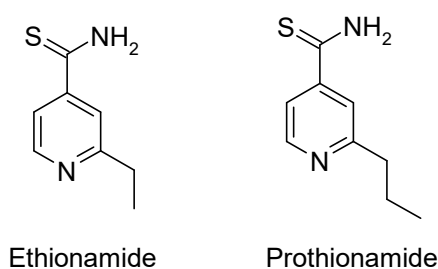


Figure 24 : Structures de l'éthionamide et du prothionamide.

Tout comme l'isoniazide, l'éthionamide (ETH) et le prothionamide (PTH) (Figure 24) sont des analogues dérivés du nicotinamide découverts dans les années 50, inhibant la biosynthèse des acides mycoliques.¹²⁰

Ce sont des prodrogues dont la bioactivation est réalisée par la monooxygénase EthA.^{121,122} Une fois activées, elles viennent inhiber la synthèse des acides mycoliques par inhibition de l'enzyme InhA³³, tout comme l'isoniazide. Il a été mis en évidence la présence d'un répresseur transcriptionnel, EthR, qui régule la production d'EthA et donc l'activité des prodrogues que cette protéine active.^{121,123}

Les travaux rapportés dans cette thèse consistent à développer des ligands de ce répresseur transcriptionnel EthR. Les différents mécanismes d'activation et de régulation de l'éthionamide seront donc présentés plus en détails à la fin de ce chapitre.

¹¹⁸ L. T. Thompson, *et al.*, *Nature* **1992**, 359 (6396), 638-641.

¹¹⁹ P. LeMagueres, *et al.*, *Biochemistry* **2005**, 44 (5), 1471-1481.

¹²⁰ F. G. Winder, *et al.*, *Journal of General Microbiology* **1971**, 66 (3), 379-380.

¹²¹ A. E. DeBarber, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, 97 (17), 9677-9682.

¹²² T. A. Vannelli, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277 (15), 12824-12829.

¹²³ A. R. Baulard, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275 (36), 28326-28331.

II.4 La stratégie DOTS

Le programme DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course) mis en place par l'OMS depuis 1995 a fourni des lignes directrices afin de lutter contre la tuberculose. Cette stratégie repose sur des points essentiels parmi lesquels :

- L'approvisionnement continu des centres de soins en médicaments de qualité.
- L'uniformisation du traitement au niveau international, basé sur la poly-chimiothérapie présentée précédemment, visant à réduire les temps et l'efficacité des traitements.
- Le traitement sous surveillance directe et accompagnement du patient tout au long du traitement.
- L'examen bactériologique systématique lors du dépistage.
- L'engagement des pouvoirs publics dans cette lutte contre la tuberculose.
- La mise en place d'un système d'enregistrement et de centralisation des données permettant de suivre l'efficacité du programme.

Ce programme a pour but de limiter l'apparition des formes résistantes de la maladie, en uniformisant les traitements et en guidant les états dans leur politique de santé contre la tuberculose. L'OMS estime qu'entre 1996 et 2010, 55 millions de personnes ont été traitées selon le programme DOTS, permettant ainsi de sauver près de 7 millions de vies.

Aujourd'hui le programme DOTS s'inscrit dans un programme encore plus large « Halte à la tuberculose », qui compte de nouveaux objectifs :

- La lutte efficace contre le fléau que représente la coinfection SIDA/tuberculose.
- L'implication et sensibilisation de tous les personnels de santé.
- Le soutien de la recherche contre la tuberculose.

Ce programme comprend en plus des objectifs chiffrés précis pour 2015 et 2050 :

- Réduction d'ici 2015 de la prévalence et du nombre de décès de 50% par rapport au seuil de 1990.
- Suppression de la tuberculose comme problème de santé publique d'ici 2050 (cela représente une incidence globale d'un cas pour un million).

Actuellement, on observe que l'objectif pour 2015 devrait être atteint dans toutes les régions du monde hormis en Afrique.

II.5 Conclusion : limites des traitements existants et besoins

La grande majorité des molécules composant aujourd'hui l'arsenal thérapeutique a été découverte dans les années 1950 et 1960. L'utilisation prolongée de ces composés (aucune nouvelle molécule n'a été mise sur le marché pour le traitement de la tuberculose depuis 40 ans), les temps de traitements relativement longs et les nombreux effets secondaires associés aux lourdes poly-chimiothérapies prescrites ont entraîné l'apparition de formes extrêmement résistantes.

Heureusement, de nombreux efforts ont été réalisés ces dernières années pour permettre le développement de nouveaux antituberculeux. Il y a actuellement plus de composés en phase d'essais cliniques que lors des 40 dernières années et on peut donc espérer voir arriver prochainement de nouveaux outils afin d'améliorer la lutte contre la tuberculose.

III Les composés en développement

III.1 Les composés en Phase III

Deux composés sont actuellement en phase III^{124,125}, il s'agit des fluoroquinolones moxifloxacine et gatifloxacine (Figure 25). Les différentes caractéristiques des fluoroquinolones ont été présentées dans la section II.3.3.

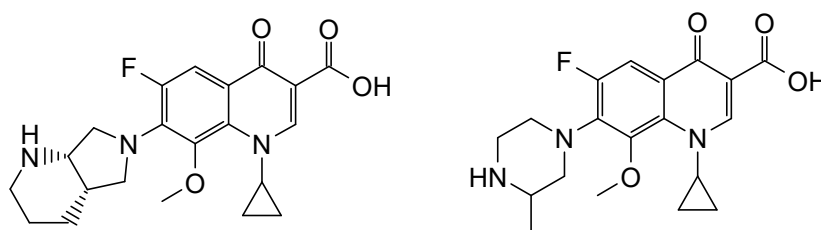


Figure 25 : Structure de la moxifloxacine (à gauche) et de la gatifloxacine (à droite).

III.2 Les composés en Phase II

III.2.1 TMC207

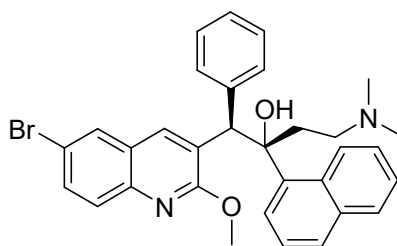


Figure 26 : Structure du composé TMC207.

TMC207 (Figure 26), également connu sous le nom de R207910 ou Bedaquiline, est un nouvel antituberculeux de la famille des biaryl-quinoléines. Ce composé a été découvert par la société Johnson&Johnson lors d'un criblage cellulaire sur *M. smegmatis* et est actuellement développé par la société Tibotec en collaboration avec la Tb alliance.

¹²⁴ Gatifloxacin (NCT ID: NCT00216385).

¹²⁵ Moxifloxacin (NCT ID: NCT00864383).

Il se lie à la sous-unité c de l'ATP synthase, codée par le gène *atpE*, inhibant ainsi la pompe à proton de l'ATP synthase mycobactérienne.^{126,127} TMC207 est sélectif de l'ATP synthase mycobactérienne vis-à-vis de l'ATP synthase des mitochondries humaines.¹²⁸

TMC207 est actuellement le plus avancé des composés en phase II, son entrée en phase III est prévue courant 2012, où des tests sur des patients atteints de tuberculose XDR sont programmés.¹²⁹

III.2.2 Les nitroimidazoles

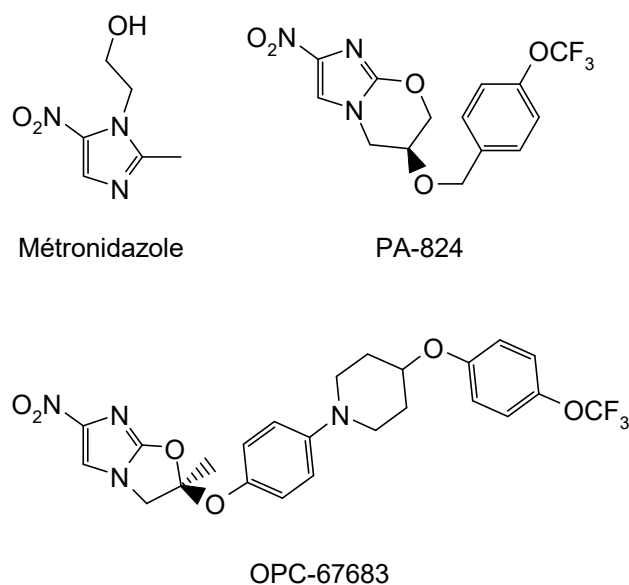


Figure 27 : Structures du Métronidazole, de PA-824 et d'OPC-67683.

Le métronidazole (Figure 27) est un médicament actuellement utilisé dans le traitement des infections par protozoaires et bactéries anaérobies. C'est justement en raison de cette activité sur les organismes anaérobies que le métronidazole a été envisagé comme composé intéressant pour le traitement des bacilles « dormants » de la tuberculose, responsables des rechutes et des longs temps de traitement.^{130,131}

¹²⁶ K. Andries, *et al.*, *Science* **2005**, 307 (5707), 223-227.

¹²⁷ A. Koul, *et al.*, *Nature Chemical Biology* **2007**, 3 (6), 323-324.

¹²⁸ A. C. Haagsma, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, 53 (3), 1290-1292.

¹²⁹ TMC207 (NCT ID: NCT01464762).

¹³⁰ D. I. Edwards, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1979**, 5 (5), 499-502.

¹³¹ L. G. Wayne, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, 38 (9), 2054-2058.

Malgré une faible efficacité sur certains modèles *in vitro* ou *in vivo*¹³², le NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) a décidé de conduire une étude clinique de phase II en Corée du Sud afin d'évaluer l'impact du métronidazole sur le traitement de première intention actuel.¹³³

Les composés PA-824 et OPC-67683 (Delamanid) (Figure 27) sont des analogues cycliques du métronidazole. Ces deux composés sont actifs à la fois sur les bacilles aérobies et anaérobies. Ces deux activités sont supposées provenir de deux mécanismes d'action différents. Il a été montré qu'ils agissent tous les deux sur la biosynthèse des acides mycoliques.^{134,135} Cependant, il est peu probable que ce mécanisme d'action soit à l'origine de leur activité sur les bacilles anaérobies. PA-824 et OPC-67683 sont tous deux des prodrogues qui sont réduites par la glucose-6-phosphate déshydrogénase F₄₂₀-dépendante (FGD1) et la nitroréductase Rv3547 déazaflavine-dépendante.^{136,134} Ceci expliquerait la résistance de *M. leprae*, dépourvu de cette enzyme, à PA-824. Lors de la bioréduction de PA-824, le métabolite majoritairement formé est le composé des-nitro (Figure 28) entraînant dans le même temps une libération de monoxyde d'azote qui serait responsable de l'activité sur les bacilles anaérobies.¹³⁷ Cette hypothèse a été confirmée récemment¹³⁸ par une étude montrant que PA-824 a une activité similaire à certains poisons respiratoires comme le cyanure, en inhibant la production d'ATP par inhibition du cytochrome c-oxidase.

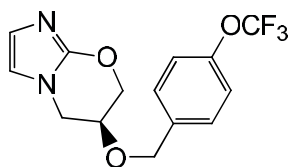


Figure 28 : Métabolite des-nitro du composé PA-824.

¹³² J. V. Brooks, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, 43 (5), 1285-1288.

¹³³ Metronidazole (NCT ID: NCT00425113).

¹³⁴ M. Matsumoto, *et al.*, *PLoS Med* **2006**, 3 (11), 1285-1288.

¹³⁵ C. K. Stover, *et al.*, *Nature* **2000**, 405 (6789), 962-966.

¹³⁶ U. H. Manjunatha, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, 103 (2), 431-436.

¹³⁷ R. Singh, *et al.*, *Science* **2008**, 322 (5906), 1392-1395.

¹³⁸ U. Manjunatha, *et al.*, *Communicative and Integrative Biology* **2009**, 2 (3), 215-8.

Une étude de phase II ayant pour but d'évaluer la toxicité et les paramètres pharmacocinétiques de la molécule OPC-67683 chez les patients atteints de tuberculose MDR est en cours.¹³⁹ Une étude Phase III sur des patients atteints de tuberculose MDR est également planifiée pour commencer en 2012.¹⁴⁰

Le composé PA-824 est quant à lui évalué en phase II en combinaison avec la moxifloxacine et le PZA chez des patients atteints de tuberculose MDR.¹⁴¹

III.2.3 SQ109

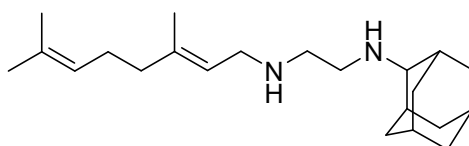


Figure 29 : Structure du SQ-109.

Le composé SQ109 (Figure 29) est un analogue de l'éthambutol découvert par criblage d'une chimiothèque de plus de 60 000 dérivés de l'éthylènediamine.^{142,143} Il est actif sur les souches de *M. tuberculosis* résistantes à l'éthambutol¹⁴², suggérant un mode d'action différent. Une étude a montrée une surproduction de l'ADN/ARN hélicase ATP-dépendante ainsi qu'une inhibition de la β -kétolacyle ACP-synthase.¹⁴⁴

SQ109 est actuellement en phase IIa pour le traitement de la tuberculose mais également pour le traitement de l'ulcère gastro-duodénal causé par *Helicobacter pylori*.^{145,146}

¹³⁹ OPC-67683 (NCT ID: NCT01131351).

¹⁴⁰ OPC-67683 (NCT ID: NCT01424670).

¹⁴¹ PA-824 (NCT ID: NCT01498419).

¹⁴²M. Protopopova, *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, 56 (5), 968-974.

¹⁴³ R. E. Lee, *et al.*, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2003**, 5 (2), 172-187.

¹⁴⁴ L. Jia, *et al.*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, 315 (2), 905-911.

¹⁴⁵ SQ109 (NCT ID: NCT01218217).

¹⁴⁶ SQ109 (NCT ID: NCT01252108).

III.2.4 Les oxazolidinones

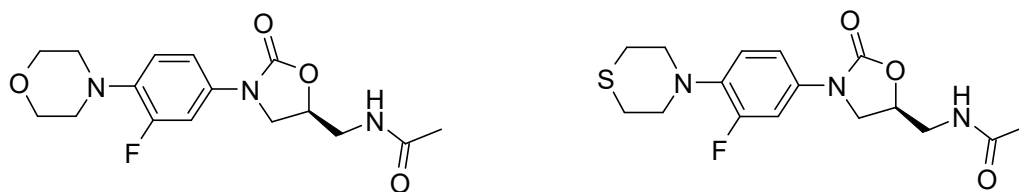


Figure 30 : Structure du Linézolide et de PNU-100480.

Le linézolide (Figure 30) a tout d'abord été utilisé dans le traitement des infections à bactéries gram-négatives.¹⁴⁷ Ce composé de la classe des (S)-oxazolidin-2-one a par la suite montré une forte activité contre des souches sensibles ou résistantes de *M. tuberculosis*.^{148,149} Les oxazolidinones perturbent la production des protéines bactériennes en se liant à l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S.¹⁵⁰

Aucune résistance croisée entre cette famille de composés et les autres antituberculeux n'a été rapportée pour l'instant.

Malgré les nombreux effets secondaires rapportés lors de traitements de longue durée, le linézolide est actuellement en phase II, mais est déjà utilisé off-label dans le traitement de la tuberculose MDR et XDR.^{151,152,153}

Le composé PNU-100480 (Figure 30), possédant une structure chimique très proche du linézolide, est environ trois fois plus actif que ce dernier *in vitro*, mais également moins toxique. Les métabolites sulfone et sulfoxyde du PNU-100480 sont également actifs.^{154,155} Chez des patients sains, PNU-100480 n'as présenté aucune toxicité apparente.¹⁵⁶ Il est actuellement évalué en phase IIa.¹⁵⁷

¹⁴⁷ S. J. Brickner, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39 (3), 673-679.

¹⁴⁸ L. Alcalá, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, 47 (1), 416-417.

¹⁴⁹ J. C. Rodríguez, *et al.*, *International Journal of Antimicrobial Agents* **2002**, 20 (6), 464-467.

¹⁵⁰ Y. Zhang, *et al.*, *Drug Discovery Today* **2006**, 11 (1-2), 21-27.

¹⁵¹ G. F. Schecter, *et al.*, *Clinical Infectious Diseases* **2010**, 50 (1), 49-55.

¹⁵² Linezolid (NCT ID: NCT00727844).

¹⁵³ Linezolid (NCT ID: NCT01521364).

¹⁵⁴ M. R. Barbachyn, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39 (3), 680-685.

¹⁵⁵ J. W. C. Alffenaar, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, 55 (3), 1287-1289.

¹⁵⁶ R. S. Wallis, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, 55 (2), 567-574.

¹⁵⁷ PNU-100480 (NCT ID: NCT01225640).

III.3 Les composés en Phase I

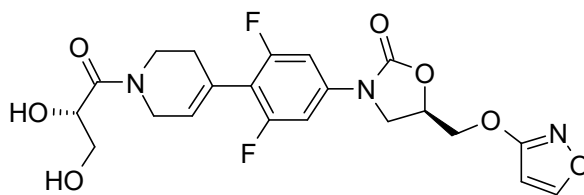


Figure 31 : Structure de l'AZD5847.

Développée par AstraZeneca, la molécule AZD5847 (ou AZD2563) (Figure 31) est la seule actuellement en phase I., Elle fait également partie de la famille des oxazolidinones et devrait entrer en phase IIa courant 2012.¹⁵⁸

¹⁵⁸ AZD5847 (NCT ID: NCT01516203).

IV Approches par potentialisation de médicaments existants.

IV.1 Stratégie

Comme nous venons de le voir, un certain nombre de composés sont actuellement en développement clinique et certains peuvent même espérer entrer sur le marché très prochainement. Cependant, le développement de ces molécules représente un coût extrêmement élevé et il existe un risque important d'émergence rapide de formes résistantes, qui risquent de limiter fortement l'utilité du nouveau médicament. Une approche alternative au développement de nouveaux composés antituberculeux réside dans le concept de potentialisation de l'activité de médicaments déjà existants en ciblant les mécanismes de résistance.

Cette approche, qui repose sur la connaissance des différents mécanismes de résistance a pour but de re-sensibiliser les bactéries aux antibiotiques devenus inefficaces. Elle représente actuellement une stratégie non négligeable pour le développement de nouveaux composés anti-infectieux.

Ainsi, un médicament devenu inactif peut retrouver son efficacité par co-administration avec un composé (aussi appelé « booster ») permettant de lever le mécanisme de résistance associé (Figure 32).¹⁵⁹

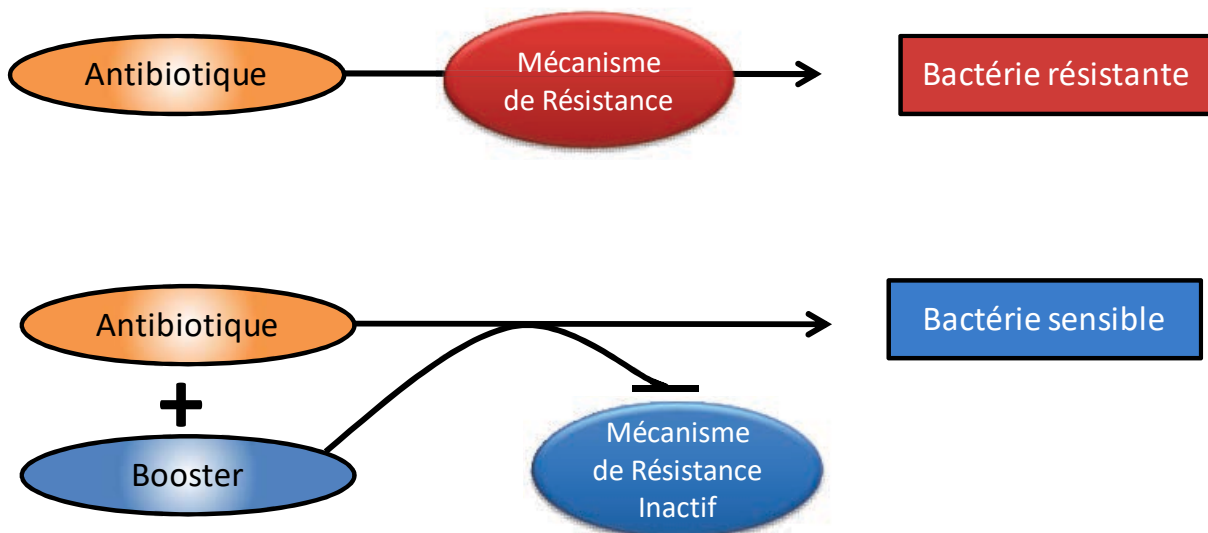


Figure 32 : Représentation du concept de potentialisation par inhibition des phénomènes de résistance.

¹⁵⁹ G. D. Wright, et al., *Trends in molecular medicine* 2007, 13 (6), 260-267.

Dans le cas de la tuberculose, les traitements sont très contraignants et l'apparition de formes résistantes est un réel danger. Une telle approche pourrait s'avérer bénéfique et permettre potentiellement:

- de diminuer les doses prescrites, ce qui conduirait à une polychimiothérapie moins contraignante.
- de diminuer les temps de traitement relativement long par augmentation de l'efficacité des composés.
- de prolonger le temps d'utilisation des antituberculeux déjà connus en passant outre les phénomènes de résistance.

Cette stratégie a déjà été développée avec les β -lactames et les inhibiteurs de β -lactamases.

IV.2 Cas des β -lactames

IV.2.1 Généralités

La classe d'antibiotiques la plus répandue est celle des β -lactames. Elle comprend les pénicillines, les monobactames, les céphalosporines et les carbapénèmes (Figure 33). Les β -lactames interagissent avec la synthèse du peptidoglycane, un composant essentiel de la paroi bactérienne (p.37) tant chez les bactéries Gram-positive que Gram-négative.¹⁶⁰ Le peptidoglycane est largement polymérisé grâce aux protéines de la famille des PLP (Protéines Liant les Pénicillines). Les β -lactames sont des amides cycliques possédant un cycle azétidine, structure proche de certains précurseurs dans la synthèse du peptidoglycane. Les PLP peuvent alors utiliser les β -lactames comme substrats, ce qui entraîne une inhibition irréversible et donc une inactivation de l'enzyme, stoppant ainsi la biosynthèse du peptidoglycane et entraînant la mort cellulaire.

Le principal mécanisme de résistance développé contre les β -lactames est l'hydrolyse de la fonction amide de ces composés par des β -lactamases.

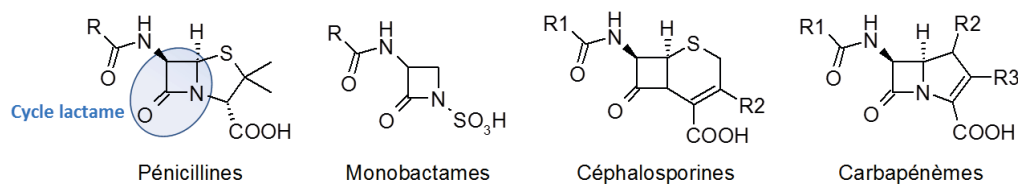


Figure 33 : Structure générale des 4 familles de β -lactames.

¹⁶⁰ A. L. Koch, *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, 16 (4), 673-687.

Le seul exemple de potentialisation par inhibition d'un mécanisme de résistance est actuellement l'utilisation des inhibiteurs de β -lactamases utilisés pour prolonger la durée de vie des β -lactames. La co-administration des β -lactames avec des inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam (Figure 34, A) permet de maintenir la sensibilité du pathogène à l'antibiotique.¹⁶¹ Ces composés inhibent les β -lactamases de manière irréversible en se liant de manière covalente (Figure 34, B).

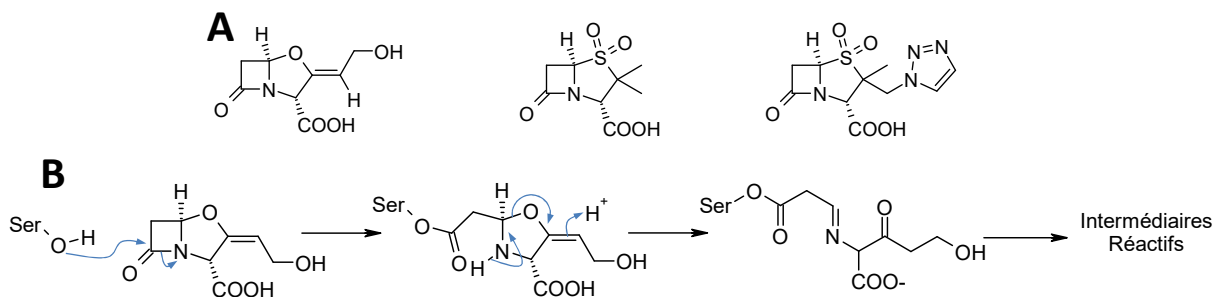


Figure 34 : A) Structures de l'acide clavulanique, du sulbactam et du tazobactam. B) Mécanisme de la réaction entre l'acide clavulanique et une β -lactamase.

IV.2.2 β -lactames et *Mycobacterium tuberculosis*

Les β -lactames sont les antibiotiques les plus largement répandus mais ont toujours été pour le moment inefficaces pour lutter contre la tuberculose. La résistance des mycobactéries aux β -lactames reposerait essentiellement sur trois phénomènes : l'incapacité des composés à traverser l'épaisse membrane bactérienne^{162,163}, l'affinité ou non des β -lactames pour les PLP mycobactériennes et la dégradation des composés par les β -lactamases.^{163,164}

Enfin, *M. tuberculosis* se développant de manière intracellulaire, les composés doivent être capables de traverser les parois des cellules du système immunitaire en plus de l'épaisse paroi de *M. tuberculosis*.

Bien que la pénétration des β -lactames à travers la paroi des mycobactéries soit cent fois plus lente qu'à travers celle d'*Escherichia coli*¹⁶², elle est compensée par la vitesse de croissance très faible de *M. tuberculosis*. Ainsi, la capacité des β -lactames à traverser la membrane mycobactérienne est un

¹⁶¹ S. M. Drawz, *et al.*, *Clinical Microbiology Reviews* **2010**, 23 (1), 160-201.

¹⁶² H. F. Chambers, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, 39 (12), 2620-2624.

¹⁶³ V. Jarlier, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1991**, 35 (9), 1937-1939.

¹⁶⁴ B. Quinting, *et al.*, *FEBS letters* **1997**, 406 (3), 275-278.

point important mais qui n'est pas responsable des phénomènes de résistance de la bactérie aux β -lactames. L'affinité des composés pour les PLP ne semble également pas responsable de ce phénomène de résistance. En effet, il a été démontré que de nombreux β -lactames possèdent une affinité pour une PLP de *M. smegmatis*.¹⁶⁵ Finalement, il a été démontré que l'activité des β -lactamases des mycobactéries était essentiellement responsable de la résistance des mycobactéries aux β -lactames. Ainsi, une activité β -lactamase a été identifiée pour toutes les mycobactéries, excepté *M. fallax* qui montre d'ailleurs une hypersensibilité aux β -lactames.¹⁶⁴ La β -lactamase principale chez *M. tuberculosis* est BlaC.^{166,167} Cette enzyme possède un large spectre de substrats (céphalosporines et pénicillines) grâce à un site de liaison particulièrement flexible. Deux autres β -lactamases encodées par les gènes *rv0406c* et *rv3677c* ont également été identifiées.¹⁶⁸ Bien que l'activité β -lactamase chez *M. tuberculosis* soit peu élevée par rapport à celle d'autres pathogènes, elle suffit à protéger la bactérie de l'action des β -lactames, la diffusion de ces derniers à travers la paroi de la mycobactérie étant très lente.

IV.2.3 Potentialisation des β -lactames chez *Mycobacterium tuberculosis*

Nous venons de voir que l'activité β -lactamase est la principale cause de résistance de *M. tuberculosis* aux β -lactames. De plus, il a été montré qu'en l'absence d'activité β -lactamase, *M. tuberculosis* et *smegmatis* présentent une hypersensibilité aux β -lactames.¹⁶⁹ Il est donc envisageable de rendre *M. tuberculosis* sensible aux β -lactames par suppression de l'activité β -lactamase à l'aide d'inhibiteurs.

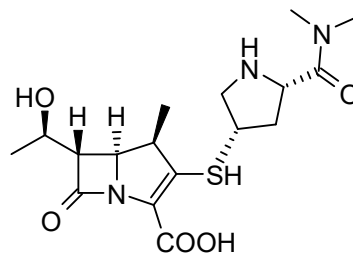


Figure 35 : Structure du méropénème.

¹⁶⁵ T. Mukherjee, *et al.*, *Biochemical Journal* **1996**, 320 (1), 197-200.

¹⁶⁶ R. K. R. Voladri, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, 42 (6), 1375-1381.

¹⁶⁷ F. Wang, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2006**, 50 (8), 2762-2771.

¹⁶⁸ K. M. Nampoothiri, *et al.*, *Journal of Applied Microbiology* **2008**, 105 (1), 59-67.

¹⁶⁹ A. R. Flores, *et al.*, *Microbiology* **2005**, 151 (2), 521-532.

Ainsi, la combinaison méropénème/acide clavulanique (Figure 34, Figure 35) s'est révélée très efficace *in vitro* contre les souches aérobies ou anaérobies et même XDR de *M. tuberculosis*.¹⁷⁰

Cette stratégie a également été validée chez des patients atteints de tuberculose MDR où la combinaison amoxicilline/acide clavulanique s'est révélée aussi efficace que l'ofloxacine.¹⁷¹

Enfin, en présence de linézolide, la combinaison méropénème/acide clavulanique a permis la guérison d'un cas de tuberculose XDR.¹⁷²

Ces premiers résultats permettent d'envisager l'utilisation des β -lactames et des inhibiteurs de β -lactamases pour le traitement des souches résistantes de *M. tuberculosis*. De nombreux carbapénèmes doivent encore être testés en combinaison avec différents inhibiteurs de β -lactamase. De plus, la connaissance des β -lactamases de *M. tuberculosis* permet d'envisager la conception d'inhibiteurs spécifiques plus efficaces sur la base de leur structure cristallographique. Enfin, la production de la β -lactamase BlaC étant régulée par la présence d'un répresseur transcriptionnel BlaI¹⁷³, on peut envisager d'augmenter la sensibilité de *M. tuberculosis* aux β -lactames en empêchant la dissociation de BlaI et du promoteur *blaC*.¹⁷⁴

IV.3 Cas de l'éthionamide

Nous l'avons déjà vu, l'éthionamide (ETH) est une prodrogue utilisée dans le traitement des formes résistantes de la tuberculose. Elle agit, comme l'INH, en interférant avec la biosynthèse des acides mycoliques par inhibition de l'énoyl-ACP réductase InhA. En raison de cette cible commune et de la proximité de structure entre ces deux composés, il a longtemps été envisagé qu'ils partageaient un processus d'activation et un mécanisme d'action communs. Cependant, la découverte de souches résistantes à l'INH possédant des mutations sur l'enzyme KatG, responsable de la bioactivation de l'INH, mais sensibles à l'ETH, a laissé suggérer un mécanisme d'action différent pour les deux prodrogues.

¹⁷⁰ J.-E. Hugonnet, *et al.*, *Science* **2009**, 323 (5918), 1215-1218.

¹⁷¹ H. F. Chambers, *et al.*, *Clinical Infectious Diseases* **1998**, 26 (4), 874-877.

¹⁷² N. Dauby, *et al.*, *The Pediatric Infectious Disease Journal* **2011**, 30 (9), 812-813.

¹⁷³ C. Sala, *et al.*, *Molecular Microbiology* **2009**, 71 (5), 1102-1116.

¹⁷⁴ K. A. Wolff, *et al.*, *InTech* **2011**.

IV.3.1 Découverte de l'enzyme EthA

C'est en 2000 que DeBarber *et al.*¹²¹ et Baulard *et al.*¹²³ ont mis en évidence l'implication de la monooxygénase EthA, codée par le gène *ethA*, dans l'activation de l'éthionamide. Ainsi, ces équipes ont montré qu'une surproduction d'EthA chez *M. smegmatis* conduit à une sensibilité accrue de ces souches à l'ETH. Inversement, des souches cliniques isolées de patients d'Afrique du Sud possédant des mutations au niveau du gène *ethA* perdent leur sensibilité à l'ETH. En 2002, Vannelli *et al.*¹²² ont purifié la protéine et montré qu'EthA est une enzyme de 55kDa, fortement exprimée au niveau membranaire, de la famille des flavoprotéines monooxygénases. Elle est capable de réaliser des oxydations de typer Bayer-Villiger mais également des oxydations énantiométriques de sulfure en sulfoxyde.¹⁷⁵ Néanmoins, son rôle physiologique exact reste encore à déterminer.

IV.3.2 Bioactivation de l'éthionamide

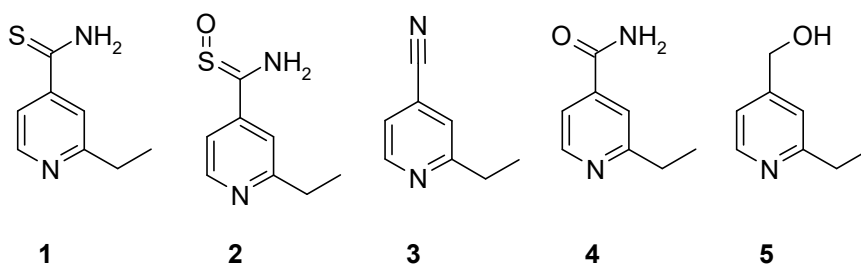


Figure 36 : Structure de l'éthionamide (1) et des principaux métabolites observés *in vitro*.

Lors de deux études menées par DeBarber *et al.*¹²¹ et Vanelli *et al.*¹²² différents dérivés de l'ETH ont été isolés par CCM ou HPLC (Figure 36). La première étape lors de l'activation de l'ETH est la formation de l'espèce S-oxyde (2). Cependant, ce composé possède une activité aussi importante que l'ETH, ce qui laisse penser qu'il est lui-même repris en charge par EthA pour donner le nitrile (3), le carboxamide (4), ainsi que l'alcool primaire (5) qui ont également été détectés lors de ces études, et qui sont quant à eux inactifs. Leur inactivité laisse supposer que ces composés ont été formés à partir du produit d'activation de l'espèce S-oxyde lors des techniques de CCM ou d'HPLC utilisées pour leur isolation.

DeBarber *et al.* ont même proposé un schéma d'activation de l'ETH expliquant la formation des différents produits observés (Figure 37). Cette voie d'activation de l'ETH met en jeu les espèces

¹⁷⁵ M. W. Fraaije, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279 (5), 3354-3360.

S-oxyde et acide sulfinique comme le suggéraient Vannelli *et al.* Il est probable que cet acide sulfinique ou le radical imine formés soient à l'origine des différents composés détectés.

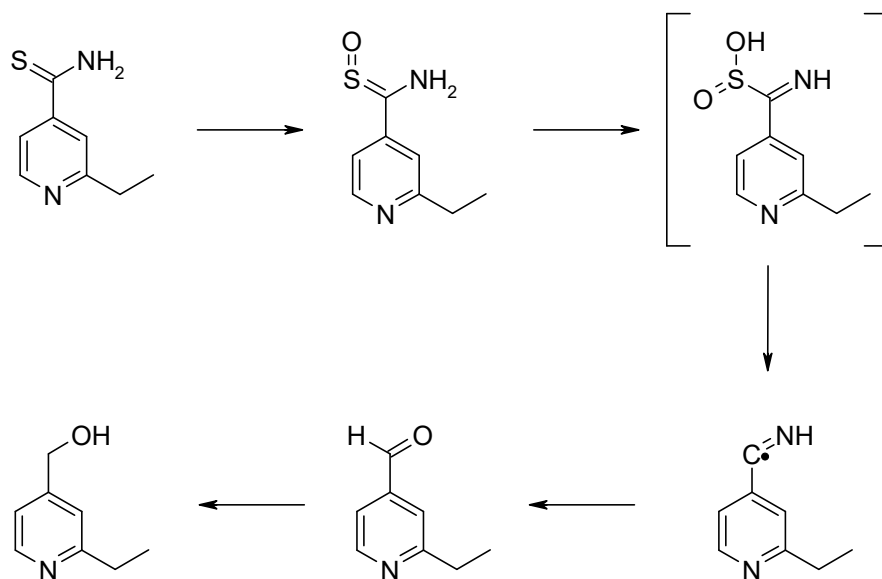


Figure 37 : Mécanisme d'activation de l'ETH selon DeBarber *et al.*¹²¹

Plus récemment, Hanouille *et al.*¹⁷⁶ ont proposé un mécanisme d'activation de l'ETH (Figure 38) suite à leurs études de suivi du métabolisme de l'ETH par une technique de RMN non-invasive : la RMN HRMAS (High Resolution Magic Angle Spin). L'utilisation d'une telle technique permet de s'affranchir de la possible altération des espèces formées lors de leur isolation et identification par des techniques comme la CCM ou l'HPLC. Ainsi, Hanouille *et al.* ont observé la formation des espèces S-oxyde et alcool primaire, exclusivement présentes au niveau extracellulaire et d'une autre espèce ETH* seulement détectable à l'intérieur de la cellule et formée de manière dépendante du temps et du taux d'expression d'EthA.

Dans ce modèle, lors de l'activation de l'ETH par EthA au niveau de la membrane, il y a soit formation de l'espèce activée ETH*, qui s'accumule car incapable de traverser la paroi bactérienne, soit formation du dérivé S-oxyde qui lui, est expulsé de la bactérie. Ce dérivé peut lui-même être activé par EthA pour donner soit ETH*, soit l'alcool primaire qui est également efflué de la bactérie.

¹⁷⁶ X. Hanouille, *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, 58 (4), 768-772.

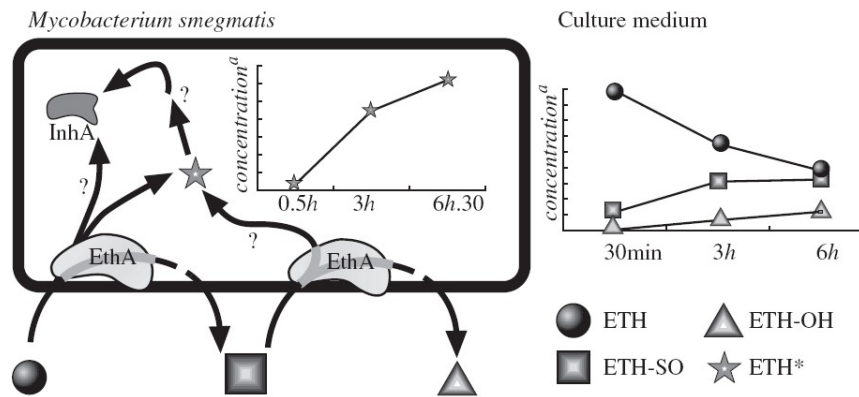


Figure 38 : Modèle d'activation de l'éthionamide selon Hanouille *et al.*¹⁷⁶

Enfin, plus récemment, Wang *et al.*¹⁷⁷ ont montré que dans les cas de l'ETH et du PTH, comme pour l'INH, le composé qui interagit avec l'enzyme InhA est un adduit entre le NAD et un dérivé d'ETH, PTH ou INH. Les trois adduits obtenus avec les différentes prodrogues ont des structures (Figure 39) et des activités inhibitrices¹⁷⁷ très similaires, et interagissent donc de la même façon avec InhA (Figure 40).

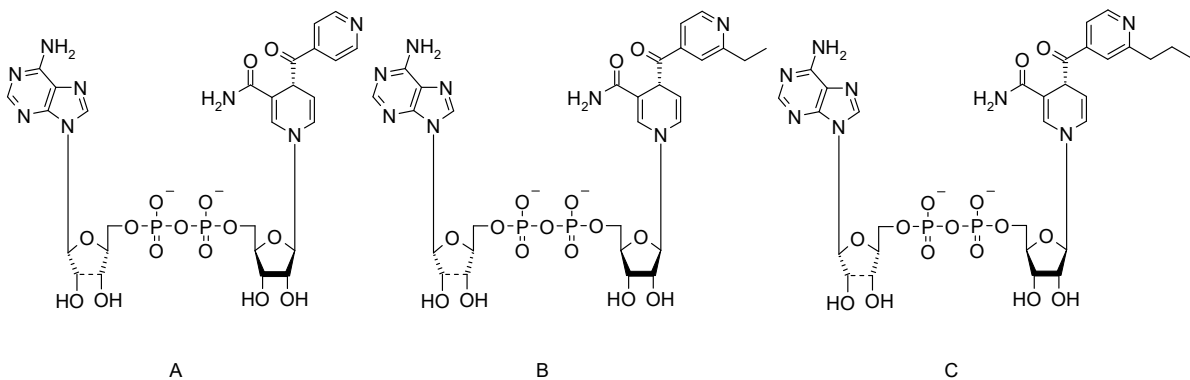


Figure 39 : Structure des adduits NAD-INH (A), NAD-ETH (B) et NAD-PTH (C).

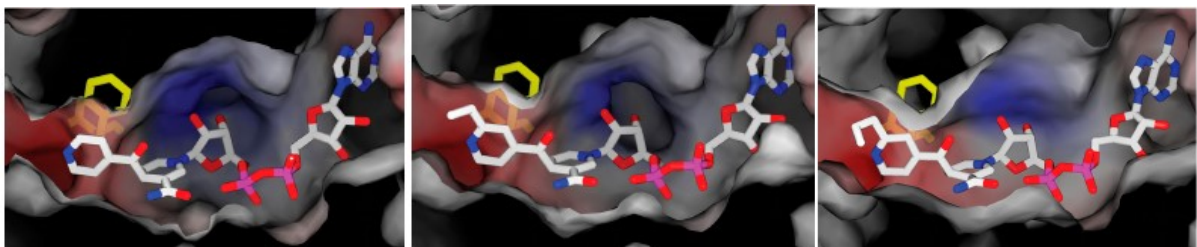


Figure 40 : Structures cristallographiques obtenues entre InhA et les adduits NAD-INH, NAD-ETH et NAD-PTH.

¹⁷⁷ F. Wang, *et al.*, *The Journal of Experimental Medicine* 2007, 204 (1), 73-78.

IV.3.3 Régulation de l'activité de l'éthionamide

IV.3.3.1 Rôle de la protéine EthR

Des souches surexprimant le gène *ethA* montrent une sensibilité accrue à l'ETH, indiquant que dans des conditions normales, il est possible qu'une faible proportion seulement de l'ETH soit activée. En effet, simultanément à la découverte du gène *ethA*, un second gène appelé *ethR* et impliqué dans l'activité de l'éthionamide, a été identifié. Les gènes *ethA* et *ethR* sont distants de 76 paires de bases. La surexpression d'*ethR* chez *M. smegmatis* ou *M. tuberculosis* confère une forte résistance à l'ETH mais n'influe pas sur la synthèse des acides mycoliques, indiquant que la protéine EthR intervient plutôt au niveau de l'activation de l'ETH.^{121,123}

IV.3.3.2 Structure de la protéine EthR

Le gène *ethR* possède une forte homologie de séquence avec les gènes codant pour les répresseurs transcriptionnels de la famille TetR.¹⁷⁸ Le rôle des répresseurs transcriptionnels consiste à réguler la transcription de certains gènes en fonction des contraintes subies par la bactérie. Par la suite, il s'est avéré que ce gène code bien pour un répresseur transcriptionnel qui inhibe la transcription d'*ethA* en se fixant au niveau de son promoteur.¹⁷⁹

Les répresseurs de la famille TetR se présentent sous la forme d'homodimères, où chaque monomère possède neuf ou dix hélices- α . On distingue deux régions différentes :

- Le domaine HTH (Helix-Turn-Helix) formé des hélices 1 à 3 est responsable de la fixation à l'ADN. Tous les répresseurs de la famille TetR partagent une forte analogie de séquence et de structure tridimensionnelle du domaine HTH.

- Le reste des hélices forme la partie centrale de la protéine, possédant le domaine de régulation ainsi que la zone de dimérisation. Ici on ne retrouve quasiment aucune conservation de séquence entre les différents membres de la famille. Il est supposé qu'un inducteur spécifique de chaque répresseur peut venir se lier à cette région non conservée de la protéine, induire un changement conformationnel au

¹⁷⁸ H. Aramaki, *et al.*, *Protein Engineering* **1995**, 8 (12), 1259-1266.

¹⁷⁹ J. Engohang-Ndong, *et al.*, *Molecular Microbiology* **2004**, 51 (1), 175-188.

niveau du domaine HTH et ainsi libérer l'opérateur de son répresseur, autorisant la transcription du gène en question.¹⁸⁰

IV.3.3.3 Structure dimérique de la protéine EthR

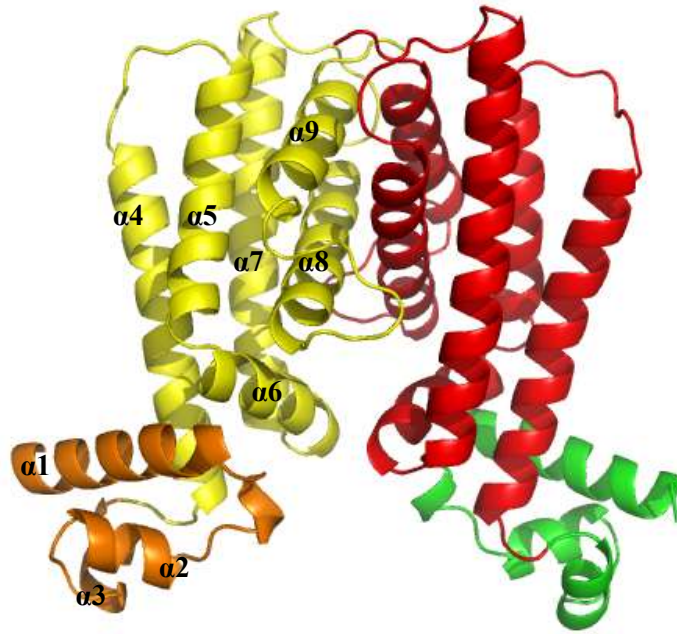


Figure 41 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine EthR sous forme d'homodimère.

La structure tridimensionnelle de la protéine EthR de *M. tuberculosis* a été décrite en 2004 de manière indépendante par deux équipes.^{181,182} Ces deux structures, comme toutes celles décrites jusqu'à présent pour la protéine EthR wild-type sont des structures ligandées. Les ligands sont l'octanoate d'hexadécyle pour la structure décrite par Frénois *et al.* (code PDB : 1U9N) et deux molécules supposées de 1,4-dioxane pour la structure décrite par Dover *et al.* (code PDB : 1T56).

Comme pour les autres répresseurs de la famille TetR, EthR se présente sous la forme d'un homodimère (Figure 41).

¹⁸⁰ J. L. Ramos, *et al.*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2005**, 69 (2), 326-356.

¹⁸¹ L. G. Dover, *et al.*, *Journal of Molecular Biology* **2004**, 340 (5), 1095-1105.

¹⁸² F. Frénois, *et al.*, *Molecular Cell* **2004**, 16 (2), 301-307.

IV.3.3.3.1.1 Etude du domaine de régulation

La partie supérieure de la protéine formée des hélices 4 à 9 (Figure 41) présente un tunnel long d'une vingtaine d'angströms et formé d'une grande majorité de résidus hydrophobes. Néanmoins, ce tunnel possède une zone polaire non chargée constituée de deux asparagines (Asn179 et Asn176, Figure 42).

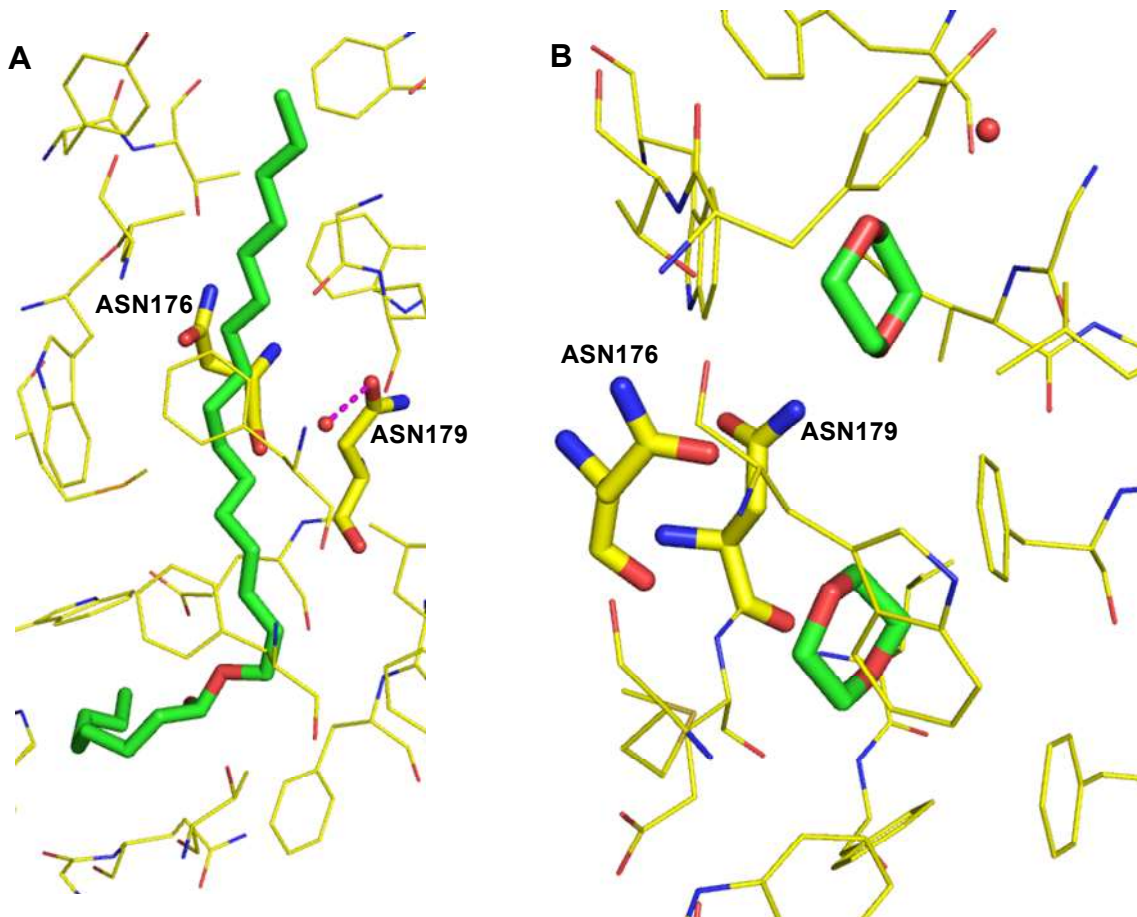


Figure 42 : Occupation du domaine de régulation d'EthR par l'octanoate d'héxadécyle (A)¹⁸¹ ou par deux molécules de dioxane (B)¹⁸².

La molécule d'octanoate d'héxadécyle occupe la totalité du domaine de régulation (Figure 42, A). Dans cette structure, l'Asn179 lie une molécule d'eau.

Les deux molécules supposées de 1,4-dioxane se lient de part et d'autre des deux résidus asparagine.

IV.3.3.3.1.2 Etude du domaine HTH

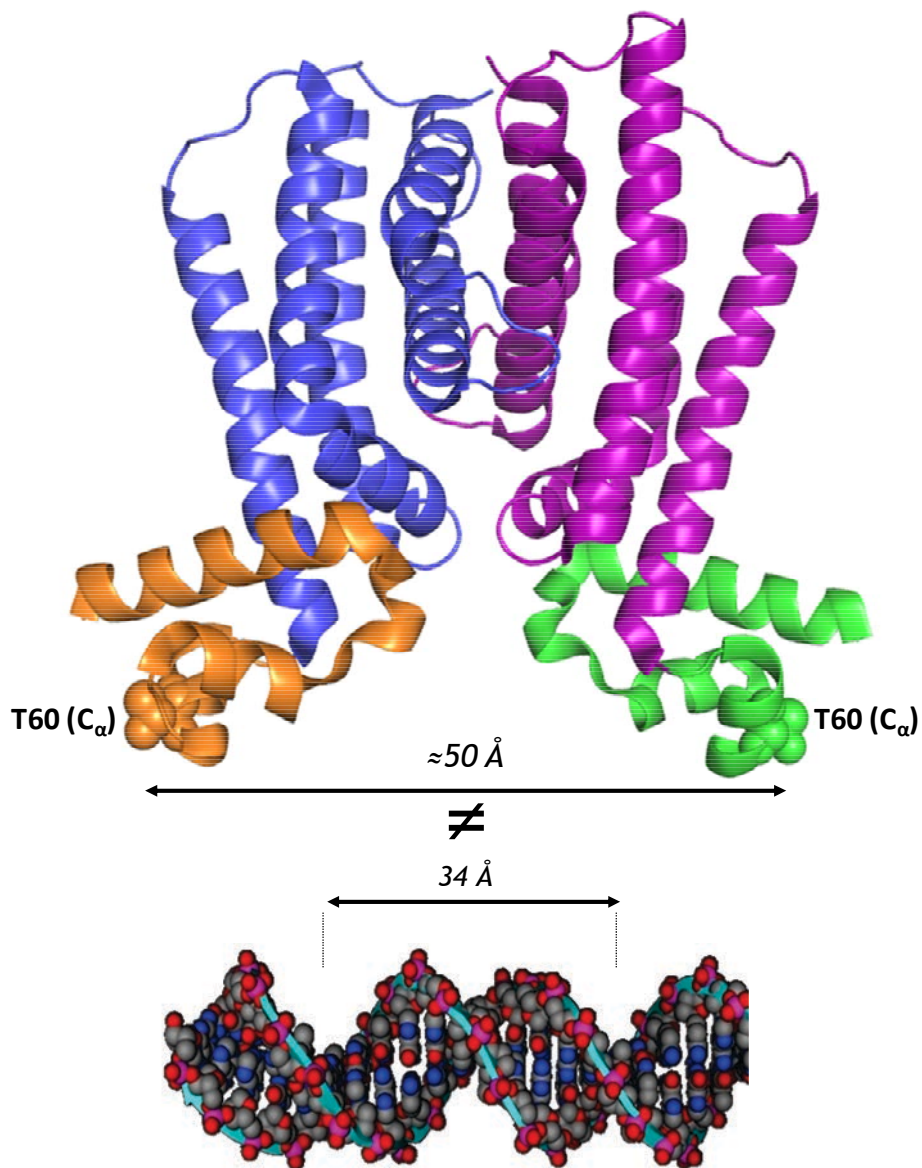


Figure 43 : Représentation de la protéine EthR sous forme dimérique. En bleu et violet sont représentés les domaines de régulation. En vert et orange sont représentés les deux domaines HTH. La protéine est représentée dans son état ligandé.

Les domaines HTH sont constitués des hélices α 1 à 3 (Figure 43). Dans les deux structures cristallographiques présentées précédemment, la protéine se trouve toujours dans un état ligandé. Dans cette conformation, la distance entre les deux domaines HTH de chaque monomère (mesurée entre les deux carbones α des thréonines 60) est de l'ordre de 50 \AA . Or, la distance entre les deux grands sillons de l'ADN est de l'ordre de 34 \AA . Autrement dit, dans sa configuration ligandée la protéine n'est pas capable de venir se fixer sur l'ADN et de jouer son rôle de répresseur.

IV.3.3.4 Validation de la protéine EthR comme cible thérapeutique

Le principal inconvénient de l'ETH est son faible index thérapeutique, provoquant de nombreux effets secondaires. L'ETH est une prodrogue bioactivée par l'enzyme EthA dont la production est sous le contrôle du répresseur transcriptionnel EthR (Figure 44).

Comme nous l'avons vu, dans son état ligandée, la protéine EthR n'est plus capable de venir se fixer sur les grands sillons de l'ADN et ne peut donc plus jouer son rôle de répresseur. De plus, l'inactivation de la protéine EthR par KO génétique a pour conséquence une augmentation de la production d'EthA et donc une hypersensibilisation de la bactérie à l'ETH.¹²³

Ces deux résultats ont permis d'envisager l'inactivation d'EthR à l'aide de petits inhibiteurs venant occuper le domaine de régulation, afin de potentialiser l'activité de l'éthionamide. Le but recherché étant l'utilisation à plus faible dose de ce médicament, tout en améliorant son efficacité et son index thérapeutique (Figure 44).

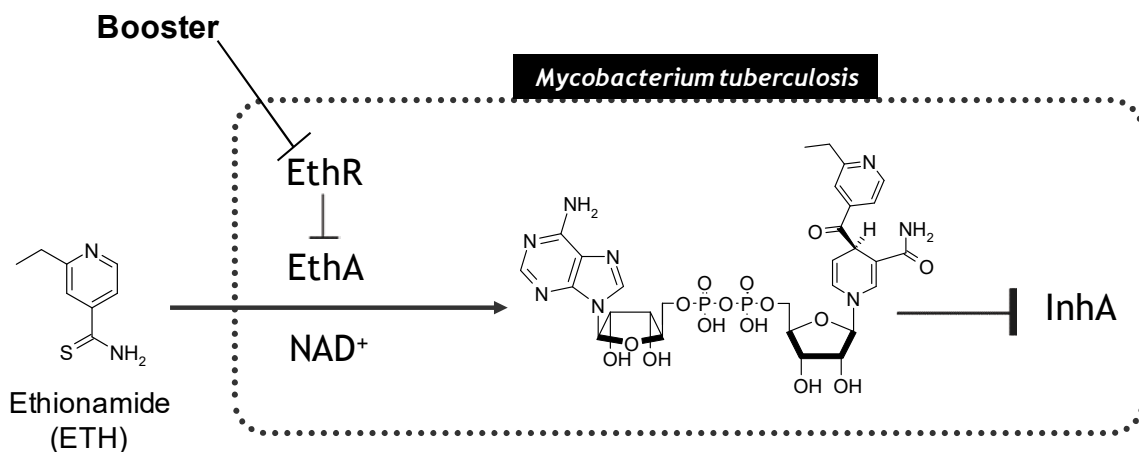


Figure 44 : Stratégie envisagée : trouver un inhibiteur « drug-like » d'EthR, également appelé Booster pour lever la répression d'*ethA*.

IV.4 Développement d'inhibiteurs de la protéine EthR

Deux approches différentes ont été développées en parallèle par deux groupes de recherche. La première utilise la structure du ligand identifié dans la structure cristallographique 1U9N de la protéine. La seconde stratégie est basée sur la conception d'un pharmacophore à partir de la structure du domaine de régulation.

IV.4.1 Approche basée sur la structure de ligands connus

En 2008, Weber *et al.*¹⁸³ ont décrit le criblage d'analogues de l'octanoate d'héxadécyle possédant un caractère plus « drug-like », dans un test cellulaire. Ce test permet de mettre en évidence à la fois le caractère inhibiteur de la protéine EthR des composés, mais également leur cytotoxicité ainsi que leur capacité à traverser les membranes cellulaires. Ce dernier point est particulièrement important car comme nous l'avons vu précédemment, *M. tuberculosis* est un pathogène qui se développe à l'intérieur des cellules du système immunitaire.

Le butyrate de 2-phényléthyle (Figure 45) a ainsi été identifié comme inhibiteur d'EthR non cytotoxique.

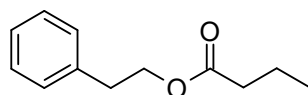


Figure 45 : Structure du butyrate de 2-phényléthyle.

Des analogues de ce composé possédant des fonctions amides ou thioamides sont actuellement développés par la société Bioversys afin d'identifier un potentiel candidat préclinique.^{184,185}

¹⁸³ W. Weber, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105 (29), 9994-9998.

¹⁸⁴ M. Fussenegger, *et al.*, **2009**, (12/808801).

¹⁸⁵ T. Grau, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2012**, 56 (2), 1142-1145.

IV.4.2 Approche basée sur la structure du domaine de régulation

IV.4.2.1 Hypothèse de pharmacophore

Sur la base des observations faites sur la nature du domaine de régulation (Figure 42), il a été envisagé que des composés capables à la fois d'interagir *via* des liaisons hydrogène avec les deux asparagines Asn176 et Asn179 (de manière identique à la molécule d'eau dans la structure avec l'octanoate d'héxadécyle) mais également avec le reste de la poche par des interactions hydrophobes (à la place des molécules de dioxane) pourraient engendrer une conformation inactive de la protéine. Le profil retenu pour la sélection d'inhibiteurs potentiels d'EthR a donc été le suivant : molécules de poids moléculaire inférieur à 500g.mol⁻¹, possédant deux extrémités hydrophobes reliées par un linker d'une longueur allant de 4 à 6Å, capable d'effectuer des liaisons hydrogène avec les asparagines Asn176 et Asn179.

Ainsi, 131 composés présentant une forte diversité structurale et répondant aux critères des règles de Lipinski ont été sélectionnés au sein d'une chimiothèque de composés « drug-like ».

IV.4.2.2 Découverte d'un hit et preuve de concept *in vivo*.

La capacité de ces 131 molécules à inhiber l'interaction entre EthR et son opérateur a été évaluée à l'aide du test fonctionnel de RPS (Résonance Plasmonique de Surface) qui sera présenté en détails dans le chapitre suivant. Ce test permet de quantifier *in vitro* les cinétiques d'association et de dissociation du répresseur sur son opérateur ADN, ainsi que la capacité des composés à inhiber cette association. Un composé (BDM14500, Figure 46) a été retenu suite à ce criblage. Il présentait une IC₅₀ de 38µM dans les conditions du test.

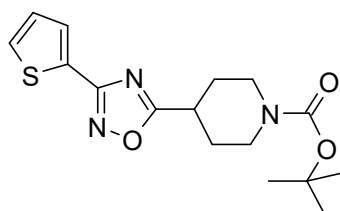


Figure 46 : Structure du composé BDM14500

Ce composé a ensuite été co-cristallisé avec la protéine EthR. Les données ainsi obtenues ont révélé la présence d'une molécule enchâssée dans chacune des deux cavités hydrophobes du répresseur dimérique. Comme postulé, le cycle oxadiazole interagit par une liaison hydrogène avec la

chaîne latérale de l'asparagine 179 (Figure 47). Les cycles thiophène et pipéridine se lient dans les deux poches hydrophobes occupées par les cycles dioxane dans la structure présentée précédemment (Figure 42). Ces deux cavités hydrophobes sont constituées des résidus Phe184, Leu183, Trp138 et Met142 d'une part et par les résidus Trp207, Leu87, Trp103 et Ile107 d'autre part. Le groupement Boc occupe quant à lui l'entrée de la poche de liaison et interagit avec les résidus hydrophobes Val152, Tyr148, Met102 et Leu87. Cette association à la protéine a effectivement pour conséquence d'induire un écartement des domaines HTH de plus de 50Å, ce qui empêche la protéine de se fixer à l'ADN, la distance entre deux grands sillons étant de 34Å.

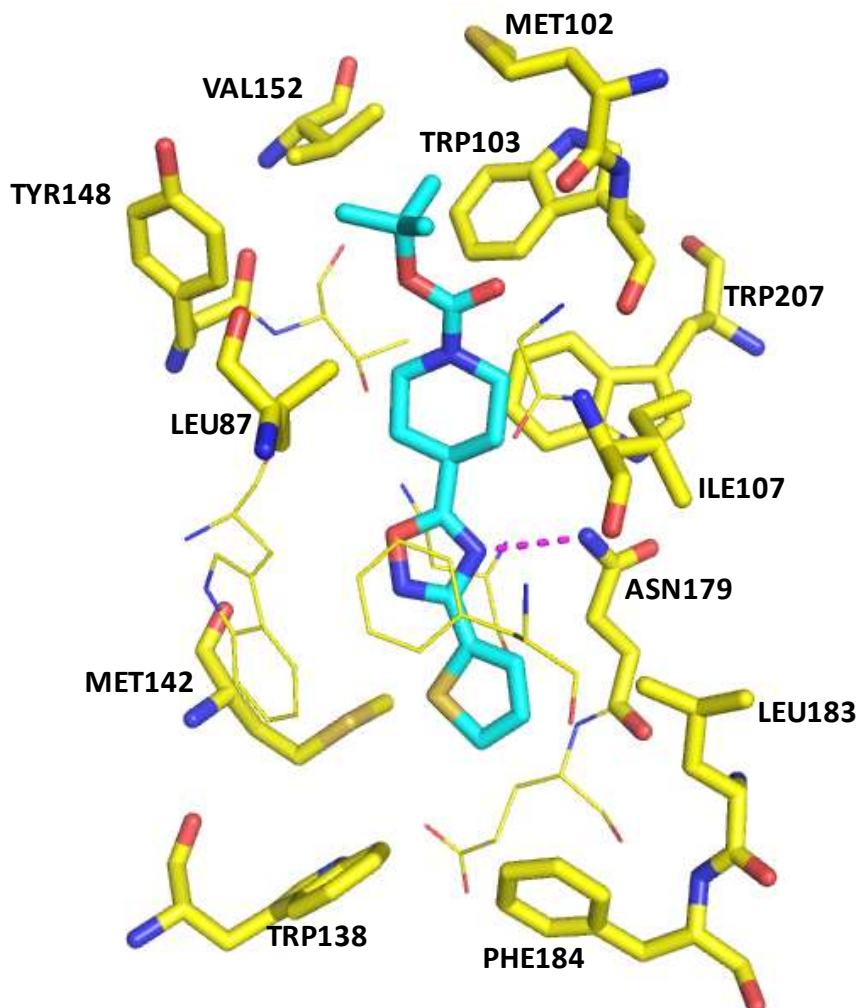


Figure 47 : Mode de liaison du composé BDM14500 à la protéine EthR obtenu par co-cristallisation.

Après avoir démontré que BDM14500 est un ligand de la protéine EthR, capable d'inhiber sa fixation à l'ADN, sa capacité à potentialiser l'activité bactéricide de l'éthionamide a été évaluée. Ainsi, la CMI mesurée pour l'éthionamide seule sur des souches de *M.tuberculosis* H37Rv est de 1µg/mL contre 0.25µg/mL en présence de BDM14500 à 200µM. BDM14500 n'a montré en revanche aucune activité antibactérienne s'il est utilisé seul.

La famille de composés issus du hit BDM14500 sera appelée famille « Lead1 » tout au long de ce mémoire. La synthèse d'analogues de BDM14500 a permis d'aboutir à des composés plus puissants, avec comme chef de file le composé BDM31343 (Figure 48). Ce composé est 11 fois plus actif que BDM14500 (IC_{50} de $3.3\mu\text{M}$ sur le test d'inhibition de l'interaction EthR/ADN).¹⁸⁶

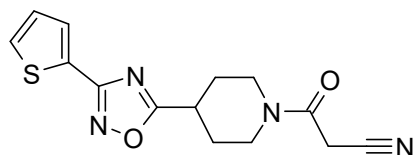


Figure 48 : Structure du composé BDM31343.

Une expérience *in vivo* chez des souris infectées par *M. tuberculosis* a été conduite avec ce composé afin de valider le concept de potentialisation de l'éthionamide comme stratégie thérapeutique contre la tuberculose.

Ainsi, la co-administration journalière d'ETH (3mg/kg) et de BDM31343 (100mg/kg) pendant trois semaines a permis une réduction de la charge bactérienne de 98.5%. La quantité nécessaire d'ETH administrée seule pour obtenir ce même effet a été de 9 mg/kg. Ces premiers résultats ont montré qu'il était possible de potentialiser d'un facteur trois l'activité de l'éthionamide *in vivo* par co-administration avec un ligand de la protéine EthR.¹⁸⁶ Ceci a permis la validation du répresseur EthR comme cible thérapeutique de premier choix.

¹⁸⁶ N. Willand, *et al.*, *Nature Medicine* **2009**, 15 (5), 537-544.

IV.4.2.3 Optimisation vers un candidat médicament

Après avoir validé le concept de potentialisation de l'ETH en présence d'un inhibiteur d'EthR, afin de pouvoir réduire les doses d'antibiotiques tout en conservant l'activité antibactérienne, de nouveaux analogues du composé BDM31343 ont été synthétisés pour aboutir à de nouvelles molécules encore plus actives et avec de meilleures propriétés pharmacocinétiques.

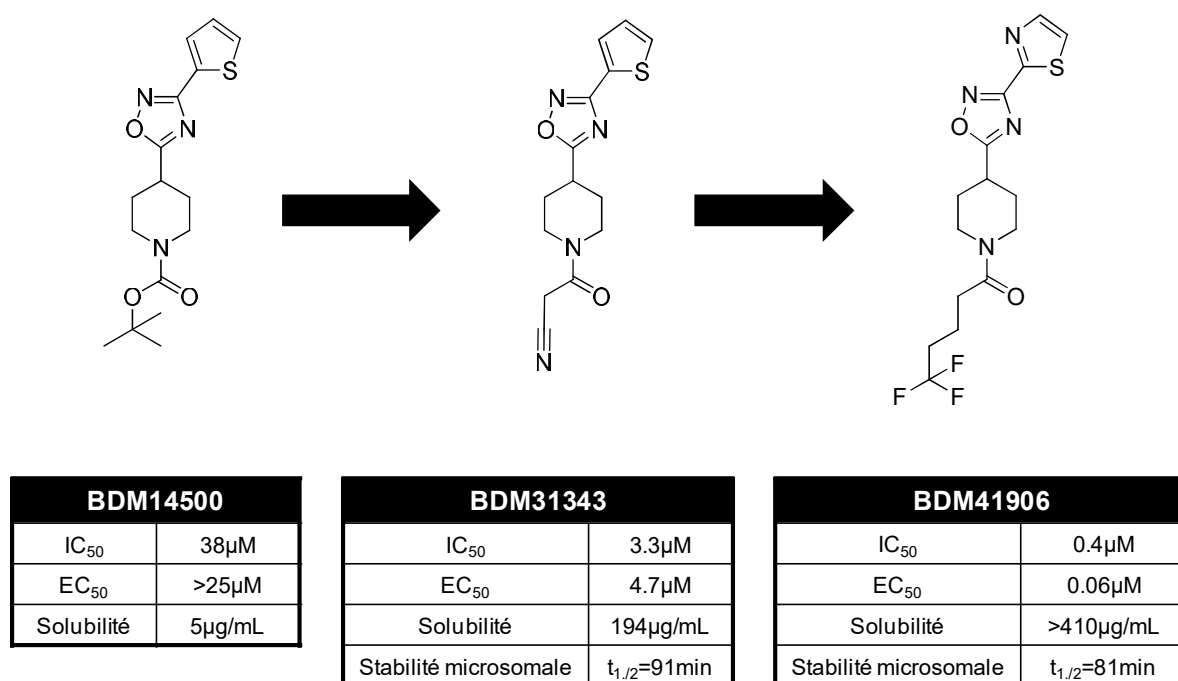


Figure 49 : Du composé Hit au candidat préclinique.

Les différentes phases d'optimisation conduites ont permis d'accéder au composé BDM41906 (Figure 49).^{187,188} Ce composé s'avère huit fois plus actif que BDM31343 dans sa capacité à inhiber l'interaction entre EthR et son opéron (IC₅₀ = 0.4μM) et 78 fois plus actif dans sa capacité à potentialiser dix fois l'activité de l'éthionamide en présence de macrophages infectés par *M. tuberculosis* (EC₅₀ = 0.06μM). BDM41906 possède également une solubilité améliorée (> 410μg/mL) et une stabilité microsomale équivalente (t_{1/2} = 81min) par rapport au composé BDM31343.

Ce composé a également pu être co-cristallisé avec la protéine EthR. On observe un basculement dans le mode de liaison par rapport au composé BDM14500. Ainsi, la chaîne trifluoropentyle remplaçant le groupement Boc du composé BDM14500 occupe le bas du domaine de

¹⁸⁷ M. Flipo, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54 (8), 2994-3010.

¹⁸⁸ M. Flipo, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 55 (1), 68-83.

régulation alors que les cycles oxadiazole et thiazole viennent occuper l'entrée du domaine de régulation. L'oxadiazole n'est donc plus dans une position adéquate pour former une liaison hydrogène avec l'asparagine 179. Cependant, une nouvelle liaison hydrogène se forme entre cette asparagine 179 et l'atome d'oxygène de la fonction amide du composé BDM41906.

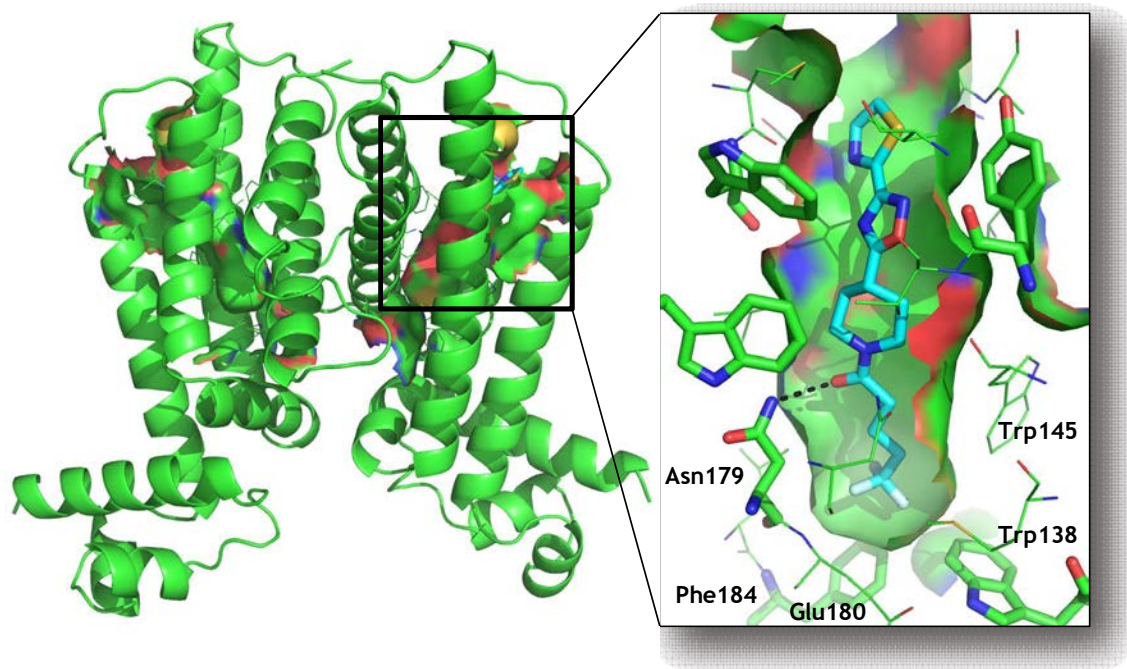


Figure 50 : Mode de liaison du composé BDM41906.

Ce composé représente aujourd'hui le meilleur candidat préclinique développé et est actuellement en cours d'évaluation sur de nouvelles expériences *in vivo* et *in vitro* afin de déterminer si ce dernier remplit tous les critères pour une évaluation clinique.

V Conclusion

Malgré le nombre important de composés actuellement en essai clinique, il existe toujours un réel besoin en alternatives thérapeutiques afin de lutter notamment contre le développement des formes résistantes (MDR et XDR) de la tuberculose. Une des stratégies consiste à venir potentialiser les médicaments existants en inhibant les mécanismes de résistance développés par le pathogène. Cette stratégie a déjà été utilisée avec les inhibiteurs de β -lactamases afin d'augmenter l'efficacité et de prolonger la durée de vie des β -lactames devenus inefficaces.

Récemment, cette stratégie a également été développée afin de potentialiser un antituberculeux de seconde intention utilisé dans le traitement de la tuberculose MDR : l'éthionamide. L'efficacité de cette prodrogue est notamment limitée par le répresseur transcriptionnel EthR qui régule la production de l'enzyme EthA, responsable de la bioactivation de l'éthionamide.

Deux familles d'inhibiteurs du répresseur transcriptionnel EthR ont été développées selon deux approches complémentaires :

- la première famille développée par la société Bioversys a été conçue par analogie avec l'un des ligands connus d'EthR.
 - la seconde famille développée par les équipes des unités INSERM U761 et U1019 a été conçue par description d'un pharmacophore sur la base de la structure du domaine de régulation de la protéine.
- Ces deux familles sont actuellement au stade du choix d'un candidat préclinique.

La famille développée au laboratoire ne présente pour l'instant pas de contre-indication particulière pour un développement préclinique, néanmoins, il n'est pas possible de prévoir un éventuel problème de toxicité qui pourrait arrêter son développement. C'est pourquoi il est nécessaire de développer de nouvelles familles d'inhibiteurs, appelées familles « back-up ».

Dans les travaux précédents sur la recherche d'inhibiteurs d'EthR, il a été observé que la taille des composés était un facteur clé pour l'activité. En effet, des composés de poids moléculaire trop important pouvaient se montrer actifs en présence de la protéine seule mais devenaient inactifs lors des tests en présence du pathogène.¹⁸⁹ Nous avons vu dans ce chapitre que *M. tuberculosis* possède une enveloppe particulièrement complexe et difficile à traverser par simple diffusion, ce qui peut expliquer ce phénomène pour les molécules trop volumineuses.

C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser de petites molécules afin de développer une famille « back-up » d'inhibiteurs d'EthR, en utilisant une « approche par fragments ». Cette approche

¹⁸⁹ N. Willand, *et al.*, *ACS Chemical Biology* **2010**, 5 (11), 1007-1013.

originale se base sur le développement de molécules de faible poids moléculaire ($MW < 300$) et est donc particulièrement adaptée au développement de nouveaux composés antituberculeux.

Le développement d'une seconde famille d'inhibiteurs par une stratégie nouvelle doit permettre l'obtention de composés présentant un profil de risque différent de ceux issus de la famille Lead1. Cette famille devra être capable de palier à un éventuel problème survenu lors du développement de ou des candidats précliniques.

Les chapitres suivants présentent le concept de l'approche par fragments, les différents tests biologiques utilisés pour évaluer les nouveaux composés synthétisés ainsi que la mise en place de l'approche par fragments pour la découverte de nouveaux inhibiteurs du répresseur transcriptionnel EthR.

VI Bibliographie

1. Denis, F.; Perronne, C., *Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques*. Guides MédiBio ed.; 2004.
2. Marquette, P.; Lafitte, P., *Tuberculose pulmonaire et primo-infection tuberculeuse*. 2004.
3. Prescott, L.; Harley, J.; Klein, D., *Microbiologie*. De Boeck Université ed.; 2007.
4. World Health Organization, *Global Tuberculosis Control Annual Report*. 2011.
5. World Health Organization, *Global Tuberculosis Control Annual Report*. 2010.
6. World Health Organization, *Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010 Global Report on Surveillance and Response*. 2010.
7. Fu, L. M.; Fu-Liu, C. S., Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis* **2002**, 82 (2), 85-90.
8. Kremer, L. B.; Besra, G. S.; Brennan, P. J.; Baulard, A. R., *Le lipoarabinomannane : structure et fonctions d'un glycolipide impliqué dans la pathogénie tuberculeuse*. EDK: 1999; Vol. 15, p 842-850.
9. Faller, M.; Niederweis, M.; Schulz, G. E., The Structure of a Mycobacterial Outer-Membrane Channel. *Science* **2004**, 303 (5661), 1189-1192.
10. Koul, A.; Arnoult, E.; Lounis, N.; Guillemont, J.; Andries, K., The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **2011**, 469 (7331), 483-490.
11. Schatz, A.; Waksman, S. A., Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon Mycobacterium tuberculosis and Related Organisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* **1944**, 57 (2), 244-248.
12. Hinshaw, C.; Feldman, W. H.; Pfuete, K. H., Treatment of tuberculosis with streptomycin. *Journal of the American Medical Association* **1946**, 132 (13), 778-782.
13. Janin, Y. L., Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2007**, 15 (7), 2479-2513.
14. Mitchison, D. A., The Diagnosis and Therapy of Tuberculosis During the Past 100 Years. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2005**, 171 (7), 699-706.
15. World Health Organization, *Treatment of Tuberculosis Guidelines*. 2010.
16. Bernstein, J.; Lott, W. A.; Steinberg, B. A.; Yale, H. L., Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *Am Rev Tuberc* **1952**, 65 (4), 357-364.
17. Chorine, V., Action de l'amide nicotinique sur les bacilles du genre Mycobacterium. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1945**, 220, 150-151.
18. Winder, F. G.; Collins, P. B., Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of General Microbiology* **1970**, 63 (1), 41-48.
19. Takayama, K.; Wang, L.; David, H. L., Effect of Isoniazid on the In Vivo Mycolic Acid Synthesis, Cell Growth, and Viability of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1972**, 2 (1), 29-35.
20. Gangadharam, P. R. J.; Harold, F. M.; Schaefer, W. B., Selective Inhibition of Nucleic Acid Synthesis in Mycobacterium tuberculosis by Isoniazid. *Nature* **1963**, 198 (4881), 712-714.
21. Singh, R.; Wiseman, B.; Deemagarn, T.; Donald, L. J.; Duckworth, H. W.; Carpena, X.; Fita, I.; Loewen, P. C., Catalase-peroxidases (KatG) Exhibit NADH Oxidase Activity. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279 (41), 43098-43106.

22. Wengenack, N. L.; Jensen, M. P.; Rusnak, F.; Stern, M. K., Mycobacterium tuberculosis KatG Is a Peroxynitritase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, *256* (3), 485-487.
23. Bardou, F.; Raynaud, C.; Ramos, C.; Lanéelle, M. A.; Lanéelle, G., Mechanism of isoniazid uptake in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology* **1998**, *144* (9), 2539-2544.
24. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S., The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Nature* **1992**, *358* (6387), 591-593.
25. Heym, B.; Alzari, P. M.; Honore, N.; Cole, S. T., Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, katG, are associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology* **1995**, *15* (2), 235-245.
26. Johnsson, K.; Schultz, P. G., Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from Mycobacterium tuberculosis. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (16), 7425-7426.
27. Johnsson, K.; King, D. S.; Schultz, P. G., Studies on the Mechanism of Action of Isoniazid and Ethionamide in the Chemotherapy of Tuberculosis. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (17), 5009-5010.
28. Nguyen, M.; Claparols, C.; Bernadou, J.; Meunier, B., Is the isonicotinoyl radical generated during activation of isoniazid by MnIII-pyrophosphate? *Comptes Rendus Chimie* **2002**, *5* (4), 325-330.
29. Sipe, H. J.; Jaszewski, A. R.; Mason, R. P., Fast-Flow EPR Spectroscopic Observation of the Isoniazid, Iproniazid, and Phenylhydrazine Hydrazyl Radicals. *Chemical Research in Toxicology* **2004**, *17* (2), 226-233.
30. Timmins, G. S.; Master, S.; Rusnak, F.; Deretic, V., Requirements for Nitric Oxide Generation from Isoniazid Activation In Vitro and Inhibition of Mycobacterial Respiration In Vivo. *Journal of Bacteriology* **2004**, *186* (16), 5427-5431.
31. Timmins, G. S.; Master, S.; Rusnak, F.; Deretic, V., Nitric Oxide Generated from Isoniazid Activation by KatG: Source of Nitric Oxide and Activity against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48* (8), 3006-3009.
32. Timmins, G. S.; Deretic, V., Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology* **2006**, *62* (5), 1220-1227.
33. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W., inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science* **1994**, *263* (5144), 227-230.
34. Nguyen, M.; Claparols, C.; Bernadou, J.; Meunier, B., A Fast and Efficient Metal-Mediated Oxidation of Isoniazid and Identification of Isoniazid-NAD(H) Adducts. *ChemBioChem* **2001**, *2* (12), 877-883.
35. Broussy, S.; Coppel, Y.; Nguyen, M.; Bernadou, J.; Meunier, B., ¹H and ¹³C NMR Characterization of Hemiamidal Isoniazid-NAD(H) Adducts as Possible Inhibitors Of InhA Reductase of Mycobacterium tuberculosis. *Chemistry – A European Journal* **2003**, *9* (9), 2034-2038.
36. Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H. R.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C., Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis. *Science* **1998**, *279* (5347), 98-102.
37. Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J., The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (24), 13881-13886.
38. Lei, B.; Wei, C.-J.; Tu, S.-C., Action Mechanism of Antitubercular Isoniazid. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (4), 2520-2526.
39. Yatvin, M., B.; Pederson, R., L. Anti-mycobacterial compounds. WO/2002/004478 2002.

40. Broussy, S.; Bernardes-Génisson, V.; Quémard, A.; Meunier, B.; Bernadou, J., The First Chemical Synthesis of the Core Structure of the Benzoylhydrazine-NAD Adduct, a Competitive Inhibitor of the Mycobacterium tuberculosis Enoyl Reductase. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70* (25), 10502-10510.
41. Broussy, S.; Bernardes-Génisson, V.; Gornitzka, H.; Bernadou, J.; Meunier, B., Studies on the 4-benzoylpyridine-3-carboxamide entity as a fragment model of the Isoniazid-NAD adduct. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2005**, *3* (4), 666-669.
42. Deraeve, C.; Dorobantu, I. M.; Rebbah, F.; Le Quéméner, F.; Constant, P.; Quémard, A.; Bernardes-Génisson, V.; Bernadou, J.; Pratviel, G., Chemical synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship analysis of azaisoindolinones, a novel class of direct enoyl-ACP reductase inhibitors as potential antimycobacterial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (21), 6225-6232.
43. Subba Rao, G.; Vijayakrishnan, R.; Kumar, M., Structure-Based Design of a Novel Class of Potent Inhibitors of InhA, the Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase from Mycobacterium Tuberculosis: A Computer Modelling Approach. *Chemical Biology and Drug Design* **2008**, *72* (5), 444-449.
44. Argyrou, A.; Vetting, M. W.; Aladegbami, B.; Blanchard, J. S., Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase is a target for isoniazid. *Nature Structural and Molecular Biology* **2006**, *13* (5), 408-413.
45. Wade, M. M.; Zhang, Y., Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Bioscience* **2004**, *9*, 975-994.
46. Zhang, Y.; Yew, W. W., Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2009**, *13* (11), 1320-1330.
47. Almeida Da Silva, P. E.; Palomino, J. C., Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**, *66* (7), 1417-1430.
48. Rouse, D. A.; Morris, S. L., Molecular mechanisms of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis. *Infection and Immunity* **1995**, *63* (4), 1427-1433.
49. Ramaswamy, S. V.; Reich, R.; Dou, S.-J.; Jasperse, L.; Pan, X.; Wanger, A.; Quitugua, T.; Graviss, E. A., Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, *47* (4), 1241-1250.
50. Miesel, L.; Weisbrod, T. R.; Marcinkeviciene, J. A.; Bittman, R.; Jacobs, W. R., NADH Dehydrogenase Defects Confer Isoniazid Resistance and Conditional Lethality in Mycobacterium smegmatis. *Journal of Bacteriology* **1998**, *180* (9), 2459-2467.
51. Lee, A. S. G.; Teo, A. S. M.; Wong, S.-Y., Novel Mutations in ndh in Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2001**, *45* (7), 2157-2159.
52. Maggi, N.; Pasqualucci, C. R.; Ballotta, R.; Sensi, P., Rifampicin: a new orally active rifamycin. *Chemotherapy* **1966**, *11* (5), 285-292.
53. Sensi, P., Reviews of Infectious Diseases. **1983**, *5* (History of the Development of Rifampin), S402-S406.
54. McClure, W. R.; Cech, C. L., On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **1978**, *253* (24), 8949-8956.
55. D.A, M., The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle* **1985**, *66* (3), 219-225.

56. Telenti, A.; Imboden, P.; Marchesi, F.; Matter, L.; Schopfer, K.; Bodmer, T.; Lowrie, D.; Colston, M. J.; Cole, S., Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *The Lancet* **1993**, *341* (8846), 647-651.
57. Burman, W.; Jones, B., Treatment of HIV-related Tuberculosis in the Era of Effective Antiretroviral Therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2001**, *164* (1), 7-12.
58. Li, A. P.; Reith, M. K.; Rasmussen, A.; Gorski, J. C.; Hall, S. D.; Xu, L.; Kaminski, D. L.; Cheng, L. K., Primary human hepatocytes as a tool for the evaluation of structure-activity relationship in cytochrome P450 induction potential of xenobiotics: evaluation of rifampin, rifapentine and rifabutin. *Chemico-Biological Interactions* **1997**, *107* (1-2), 17-30.
59. Williams, D. L.; Spring, L.; Collins, L.; Miller, L. P.; Heifets, L. B.; Gangadharam, P. R. J.; Gillis, T. P., Contribution of rpoB Mutations to Development of Rifamycin Cross-Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, *42* (7), 1853-1857.
60. Kushner, S.; Dalalian, H.; Cassell, R. T.; Sanjurjo, J. L.; McKenzie, D.; Subbarow, Y., Experimental Chemotherapy of Tuberculosis. I. Substituted Nicotinamides. *The Journal of Organic Chemistry* **1948**, *13* (6), 834-836.
61. Kushner, S.; Dalalian, H.; Sanjurjo, J. L.; Bach, F. L.; Safir, S. R.; Smith, V. K.; Williams, J. H., Experimental Chemotherapy of Tuberculosis. II. The Synthesis of Pyrazinamides and Related Compounds. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, *74* (14), 3617-3621.
62. Zhang, Y.; Mitchison, D., The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2003**, *7* (1), 6-21.
63. Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z., Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2003**, *52* (5), 790-795.
64. Malone, L.; Schurr, A.; Lindh, H.; McKenzie, D.; Kiser, J. S.; Williams, J. H., The effect of pyrazinamide (aldinamide) on experimental tuberculosis in mice. *Am Rev Tuberc* **1952**, *65* (5), 511-518.
65. Wade, M. M.; Zhang, Y., Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medical Microbiology* **2004**, *53* (8), 769-773.
66. Heifets, L. B.; Flory, M. A.; Lindholm-Levy, P. J., Does pyrazinoic acid as an active moiety of pyrazinamide have specific activity against Mycobacterium tuberculosis? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, *33* (8), 1252-1254.
67. Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H.; Sun, Z., Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Pyrazinamide. *Journal of Bacteriology* **1999**, *181* (7), 2044-2049.
68. Raynaud, C.; Lanéelle, M.-A.; Senaratne, R. H.; Draper, P.; Lanéelle, G.; Daffé, M., Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* **1999**, *145* (6), 1359-1367.
69. Zhang, Y.; Permar, S.; Sun, Z., Conditions that may affect the results of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology* **2002**, *51* (1), 42-49.
70. Scorpio, A.; Zhang, Y., Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine* **1996**, *2* (6), 662-667.
71. Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X.; Yuan, H.; Lee, J. S.; Barry, C. E.; Wang, H.; Zhang, W.; Zhang, Y., Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science* **2011**, *333* (6049), 1630-1632.

72. Keiler, K. C.; Ramadoss, N. S., Bifunctional transfer-messenger RNA. *Biochimie* **2011**, *93* (11), 1993-1997.
73. Thibonnier, M.; Thiberge, J.-M.; De Reuse, H., Trans-Translation in *Helicobacter pylori*: Essentiality of Ribosome Rescue and Requirement of Protein Tagging for Stress Resistance and Competence. *PLoS ONE* **2008**, *3* (11), e3810.
74. Keiler, K. C., Biology of trans-Translation. *Annual Review of Microbiology* **2008**, *62* (1), 133-151.
75. Kalinda, A. S.; Aldrich, C. C., Pyrazinamide: A Frontline Drug Used for Tuberculosis. Molecular Mechanism of Action Resolved after 50 Years? *ChemMedChem* **2012**, 558-560.
76. Scorpio, A.; Lindholm-Levy, P.; Heifets, L.; Gilman, R.; Siddiqi, S.; Cynamon, M.; Zhang, Y., Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, *41* (3), 540-543.
77. Juréen, P.; Werngren, J.; Toro, J.-C.; Hoffner, S., Pyrazinamide Resistance and *pncA* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, *52* (5), 1852-1854.
78. Cheng, S.-J.; Thibert, L.; Sanchez, T.; Heifets, L.; Zhang, Y., *pncA* Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, *44* (3), 528-532.
79. Thomas, J. P.; Baughn, C. O.; Wilkinson, R. G.; Shepherd, R. G., A new synthetic compound with antituberculous activity in mice: ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-*l*-butanol). *Am Rev Respir Dis* **1961**, *83*, 891-893.
80. Takayama, K.; Kilburn, J. O., Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, *33* (9), 1493-1499.
81. Mikusová, K.; Slayden, R. A.; Besra, G. S.; Brennan, P. J., Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, *39* (11), 2484-2489.
82. Belanger, A. E.; Besra, G. S.; Ford, M. E.; Mikusová, K.; Belisle, J. T.; Brennan, P. J.; Inamine, J. M., The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (21), 11919-11924.
83. Sreevatsan, S.; Stockbauer, K. E.; Pan, X.; Kreiswirth, B. N.; Moghazeh, S. L.; Jacobs, W. R.; Telenti, A.; Musser, J. M., Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, *41* (8), 1677-1681.
84. Telenti, A.; Philipp, W. J.; Sreevatsan, S.; Bernasconi, C.; Stockbauer, K. E.; Wieles, B.; Musser, J. M.; Jacobs, W. R., The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Medicine* **1997**, *3* (5), 567-570.
85. Sharma, K.; Gupta, M.; Pathak, M.; Gupta, N.; Koul, A.; Sarangi, S.; Baweja, R.; Singh, Y., Transcriptional Control of the Mycobacterial *embCAB* Operon by PknH through a Regulatory Protein, *EmbR*, In Vivo. *Journal of Bacteriology* **2006**, *188* (8), 2936-2944.
86. Busscher, G. F.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L., 2-Deoxystreptamine: Central Scaffold of Aminoglycoside Antibiotics. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (3), 775-792.
87. Jones, D.; Metzger, H. J.; Schatz, A.; Waksman, S., Control of gram-negative bacteria in experimental animals by streptomycin. *Science* **1944**, *100* (2588), 103-105.
88. Spotts, C. R.; Stanier, R. Y., Mechanism of Streptomycin Action on Bacteria: A Unitary Hypothesis. *Nature* **1961**, *192* (4803), 633-637.
89. Davies, J.; Gorini, L.; Davis, B., Misreading of RNA Codewords Induced by Aminoglycoside Antibiotics. *Molecular Pharmacology* **1965**, *1* (1), 93-106.

90. Garvin, R. T.; Biswas, D. K.; Gorini, L., The Effects of Streptomycin or Dihydrostreptomycin Binding to 16S RNA or to 30S Ribosomal Subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1974**, *71* (10), 3814-3818.
91. Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V., Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **2000**, *407* (6802), 340-348.
92. Finken, M.; Kirschner, P.; Meier, A.; Wrede, A.; Böttger, E. C., Molecular basis of streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Molecular Microbiology* **1993**, *9* (6), 1239-1246.
93. Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Shinnick, T. M., Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49* (8), 3192-3197.
94. Johansen, S. K.; Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Douthwaite, S., Capreomycin Binds across the Ribosomal Subunit Interface Using tlyA-Encoded 22-O-Methylations in 16S and 23S rRNAs. *Molecular Cell* **2006**, *23* (2), 173-182.
95. Amikacin. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 87-88.
96. Kanamycin. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 117-118.
97. Capreomycin. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 89-91.
98. Ho, Y. I.; Chan, C. Y.; Cheng, A. F., In-vitro activities of aminoglycoside-aminocyclitols against mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1997**, *40* (1), 27-32.
99. Mitscher, L. A., Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (2), 559-592.
100. Leshner, G. Y.; Froelich, E. J.; Gruett, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R. P., 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry* **1962**, *91*, 1063-1065.
101. Deitz, W. H.; Bailey, J. H.; Froelich, E. J., In Vitro Antibacterial Properties of Nalidixic Acid, a New Drug Active against Gram-Negative Organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1963**, *161*, 583-587.
102. Sugino, A.; Peebles, C. L.; Kreuzer, K. N.; Cozzarelli, N. R., Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, *74* (11), 4767-4771.
103. Khodursky, A. B.; Cozzarelli, N. R., The Mechanism of Inhibition of Topoisomerase IV by Quinolone Antibacterials. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (42), 27668-27677.
104. Aubry, A.; Pan, X.-S.; Fisher, L. M.; Jarlier, V.; Cambau, E., Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase: Interaction with Quinolones and Correlation with Antimycobacterial Drug Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48* (4), 1281-1288.
105. Takiff, H. E.; Salazar, L.; Guerrero, C.; Philipp, W.; Huang, W. M.; Kreiswirth, B.; Cole, S. T.; Jacobs, W. R.; Telenti, A., Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, *38* (4), 773-780.
106. Jörgen, L., Para-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. *The Lancet* **1946**, *247* (6384), 15-16.
107. Nopponpunth, V.; Sirawaraporn, W.; Greene, P. J.; Santi, D. V., Cloning and Expression of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae Dihydropteroate Synthase in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* **1999**, *181* (21), 6814-6821.

108. Feuerriegel, S.; Köser, C.; Trübe, L.; Archer, J.; Rüscher, S.; Richter, E.; Niemann, S., Thr202Ala in thyA Is a Marker for the Latin American Mediterranean Lineage of the Mycobacterium tuberculosis Complex Rather than Para-Aminosalicylic Acid Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54* (11), 4794-4798.
109. Mathys, V.; Wintjens, R.; Lefevre, P.; Bertout, J.; Singhal, A.; Kiass, M.; Kurepina, N.; Wang, X.-M.; Mathema, B.; Baulard, A.; Kreiswirth, B. N.; Bifani, P., Molecular Genetics of para-Aminosalicylic Acid Resistance in Clinical Isolates and Spontaneous Mutants of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53* (5), 2100-2109.
110. Ratledge, C.; Brown, K. A., Inhibition of mycobactin formation in Mycobacterium smegmatis by p-aminosalicylate. A new proposal for the mode of action of p-aminosalicylate. *American Review of Respiratory Disease* **1972**, *106* (5), 774-776.
111. Brown, K. A.; Ratledge, C., The effect of p-aminosalicylic acid on iron transport and assimilation in mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1975**, *385* (2), 207-220.
112. Adilakshmi, T.; Ayling, P. D.; Ratledge, C., Mutational Analysis of a Role for Salicylic Acid in Iron Metabolism of Mycobacterium smegmatis. *Journal of Bacteriology* **2000**, *182* (2), 264-271.
113. Colin, R., Iron, mycobacteria and tuberculosis. *Tuberculosis* **2004**, *84* (1-2), 110-130.
114. David, H. L.; Takayama, K.; Goldman, D. S., Susceptibility of mycobacterial D-alanyl-D-alanine synthetase to D-cycloserine. *American Review of Respiratory Disease* **1969**, *100* (4), 579-581.
115. Feng, Z.; Barletta, R. G., Roles of Mycobacterium smegmatis d-Alanine:d-Alanine Ligase and d-Alanine Racemase in the Mechanisms of Action of and Resistance to the Peptidoglycan Inhibitor d-Cycloserine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, *47* (1), 283-291.
116. Chacon, O.; Feng, Z.; Harris, N. B.; Cáceres, N. E.; Adams, L. G.; Barletta, R. G., Mycobacterium smegmatis d-Alanine Racemase Mutants Are Not Dependent on d-Alanine for Growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, *46* (1), 47-54.
117. Belanger, A. E.; Porter, J. C.; Hatfull, G. F., Genetic Analysis of Peptidoglycan Biosynthesis in Mycobacteria: Characterization of a ddlA Mutant of Mycobacterium smegmatis. *Journal of Bacteriology* **2000**, *182* (23), 6854-6856.
118. Thompson, L. T.; Moskal, J. R.; Disterhoft, J. F., Hippocampus-dependent learning facilitated by a monoclonal antibody or D-cycloserine. *Nature* **1992**, *359* (6396), 638-641.
119. LeMagueres, P.; Im, H.; Ebalunode, J.; Strych, U.; Benedik, M. J.; Briggs, J. M.; Kohn, H.; Krause, K. L., The 1.9 Å Crystal Structure of Alanine Racemase from Mycobacterium tuberculosis Contains a Conserved Entryway into the Active Site. *Biochemistry* **2005**, *44* (5), 1471-1481.
120. Winder, F. G.; Collins, P. B.; Whelan, D., Effects of Ethionamide and Isoxyl on Mycolic Acid Synthesis in Mycobacterium tuberculosis BCG. *Journal of General Microbiology* **1971**, *66* (3), 379-380.
121. DeBarber, A. E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L.-G.; Barry, C. E., Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (17), 9677-9682.
122. Vannelli, T. A.; Dykman, A.; Ortiz de Montellano, P. R., The Antituberculosis Drug Ethionamide Is Activated by a Flavoprotein Monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (15), 12824-12829.
123. Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R. A.; Brennan, P. J.; Loch, C.; Besra, G. S., Activation of the Pro-drug Ethionamide Is Regulated in Mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (36), 28326-28331.

124. Gatifloxacin (NCT ID: NCT00216385) clinicaltrials.gov.
125. Moxifloxacin (NCT ID: NCT00864383) clinicaltrials.gov.
126. Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Göhlmann, H. W. H.; Neefs, J.-M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; Williams, P.; de Chaffoy, D.; Huitric, E.; Hoffner, S.; Cambau, E.; Truffot-Pernot, C.; Lounis, N.; Jarlier, V., A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science* **2005**, *307* (5707), 223-227.
127. Koul, A.; Dendouga, N.; Vergauwen, K.; Molenberghs, B.; Vranckx, L.; Willebrords, R.; Ristic, Z.; Lill, H.; Dorange, I.; Guillemont, J.; Bald, D.; Andries, K., Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nature Chemical Biology* **2007**, *3* (6), 323-324.
128. Haagsma, A. C.; Abdillahi-Ibrahim, R.; Wagner, M. J.; Krab, K.; Vergauwen, K.; Guillemont, J.; Andries, K.; Lill, H.; Koul, A.; Bald, D., Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP Synthase Compared with That towards the Eukaryotic Homologue. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53* (3), 1290-1292.
129. TMC207 (NCT ID: NCT01464762), clinicaltrials.gov.
130. Edwards, D. I., Mechanism of antimicrobial action of metronidazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1979**, *5* (5), 499-502.
131. Wayne, L. G.; Sramek, H. A., Metronidazole is bactericidal to dormant cells of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, *38* (9), 2054-2058.
132. Brooks, J. V.; Furney, S. K.; Orme, I. M., Metronidazole Therapy in Mice Infected with Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43* (5), 1285-1288.
133. Metronidazole (NCT ID: NCT00425113) clinicaltrials.gov.
134. Matsumoto, M.; Hashizume, H.; Tomishige, T.; Kawasaki, M.; Tsubouchi, H.; Sasaki, H.; Shimokawa, Y.; Komatsu, M., OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis In Vitro and In Mice. *PLoS Med* **2006**, *3* (11), 1285-1288.
135. Stover, C. K.; Warren, P.; VanDevanter, D. R.; Sherman, D. R.; Arain, T. M.; Langhorne, M. H.; Anderson, S. W.; Towell, J. A.; Yuan, Y.; McMurray, D. N.; Kreiswirth, B. N.; Barry, C. E.; Baker, W. R., A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* **2000**, *405* (6789), 962-966.
136. Manjunatha, U. H.; Boshoff, H.; Dowd, C. S.; Zhang, L.; Albert, T. J.; Norton, J. E.; Daniels, L.; Dick, T.; Pang, S. S.; Barry, C. E., Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (2), 431-436.
137. Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.; Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry, C. E., PA-824 Kills Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by Intracellular NO Release. *Science* **2008**, *322* (5906), 1392-1395.
138. Manjunatha, U.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E., The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling. *Communicative and Integrative Biology* **2009**, *2* (3), 215-8.
139. OPC-67683 (NCT ID: NCT01131351) clinicaltrials.gov.
140. OPC-67683 (NCT ID: NCT01424670) clinicaltrials.gov.
141. PA-824 (NCT ID: NCT01498419) clinicaltrials.gov.
142. Protopopova, M.; Hanrahan, C.; Nikonenko, B.; Samala, R.; Chen, P.; Gearhart, J.; Einck, L.; Nacy, C. A., Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, *56* (5), 968-974.

143. Lee, R. E.; Protopopova, M.; Crooks, E.; Slayden, R. A.; Terrot, M.; Barry, C. E., Combinatorial Lead Optimization of [1,2]-Diamines Based on Ethambutol as Potential Antituberculosis Preclinical Candidates. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2003**, *5* (2), 172-187.
144. Jia, L.; Coward, L.; Gorman, G. S.; Noker, P. E.; Tomaszewski, J. E., Pharmacoproteomic Effects of Isoniazid, Ethambutol, and N-Geranyl-N'-(2-adamantyl)ethane-1,2-diamine (SQ109) on Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, *315* (2), 905-911.
145. SQ109 (NCT ID: NCT01218217) clinicaltrials.gov.
146. SQ109 (NCT ID: NCT01252108) clinicaltrials.gov.
147. Brickner, S. J.; Hutchinson, D. K.; Barbachyn, M. R.; Manninen, P. R.; Ulanowicz, D. A.; Garmon, S. A.; Grega, K. C.; Hedges, S. K.; Toops, D. S.; Ford, C. W.; Zurenko, G. E., Synthesis and Antibacterial Activity of U-100592 and U-100766, Two Oxazolidinone Antibacterial Agents for the Potential Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Positive Bacterial Infections. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39* (3), 673-679.
148. Alcalá, L.; Ruiz-Serrano, M. J.; Pérez-Fernández Turégano, C.; García de Viedma, D.; Díaz-Infantes, M.; Marín-Arriaza, M.; Bouza, E., In Vitro Activities of Linezolid against Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis That Are Susceptible or Resistant to First-Line Antituberculous Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, *47* (1), 416-417.
149. Rodríguez, J. C.; Ruiz, M.; López, M.; Royo, G., In vitro activity of moxifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and linezolid against Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2002**, *20* (6), 464-467.
150. Zhang, Y.; Post-Martens, K.; Denkin, S., New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discovery Today* **2006**, *11* (1-2), 21-27.
151. Schechter, G. F.; Scott, C.; True, L.; Raftery, A.; Flood, J.; Mase, S., Linezolid in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* **2010**, *50* (1), 49-55.
152. Linezolid (NCT ID: NCT00727844) clinicaltrials.gov.
153. Linezolid (NCT ID: NCT01521364) clinicaltrials.gov.
154. Barbachyn, M. R.; Hutchinson, D. K.; Brickner, S. J.; Cynamon, M. H.; Kilburn, J. O.; Klemens, S. P.; Glickman, S. E.; Grega, K. C.; Hedges, S. K.; Toops, D. S.; Ford, C. W.; Zurenko, G. E., Identification of a Novel Oxazolidinone (U-100480) with Potent Antimycobacterial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39* (3), 680-685.
155. Alffenaar, J. W. C.; van der Laan, T.; Simons, S.; van der Werf, T. S.; van de Kastele, P. J.; de Neeling, H.; van Soolingen, D., Susceptibility of Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates to a Potentially Less Toxic Derivate of Linezolid, PNU-100480. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, *55* (3), 1287-1289.
156. Wallis, R. S.; Jakubiec, W.; Kumar, V.; Bedarida, G.; Silvia, A.; Paige, D.; Zhu, T.; Mitton-Fry, M.; Ladutko, L.; Campbell, S.; Miller, P. F., Biomarker-Assisted Dose Selection for Safety and Efficacy in Early Development of PNU-100480 for Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, *55* (2), 567-574.
157. PNU-100480 (NCT ID: NCT01225640) clinicaltrials.gov.
158. AZD5847 (NCT ID: NCT01516203) clinicaltrials.gov.
159. Wright, G. D.; Sutherland, A. D., New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends in molecular medicine* **2007**, *13* (6), 260-267.
160. Koch, A. L., Bacterial Wall as Target for Attack. *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, *16* (4), 673-687.
161. Drawz, S. M.; Bonomo, R. A., Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews* **2010**, *23* (1), 160-201.

162. Chambers, H. F.; Moreau, D.; Yajko, D.; Miick, C.; Wagner, C.; Hackbarth, C.; Kocagöz, S.; Rosenberg, E.; Hadley, W. K.; Nikaido, H., Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, *39* (12), 2620-2624.
163. Jarlier, V.; Gutmann, L.; Nikaido, H., Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1991**, *35* (9), 1937-1939.
164. Quinting, B.; Reyrat, J.-M.; Monnaie, D.; Amicosante, G.; Pelicic, V.; Gicquel, B.; Frère, J.-M.; Galleni, M., Contribution of β -lactamase production to the resistance of mycobacteria to β -lactam antibiotics. *FEBS letters* **1997**, *406* (3), 275-278.
165. Mukherjee, T.; Basu, D.; Mahapatra, S.; Goffin, C.; van Beeumen, J.; Basu, J., Biochemical characterization of the 49 kDa penicillin-binding protein of *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemical Journal* **1996**, *320* (1), 197-200.
166. Voladri, R. K. R.; Lakey, D. L.; Hennigan, S. H.; Menzies, B. E.; Edwards, K. M.; Kernodle, D. S., Recombinant Expression and Characterization of the Major β -Lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, *42* (6), 1375-1381.
167. Wang, F.; Cassidy, C.; Sacchettini, J. C., Crystal Structure and Activity Studies of the *Mycobacterium tuberculosis* β -Lactamase Reveal Its Critical Role in Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2006**, *50* (8), 2762-2771.
168. Nampoothiri, K. M.; Rubex, R.; Patel, A. K.; Narayanan, S. S.; Krishna, S.; Das, S. M.; Pandey, A., Molecular cloning, overexpression and biochemical characterization of hypothetical β -lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Journal of Applied Microbiology* **2008**, *105* (1), 59-67.
169. Flores, A. R.; Parsons, L. M.; Pavelka, Martin S., Genetic analysis of the β -lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to β -lactam antibiotics. *Microbiology* **2005**, *151* (2), 521-532.
170. Hugonnet, J.-E.; Tremblay, L. W.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E.; Blanchard, J. S., Meropenem-Clavulanate Is Effective Against Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2009**, *323* (5918), 1215-1218.
171. Chambers, H. F.; Kocagöz, T.; Sipit, T.; Turner, J.; Hopewell, P. C., Activity of Amoxicillin/Clavulanate in Patients with Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* **1998**, *26* (4), 874-877.
172. Dauby, N.; Muylle, I.; Mouchet, F.; Sergysels, R.; Payen, M.-C., Meropenem/Clavulanate and Linezolid Treatment for Extensively Drug-resistant Tuberculosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **2011**, *30* (9), 812-813.
173. Sala, C.; Haouz, A.; Saul, F. A.; Miras, I.; Rosenkrands, I.; Alzari, P. M.; Cole, S. T., Genome-wide regulon and crystal structure of BlaI (Rv1846c) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **2009**, *71* (5), 1102-1116.
174. Wolff, K. A.; Sherman, M.; Nguyen, L., *Potential of Available Antibiotics by Targeting Resistance - An Emerging Trend in Tuberculosis Drug Development*. 2011.
175. Fraaije, M. W.; Kamerbeek, N. M.; Heidekamp, A. J.; Fortin, R.; Janssen, D. B., The Prodrug Activator EtaA from *Mycobacterium tuberculosis* Is a Baeyer-Villiger Monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (5), 3354-3360.
176. Hanouille, X.; Wieruszski, J.-M.; Rousselot-Pailley, P.; Landrieu, I.; Locht, C.; Lippens, G.; Baulard, A. R., Selective intracellular accumulation of the major metabolite issued from the activation of the prodrug ethionamide in mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *58* (4), 768-772.

177. Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C., Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *The Journal of Experimental Medicine* **2007**, *204* (1), 73-78.
178. Aramaki, H.; Yagi, N.; Suzuki, M., Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Engineering* **1995**, *8* (12), 1259-1266.
179. Engohang-Ndong, J.; Baillat, D.; Aumercier, M.; Bellefontaine, F.; Besra, G. S.; Locht, C.; Baulard, A. R., EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Molecular Microbiology* **2004**, *51* (1), 175-188.
180. Ramos, J. L.; Martínez-Bueno, M.; Molina-Henares, A. J.; Terán, W.; Watanabe, K.; Zhang, X.; Gallegos, M. T.; Brennan, R.; Tobes, R., The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2005**, *69* (2), 326-356.
181. Dover, L. G.; Corsino, P. E.; Daniels, I. R.; Cocklin, S. L.; Tatituri, V.; Besra, G. S.; Fütterer, K., Crystal Structure of the TetR/CamR Family Repressor Mycobacterium tuberculosis EthR Implicated in Ethionamide Resistance. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *340* (5), 1095-1105.
182. Frénois, F.; Engohang-Ndong, J.; Locht, C.; Baulard, A. R.; Villeret, V., Structure of EthR in a Ligand Bound Conformation Reveals Therapeutic Perspectives against Tuberculosis. *Molecular Cell* **2004**, *16* (2), 301-307.
183. Weber, W.; Schoenmakers, R.; Keller, B.; Gitzinger, M.; Grau, T.; Daoud-El Baba, M.; Sander, P.; Fussenegger, M., A synthetic mammalian gene circuit reveals antituberculosis compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (29), 9994-9998.
184. Fussenegger, M.; Weber, W.; Schoenmakers, R. Composition for Treatment of Tuberculosis. WO/2010/149761, 2009.
185. Grau, T.; Selchow, P.; Tigges, M.; Burri, R.; Gitzinger, M.; Böttger, E. C.; Fussenegger, M.; Sander, P., Phenylethyl Butyrate Enhances the Potency of Second-Line Drugs against Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2012**, *56* (2), 1142-1145.
186. Willand, N.; Dirie, B.; Carette, X.; Bifani, P.; Singhal, A.; Desroses, M.; Leroux, F.; Willery, E.; Mathys, V.; Deprez-Poulain, R.; Delcroix, G.; Frenois, F.; Aumercier, M.; Locht, C.; Villeret, V.; Deprez, B.; Baulard, A. R., Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide. *Nature Medicine* **2009**, *15* (5), 537-544.
187. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Dirié, B.; Carette, X.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Demirkaya, F.; Lens, Z.; Rucktooa, P.; Villeret, V.; Christophe, T.; Jeon, H. K.; Locht, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N., Ethionamide Boosters: Synthesis, Biological Activity, and Structure–Activity Relationships of a Series of 1,2,4-Oxadiazole EthR Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (8), 2994-3010.
188. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Villemagne, B.; Blondiaux, N.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Mathys, V.; Flament, M.-P.; Siepmann, J.; Villeret, V.; Wohlkönig, A.; Wintjens, R.; Soror, S. H.; Christophe, T.; Jeon, H. K.; Locht, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N., Ethionamide Boosters. 2. Combining Bioisosteric Replacement and Structure-Based Drug Design To Solve Pharmacokinetic Issues in a Series of Potent 1,2,4-Oxadiazole EthR Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *55* (1), 68-83.
189. Willand, N.; Desroses, M.; Toto, P.; Dirié, B.; Lens, Z.; Villeret, V.; Rucktooa, P.; Locht, C.; Baulard, A.; Deprez, B., Exploring Drug Target Flexibility Using in Situ Click Chemistry: Application to a Mycobacterial Transcriptional Regulator. *ACS Chemical Biology* **2010**, *5* (11), 1007-1013.

Chapitre 2. Le concept de l'approche par fragments

I L'approche par fragments

Actuellement, la recherche de nouveaux médicaments est principalement tournée vers la découverte de molécules qui modifient l'activité de cibles biologiques bien identifiées. Pour cela, il est nécessaire de disposer de méthodes efficaces d'identification de cibles biologiques ayant un rôle soit dans l'initiation, soit dans l'évolution d'une maladie, mais également dans l'identification d'agents thérapeutiques qui modulent de manière adéquate les activités de ces cibles chez l'homme en causant pas ou peu d'effets secondaires.

Afin d'améliorer les chances de découvrir des composés ayant une activité sur une cible biologique, de nombreuses techniques sont apparues depuis les années 1980. D'une part, des techniques telles que la chimie combinatoire et le criblage à haut débit (HTS : High-Throughput Screening) ont permis d'augmenter considérablement la capacité à synthétiser et cribler un nombre important de molécules, tout en réduisant les temps de criblage.¹⁹⁰ En parallèle, l'utilisation d'outils informatiques (criblage virtuel, QSAR, ...) a permis de réduire le nombre de molécules à évaluer, tout cela entraînant une accélération du processus de découverte de molécules biologiquement actives. Cependant, bien que certains médicaments aient pu être développés à partir de ces méthodes, l'utilisation de ces techniques n'a pas permis d'augmenter le nombre de nouvelles entités chimiques (NECs) mises sur le marché.¹⁹¹ Ceci s'explique en partie par les difficultés croissantes à ne pas subir d'échec lors du développement clinique et donc par la qualité des candidats médicaments issus des processus de recherche. De nouvelles méthodes ont donc été proposées.

L'une de ces nouvelles méthodes envisagées pour accéder à des composés biologiquement actifs, possédant les propriétés physicochimiques nécessaires au succès d'un médicament, est basée sur l'utilisation de molécules de faible poids moléculaire appelées « fragments ».

¹⁹⁰ R. Macarron, *Drug Discovery Today* **2006**, 11 (7-8), 277-279.

¹⁹¹ D. Brown, *et al.*, *Drug Discovery Today* **2003**, 8 (23), 1067-1077.

I.1 Historique et apparition du concept de fragments

La fin des années 1990 a vu apparaître les premières interrogations au sujet des approches de chimie combinatoire et de criblages à haut débit. Si ces techniques ont indéniablement permis la synthèse et l'évaluation biologique d'un nombre beaucoup plus important de molécules, des doutes ont été émis sur leur capacité à générer des « hits » de qualité avec comme principaux reproches une absence de réelle diversité structurelle et le faible caractère « drug-like » des composés au sein de ces chimiothèques. En effet, les contraintes associées à la synthèse de très grandes chimiothèques ont conduit à des produits très hydrophobes ainsi qu'à une diversité focalisée, plutôt qu'une vraie diversité chimique.¹⁹²

De plus, ces chimiothèques couvrent un très faible pourcentage de l'espace chimique disponible. En effet, Bohacek *et al.*¹⁹³ ont estimé que le nombre de molécules contenant jusqu'à 30 atomes de carbone, soufre, oxygène ou azote était supérieur à 10^{60} , ainsi, avec une chimiothèque d'un million de molécules on ne couvre même pas 10^{-54} % de l'espace chimique potentiel.

L'industrie pharmaceutique a alors commencé à prendre conscience de la notion de « composé drug-like », et du fait que beaucoup de molécules au sein des chimiothèques utilisées lors des criblages n'entraient pas dans cette catégorie. Ainsi, en 1997, Lipinski (Pfizer)¹⁹⁴ a défini quatre règles (Tableau 1) permettant de prédire la biodisponibilité par voie orale d'un candidat médicament. Si au moins deux de ces règles ne sont pas respectées pour un composé, le modèle de Lipinski prévoit qu'il a peu de chance d'être correctement absorbé par voie orale. En 2002, Veber (GSK)¹⁹⁵ a apporté deux nouvelles règles supplémentaires (Tableau 1) permettant de favoriser la biodisponibilité des composés par voie orale.

Règles de Lipinski	Masse Molaire (<i>MW</i>)	< 500 g/mol
	Accepteurs de liaisons Hydrogène (<i>H-Acc</i>)	< 10
	Donneurs de liaisons Hydrogène (<i>H-Don</i>)	< 5
	LogP	< 5
Règles de Veber	Nombre de liaisons à libre rotation (<i>NRot</i>)	< 10
	Surface Polaire(<i>PSA</i>)	< 140 Å ²

Tableau 1 : Règles de Lipinski et de Veber.

¹⁹² C. G. Wermuth, 2008.

¹⁹³ R. S. Bohacek, *et al.*, *Medicinal Research Reviews* 1996, 16 (1), 3-50.

¹⁹⁴ C. A. Lipinski, *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997, 23 (1-3), 3-25.

¹⁹⁵ D. F. Veber, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* 2002, 45 (12), 2615-2623.

Dans le même temps, une équipe des laboratoires Abbott publiait une nouvelle méthode de découverte de ligands intitulée « SAR by NMR », basée sur le criblage par RMN ^{15}N de petites molécules hydrophiles, ainsi que son application à la découverte d'inhibiteurs de la stromélysine (Figure 51) et de la protéine FKBP^{196,197}. Le but de cette approche était d'identifier de petites molécules se liant dans des poches de liaison voisines, afin de les lier entre elles pour obtenir des inhibiteurs plus puissants.

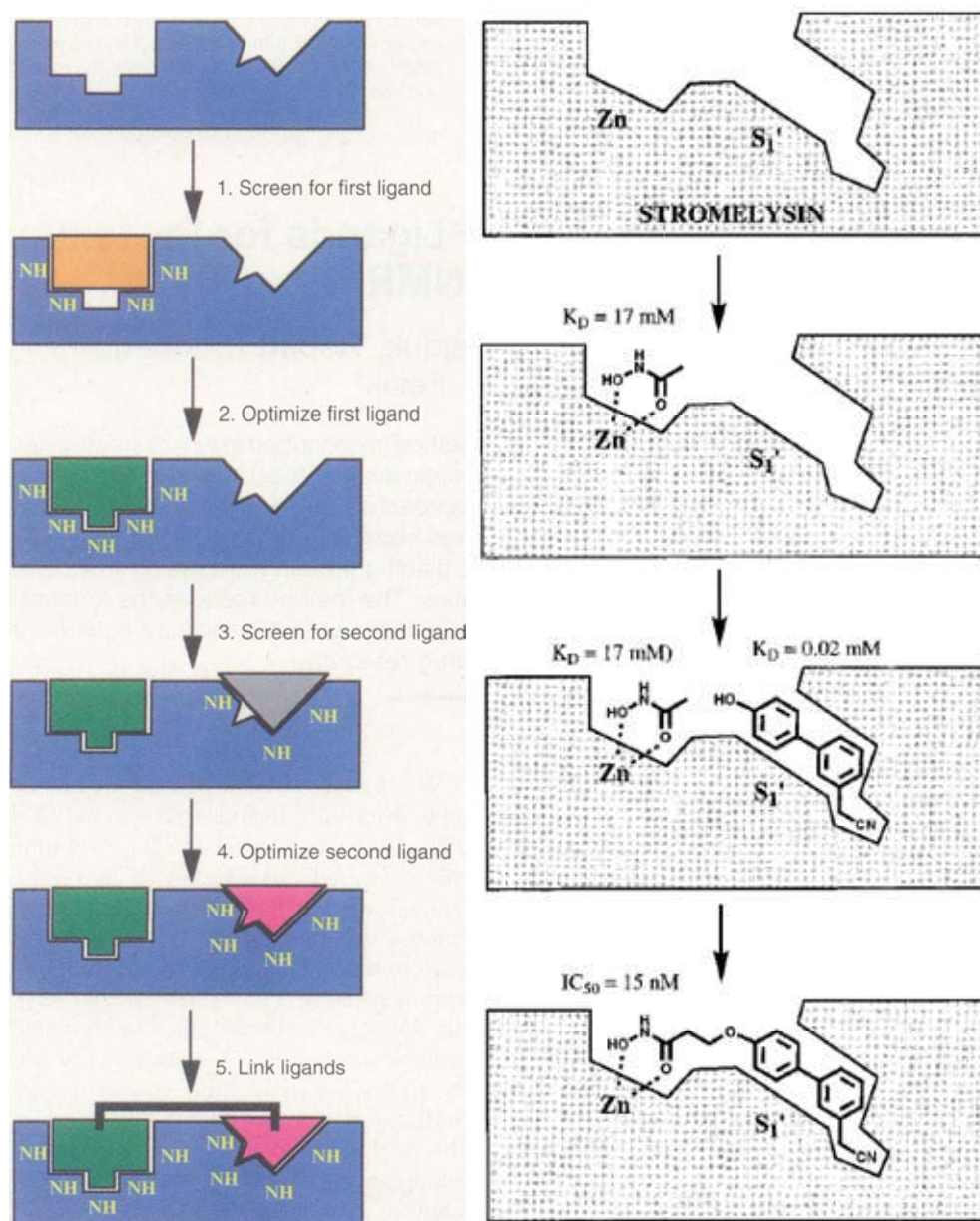


Figure 51 : A gauche : principe de la stratégie « SAR by NMR » selon Shuker *et al.*¹⁹⁶ A droite : application à la découverte d'inhibiteurs de la stromélysine (MMP-3).¹⁹⁷

¹⁹⁶ S. B. Shuker, *et al.*, *Science* **1996**, 274 (5292), 1531-1534.

¹⁹⁷ P. J. Hajduk, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119 (25), 5818-5827.

Dans le cas des inhibiteurs de la stromélysine, il a tout d'abord été montré que le fragment N-hydroxyacétamide se lie à l'atome de zinc du site catalytique ($K_D = 17\text{mM}$). Par la suite, un second fragment comportant un motif biphenyle a été identifié et se lie quant à lui dans une poche voisine ($K_D = 20\mu\text{M}$). Le raccordement de ces deux fragments par un chaînon méthylénique a permis d'aboutir à un composé très affiné pour la protéine ($K_D = 15\text{nM}$) à partir de deux ligands possédant des affinités plus faibles.

Le concept d'approche par fragments (ou FBDD : Fragment-Based Drug Design (ou Discovery)), né des travaux de Fesik *et al.*^{196,197} a pour but de répondre aux trois principaux problèmes évoqués précédemment, à savoir le manque de diversité et de composés « drug-like » au sein des chimiothèques criblées, et la faible représentation de l'espace chimique.

L'approche par fragments est basée sur un principe très simple : des molécules plus petites et plus simples ont plus de chance d'interagir avec au moins une poche de la protéine cible. En effet, Hann *et al.*¹⁹⁸ ont confirmé que la probabilité de liaison d'une molécule est inversement proportionnelle à sa complexité. Un criblage de petites molécules est donc susceptible de fournir plus de hits.

De plus, le nombre de composés dans un espace chimique donné augmentant de manière exponentielle avec le nombre d'atomes lourds (atomes qui ne sont pas des hydrogènes), des petites molécules vont couvrir plus facilement l'espace chimique et donc la diversité disponible. Par exemple, le criblage d'une chimiothèque de 1000 fragments, potentiellement reliés par dix « linkers », sur une protéine présentant trois « sous-poches » dans son domaine de liaison équivaut en théorie au criblage d'une chimiothèque contenant 10^{11} molécules usuellement présentes dans les chimiothèques HTS.

Pour répondre au problème du faible caractère drug-like des candidats médicaments qui entrent en phases cliniques, l'approche par fragment se base sur des molécules de faible poids moléculaire, solubles et hydrophiles. En effet, la masse moléculaire et le logP sont des critères importants lors de la sélection des fragments.

Depuis la naissance de ce concept, l'approche par fragment a été très rapidement adoptée dans les programmes de découverte de nouveaux médicaments comme le montre l'évolution du nombre d'industries pharmaceutiques ou de groupes de recherche académique ayant publié des travaux basés sur cette approche depuis 1996 (Figure 52).¹⁹⁹

¹⁹⁸ M. M. Hann, *et al.*, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **2001**, 41 (3), 856-864.

¹⁹⁹ P. J. Hajduk, *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, 6 (3), 211-219.

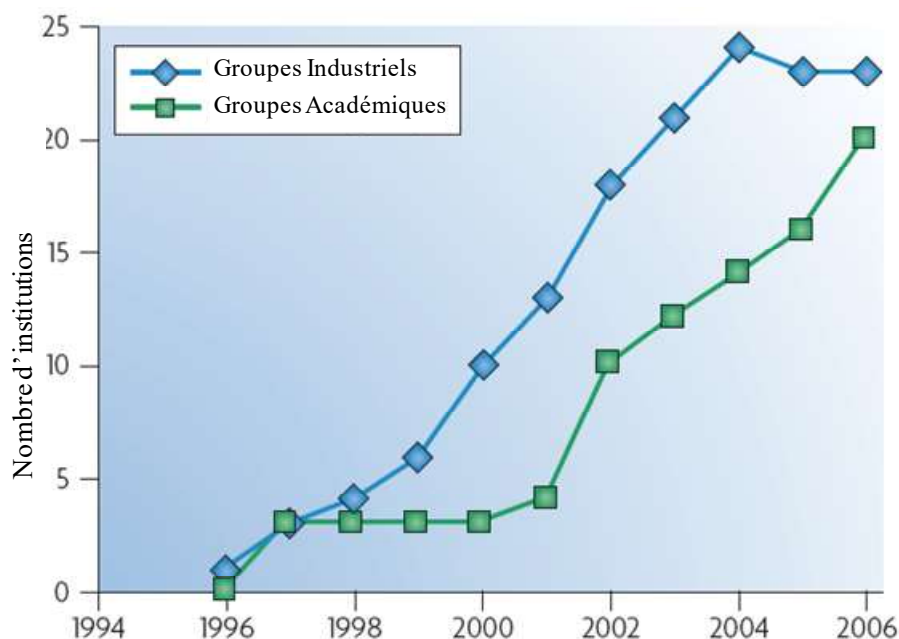


Figure 52 : Evolution du nombre de groupes de recherche ayant publiés des travaux basés sur l'approche par fragment entre 1996 et 2006.¹⁹⁹

1.2 Définition d'un fragment

Par la suite, l'utilisation du concept d'approche par fragments comme méthode de découverte de hits a connu une remarquable expansion, sans pour autant qu'une définition rigoureuse des caractéristiques d'un « fragment » ne soit donnée. Dans l'esprit de l'approche par fragments, un fragment peut être défini comme une unité moléculaire occupant une seule poche de liaison.

En observant les hits issus de criblages de petites molécules, Congreve *et al.*²⁰⁰ ont publié une « règle de 3 » pour définir les caractéristiques requises par un fragment, en utilisant les mêmes paramètres que ceux utilisés par Veber et Lipinski. Cette règle est aujourd'hui largement utilisée lors de la conception de chimiothèques de fragments. Les critères de cette règle de 3 sont présentés dans le Tableau 2.

²⁰⁰ M. Congreve, *et al.*, *Drug Discovery Today* **2003**, 8 (19), 876-877.

Règle de 3

Masse Molaire (MW) < 300 g/mol

Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène ($H-Acc$) < 3

Nombre de donneurs de liaisons hydrogène ($H-Don$) < 3

LogP < 3

Nombre de liaisons à libre rotation ($NRot$) < 3

Surface Polaire (PSA) < 60 Å²

Tableau 2 : Règle de 3 définissant un fragment, par Congreve *et al.*²⁰⁰

I.3 Stratégie d'approche par fragments vs. Criblage à haut débit

L'apparition du concept d'approche par fragments a complètement modifié la manière d'aborder l'identification de hits dans le processus de découverte de médicaments. L'objectif n'est plus d'identifier directement un ou plusieurs composés ayant une forte affinité pour la cible (< 1µM) en criblant le plus grand nombre de molécules possibles, mais d'identifier de petites molécules (appelées fragments), certes peu actives (activités souvent supérieures à 10µM), mais liées à la poche de manière optimale pour ensuite construire pas à pas un composé plus puissant. Le criblage d'un petit nombre de composés (~1000 molécules) permet également de couvrir une diversité chimique plus importantes que les criblages haut débit actuels. D'autres différences entre les deux techniques découlent de cette opposition dans la stratégie.

Le Tableau 3, extrait des travaux de Rees *et al.*²⁰¹, présente ainsi les différences lors de la mise en place de criblages basés sur les stratégies d'approche par fragments (FBDD) ou de criblage haut débit (HTS).

²⁰¹ D. C. Rees, *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, 3 (8), 660-672.

	FBDD	HTS
Critère recherché	Efficacité	Activité
Nombre de produits criblés	10^2 - 10^4	10^5 - 10^7
Masse molaire	150-300	250-600
Activité moyenne des Hits	30 μ M-1mM	10 nM-30 μ M
Mode de liaison des Hits	Optimisé, la plupart des atomes prennent part aux interactions avec la protéine	Les hits possèdent souvent des groupements qui participent peu aux interactions avec la protéine
Optimisation	Nécessite la synthèse d'un faible nombre de composés pour ajouter de nouvelles interactions spécifiques	Nécessite souvent un grand nombre de phases d'optimisation avec un grand nombre de produits synthétisés

Tableau 3 : Différences entre les techniques FBDD et HTS selon Rees *et al.*²⁰¹

Tout d'abord, les fragments, pour se fixer de manière optimale, doivent être plus petits ($150 < MW < 300$) et moins complexes que les composés évalués lors d'un criblage HTS ($250 < MW < 600$).

Du fait de leur petite taille, ces fragments vont réaliser un nombre limité d'interactions avec la protéine cible, ce qui explique leur faible activité. Cependant, les hits obtenus par cette approche possèdent un mode de liaison plus optimal (Figure 53), rendant ainsi l'optimisation plus directe.

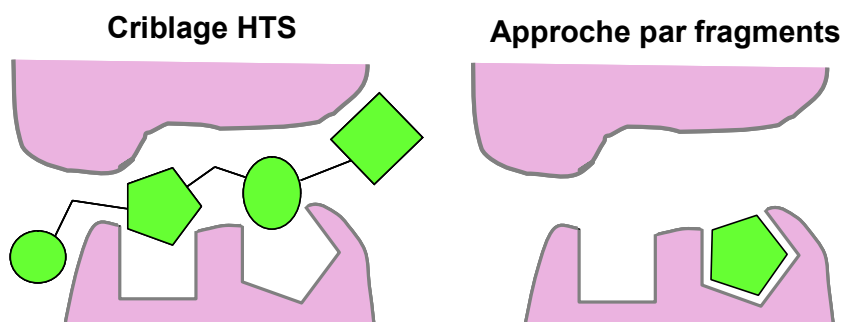


Figure 53 : Schématisation du mode de liaison de 2 hits issus d'un criblage HTS ou FBDD.

Ainsi, une analyse a été menée au sein de la société Abbott afin de comparer les résultats obtenus entre les approches HTS ou FBDD sur 45 protéines cibles. Les résultats présentés Figure 54 indiquent tout d'abord que l'approche par fragment a permis l'identification de hits dans 76% des cas contre 53% pour l'approche HTS (Figure 54, A), validant l'hypothèse selon laquelle le criblage d'une chimiothèque de petites molécules permet de mieux couvrir la diversité chimique et donc de fournir des hits contre un plus grand nombre de protéines cibles.

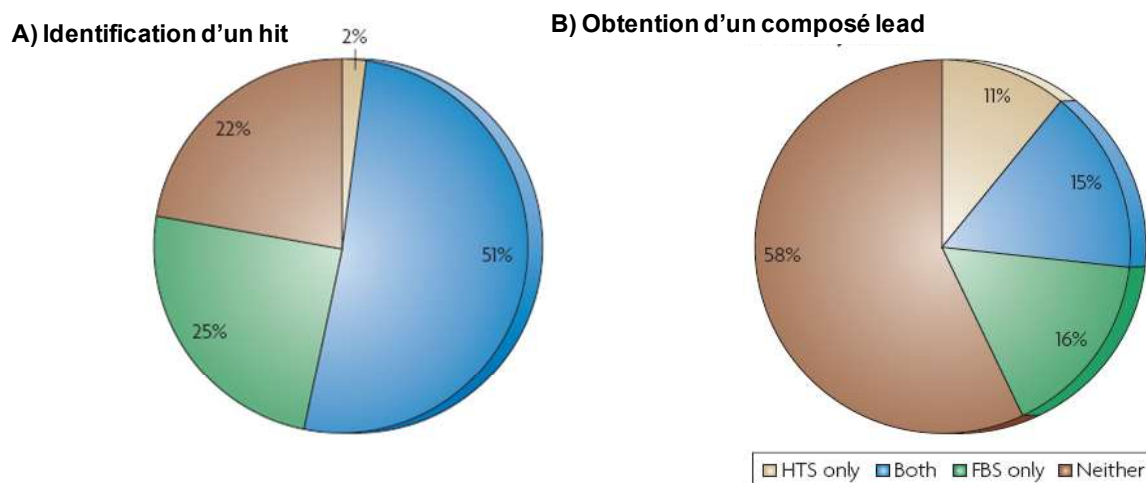


Figure 54 : Comparaison des approches FBDD et HTS. Résultats obtenus pour 45 cibles.

Des inhibiteurs puissants ($IC_{50} < 100$ nM) ont pu être obtenus pour 31% des cibles par l'approche FBDD contre 26% pour l'approche HTS (Figure 54, B). Néanmoins, il ne faut pas voir la stratégie FBDD comme un concurrent de la stratégie HTS, mais plutôt comme un outil complémentaire de découvertes de hits. Ces travaux, même s'ils montrent que l'approche par fragment permet d'identifier des hits pour un plus grand nombre de cibles, vont dans ce sens en insistant sur le fait que les deux techniques menées en parallèle permettent d'augmenter fortement les chances d'obtention d'un composé lead.

1.4 Notion de Ligand Efficiency et autres échelles apparentées

Comme nous l'avons vu précédemment, l'objectif principal d'une approche par fragments n'est pas d'identifier des composés puissants mais bien des composés « efficaces » où tous les groupes d'atomes contribuent à l'activité en prenant part aux interactions avec la protéine. Afin de mesurer ce critère d'efficacité, un nouvel outil a été imaginé par Hopkins *et al.*²⁰² : le coefficient LE (Ligand Efficiency) (Figure 55). Ce coefficient est alors utilisé pour pouvoir classer les fragments lors d'un criblage selon leur efficacité et non selon leur activité.

$$LE = \frac{\Delta G}{HA} = \frac{-RT \times \ln(K_d)}{HA}$$

Figure 55 : Définition de l'efficacité (LE) d'un ligand, HA = Heavy Atoms (tout atome autre qu'un atome d'Hydrogène).

²⁰² A. L. Hopkins, *et al.*, *Drug Discovery Today* **2004**, 9 (10), 430-431.

Le coefficient LE est un outil qui normalise l'affinité du ligand pour la cible par rapport à sa structure. L'efficacité est égale à l'énergie libre de liaison du ligand à la protéine (ΔG) divisée par le nombre d'atomes lourds (HA pour Heavy Atom).

Ce coefficient permet donc de rendre compte de l'apport de chaque atome dans l'affinité du ligand pour la protéine et permet de classer les différents hits issus d'un criblage ou les composés synthétisés lors des phases d'optimisation. Dans la formule Figure 55, le K_d peut être remplacé par d'autres valeurs d'activité biologique obtenues lors des criblages comme l' IC_{50} , l' EC_{50} ou le K_i .

Carr *et al.*²⁰³ donnent une représentation du concept de Ligand Efficiency (Figure 56). Sur la Figure 56a, on retrouve un graphique donnant l'activité des composés en fonction de leur nombre d'atomes lourds. Le trait gras correspond à une valeur de LE de 0.3 (valeur obtenue pour un composé possédant un poids moléculaire d'environ 500g.mol⁻¹ et une activité d'environ 10nM), souvent considérée comme valeur critique. En effet, l'efficacité étant rarement améliorée au cours du processus d'optimisation, il est classiquement admis qu'un bon composé hit pour entamer une approche par fragments doit avoir un LE d'au moins 0.3. Cette droite permet donc de faire la distinction entre les composés « efficaces » et les composés « peu efficaces ».

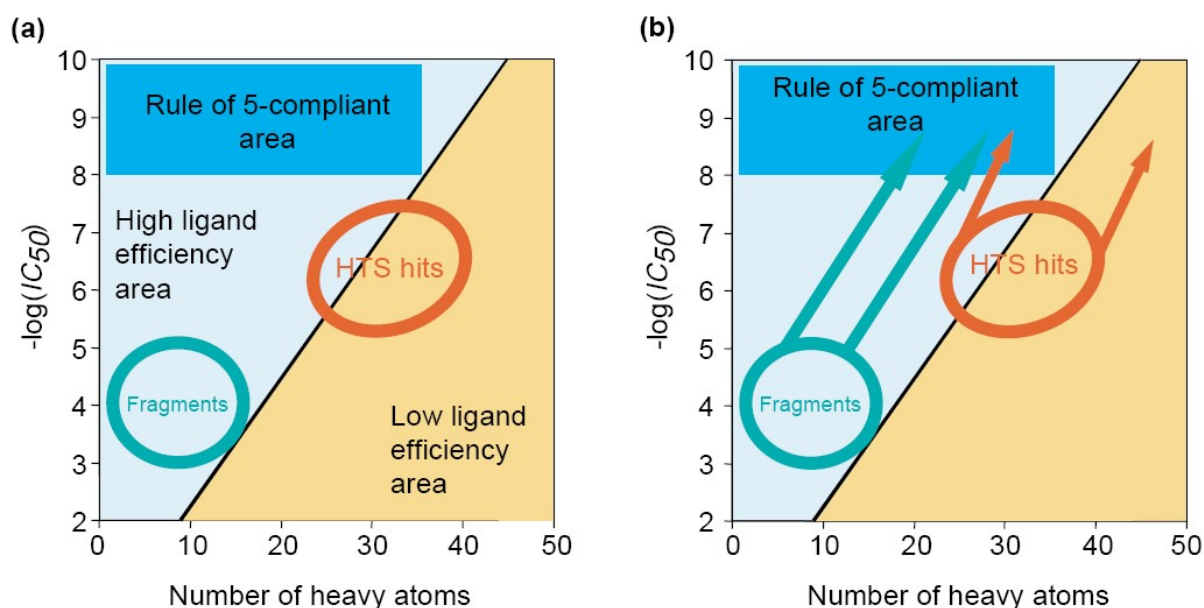


Figure 56 : Ligand efficiency et développement chimique de hits issus d'approches par fragments ou HTS.²⁰³

Le rectangle bleu foncé représente la zone où se trouvent les candidats médicaments potentiels, possédant une activité d'au moins 10nM et respectant les règles de Lipinski. La Figure 56b montre bien qu'une optimisation sans perte d'efficacité de hits issus d'une approche par fragments a

²⁰³ R. A. E. Carr, *et al.*, *Drug Discovery Today* **2005**, 10 (14), 987-892.

plus de chance d'aboutir à un composé actif respectant les règles de Lipinski qu'un hit issu d'une approche HTS.

Le calcul du coefficient LE ne sert pas uniquement à classer les fragments obtenus lors d'un criblage mais il peut également être utilisé tout au long du processus d'optimisation afin d'évaluer la qualité des composés lead générés, par rapport aux fragments de départ.

Ce coefficient est actuellement le plus répandu mais d'autres coefficients dérivés du LE sont également utilisés, notamment lorsque l'on s'intéresse à d'autres caractéristiques que l'activité des composés.

Ainsi, des coefficients comme le LLE, le LELP ou le LLE_{AT} (Figure 57) sont utilisés pour prendre également en compte la lipophilie des composés.^{204,205,206}

$$LLE = pIC_{50} - c \log P \quad LELP = \frac{\log P}{LE} \quad LLE_{AT} = 0.11 - \frac{\Delta G^*}{HA}$$

Figure 57 : Définition des coefficients LLE, LELP et LLE_{AT}.

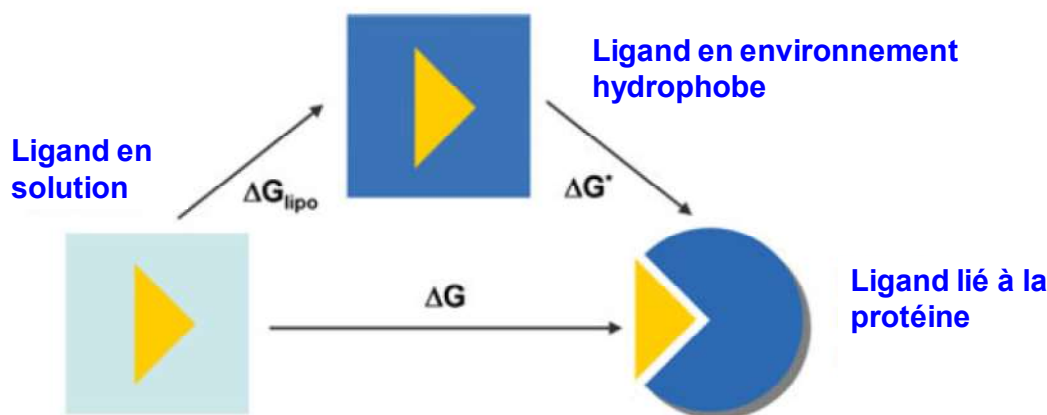
L'un de ces coefficients, le LLE_{AT}, a été développé récemment par la société Astex.²⁰⁷ Dans un grand nombre de cas, l'affinité d'un ligand pour une protéine résulte en grande partie du passage favorable de ce dernier d'une solution aqueuse à un environnement hydrophobe. Ainsi, on peut séparer la liaison d'un ligand à une protéine en deux étapes (Figure 58), la première correspondant au passage du composé de la solution aqueuse jusqu'à un environnement hydrophobe non spécifique, avec une variation d'énergie libre ΔG_{lipo} , et la seconde correspondant à la liaison spécifique du ligand avec une variation d'énergie libre ΔG^* . On remarque que la grandeur ΔG^* est reliée au LogP, et est même proportionnelle au coefficient LLE (Figure 58). Le coefficient LLE_{AT} (Figure 57) est défini comme le coefficient LE (Figure 55) en remplaçant le ΔG par le ΔG^* , qui fait intervenir un paramètre de lipophilie. Un terme constant (0.11) a été ajouté afin d'aligner les valeurs du LLE_{AT} sur celle du LE (valeur limite = 0.3).

²⁰⁴ P. D. Leeson, *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, 6 (11), 881-890.

²⁰⁵ G. M. Keserü, *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, 8 (3), 203-212.

²⁰⁶ Á. Tarcsay, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55 (3), 1252-1260.

²⁰⁷ P. Mortenson, *et al.*, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2011**, 25 (7), 663-667.



$$\Delta G^* = \Delta G - \Delta G_{lipo}$$

$$\Delta G^* = \ln(10) \times RT (\log P - pK_d)$$

Figure 58 : Représentation en deux étapes du processus de liaison d'un ligand à une protéine. Première étape, transfert du composé depuis la solution aqueuse vers un environnement hydrophobe avec une variation d'énergie libre ΔG_{lipo} , favorable pour la plupart des molécules hydrophobes. Deuxième étape, liaison spécifique du composé à la protéine avec une variation d'énergie libre ΔG^* .²⁰⁷

Les auteurs conseillent de suivre à la fois l'évolution des coefficients LE et LLE_{AT} lors du développement d'une approche par fragments afin d'éviter des améliorations d'activité uniquement causées par la lipophilie.

Un autre coefficient assez répandu est le coefficient d'efficacité GE (Group Efficiency)²⁰⁸ utilisé pour quantifier l'efficacité d'un groupement ajouté à un composé existant A pour donner un nouveau composé B. Il est égal au rapport entre la variation de l'énergie libre de liaison entre les molécules A et B et la variation du nombre d'atomes lourds (Figure 59).

$$GE = \frac{\Delta \Delta G}{\Delta HA} = \frac{-RT \times \ln(K_d(B)) + RT \times \ln(K_d(A))}{HA(B) - HA(A)}$$

Figure 59 : Définition du coefficient GE.²⁰⁸

Ce coefficient possède deux principales applications. Tout d'abord, c'est un outil de mesure beaucoup plus sensible à la qualité du groupement ajouté sur la molécule A, bien plus que la simple variation du LE entre les molécules A et B. Par exemple, prenons le cas d'un phényle ajouté à une molécule A (pIC₅₀ = 5.9) possédant 25 atomes lourds, donnant lieu à une molécule B dix fois plus active (pIC₅₀ = 6.9). Les deux molécules A et B ont alors respectivement un LE de 0.33 et 0.31 et l'on

²⁰⁸ M. L. Verdonk, *et al.*, *ChemMedChem* **2008**, 3 (8), 1179-1180.

pourrait conclure que l'on a quasiment conservé l'efficacité de la molécule en augmentant fortement l'activité. Cependant si l'on considère le coefficient GE du groupement phényle ainsi ajouté, il est de 0.23, indiquant que ce groupement contribue de manière beaucoup moins efficace à l'activité que le reste de la molécule.

Le coefficient GE peut être utilisé en sens inverse dans le but de prédire le gain d'activité minimal que doit apporter un substituant ajouté à une molécule. Dans l'exemple utilisé précédemment, l'ajout du phényle doit améliorer l'activité d'un facteur 22 au moins pour ne pas diminuer l'efficacité du composé.

Il existe un nombre très important d'autres coefficients pour évaluer la qualité des molécules lors des phases de développement. Certains prennent en compte la masse molaire (BEI pour Binding Efficiency Index, PEI pour Per cent Efficiency Index)²⁰⁹ ou la surface polaire (SEI pour Surface Efficiency Index)²⁰⁹ plutôt que le nombre d'atomes lourds. Le pourcentage de carbones sp³ (Fsp³)²¹⁰ est également utilisé.

1.5 Méthodes d'identification de fragments

Les techniques de criblage haut débit utilisées lors des campagnes HTS ne permettent en général pas de mesurer des activités supérieures à 10µM. Les chimiothèques conçues pour les approches par fragments contiennent entre 100 et 10 000 composés et peuvent ainsi être criblées par des techniques à plus faible débit mais capables de mesurer des activités supérieures à 10µM (jusqu'à 10mM). Un des inconvénients directs est la nécessité de pouvoir réaliser le test avec des concentrations en protéines et en ligand plus élevées.

Historiquement, la RMN 1D est la première technique à avoir été utilisée pour la découverte de fragments. Les techniques de RMN STD (Saturation Transfer Difference) et Water-LOGSY (Water-Ligand Observation with Gradient SpectroscopY) sont les plus répandues. Les techniques de RMN 2D sont plus puissantes pour caractériser la liaison d'un ligand à une protéine, mais sont plus difficiles à mettre en place car elles nécessitent l'utilisation de protéines marquées au ¹³C ou à ¹⁵N.²¹¹

Aujourd'hui encore, la RMN est une technique de premier choix pour le criblage lors d'une approche par fragments, néanmoins d'autres techniques ont peu à peu été développées.

La seconde technique la plus répandue comme criblage primaire mais également comme criblage secondaire, est la cristallographie aux rayons-X. Ce développement a été permis par les nombreuses avancées technologiques récentes, permettant la robotisation et donc l'obtention plus

²⁰⁹ C. Abad-Zapatero, *Expert Opinion on Drug Discovery* **2007**, 2 (4), 469-488.

²¹⁰ F. Lovering, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52 (21), 6752-6756.

²¹¹ H. Jhoti, *et al.*, *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, 11 (5), 485-493.

rapide d'un grand nombre de structures cristallographiques. La connaissance du mode de liaison des fragments identifiés est un réel avantage permettant d'accélérer considérablement le processus d'optimisation, comme nous allons l'illustrer par la suite.

Malheureusement, ces deux techniques s'avèrent être très coûteuses en protéine, et toutes les protéines ne sont pas susceptibles de cristalliser facilement.

D'autres techniques ont alors fait leur apparition, parmi lesquelles on trouve la résonance plasmonique de surface (p.135) qui permet de mesurer des paramètres à la fois cinétiques (constantes d'association et de dissociation) et thermodynamiques (constante d'affinité). Elle est de plus en plus utilisée comme technique de criblage lors d'une approche par fragment.²¹² Le succès de cette technique peut s'expliquer par sa consommation faible en protéine, sa capacité à mesurer de faibles activités avec un taux de faux négatifs très faible, son débit relativement important et le grand nombre d'informations qui peuvent être obtenues avec une seule expérience. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans la capacité du partenaire immobilisé à toujours interagir avec le second partenaire après fixation à la surface. Les techniques de calorimétrie (DSC, ITC) peuvent alors être utilisées.

Enfin, une autre méthode utilisée pour l'identification de fragments se base sur la spectroscopie de masse, pour détecter soit des complexes protéine/ligand par ESI-MS²¹³ soit pour détecter des fragments liés de manière covalente à la cible par un pont disulfure, en utilisant une chimiothèque de fragments contenant une fonction thiol et une protéine mutée qui possède un résidu cystéine à proximité de son site actif.²¹⁴

1.6 Cibles biologiques

La stratégie FBDD est appliquée à la découverte d'inhibiteurs de cibles biologiques de plus en plus variées. Cependant, certaines catégories de protéines ont donné lieu à un plus grand nombre de succès, notamment les kinases, les sérine-protéases, les métallo-protéases, et les phosphatases.²¹⁵

L'approche par fragment permet donc d'obtenir des inhibiteurs potentiels sur un grand nombre de protéines, mais est également de plus en plus utilisée comme outil permettant de prédire la capacité d'une protéine à lier de petites molécules, ce qui est une condition nécessaire mais non suffisante à la

²¹² I. Navratilova, *et al.*, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 1 (1), 44-48.

²¹³ S. A. Hofstadler, *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5 (7), 585-595.

²¹⁴ J. D. Oslob, *et al.*, *Drug Discovery Today: TARGETS* **2004**, 3 (4), 143-150.

²¹⁵ A. A. Alex, *et al.*, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2007**, 7 (16), 1544-1567.

validation d'une protéine comme cible thérapeutique. Ainsi, Edfeldt *et al.* (AstraZeneca)²¹⁶ ont mené sur 36 protéines cibles à la fois un criblage HTS et un criblage de fragments. En se basant sur trois critères, le hit rate, l'affinité des hits et la diversité chimique des hits, les 36 protéines ont été classées en trois catégories

- High : forte probabilité de découverte d'un ligand.
- Medium : probabilité moyenne de découverte d'un ligand.
- Low : faible probabilité de découverte d'un ligand.

En comparant les résultats du criblage HTS avec les scores attribués suite au criblage de fragments, les auteurs ont notamment relevé qu'aucun hit n'a été identifié pour la totalité des protéines classées dans la catégorie « Low » (Figure 60). De plus, même si un hit a pu être identifié par une autre méthode, son développement s'avère plus difficile pour cette classe de protéine.

Les auteurs proposent donc d'utiliser le criblage d'une petite chimiothèque de fragments afin de classer les cibles thérapeutiques potentielles par ordre de priorité avant la mise en œuvre de campagne de criblage HTS par exemple.

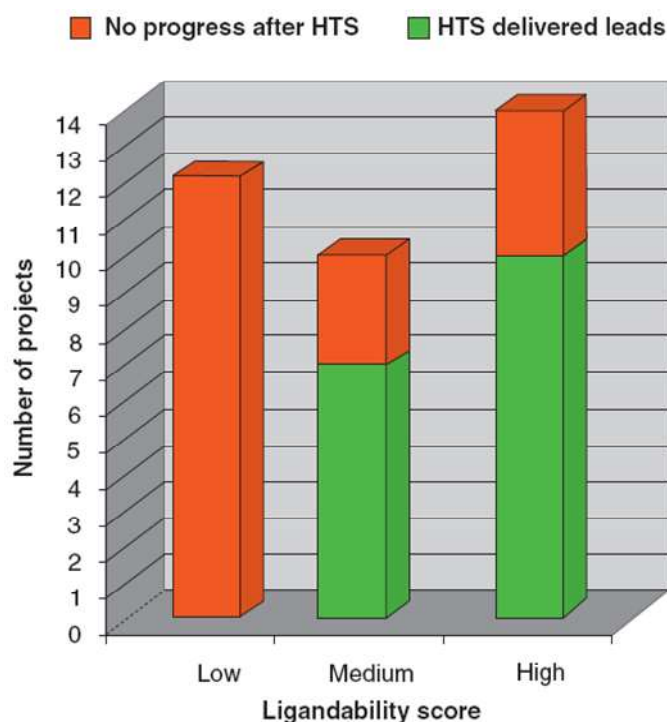


Figure 60 : Utilisation de l'approche par fragment pour prédire la capacité d'une protéine à lier une petite molécule.²¹⁶

²¹⁶ F. N. B. Edfeldt, *et al.*, *Drug Discovery Today* **2011**, 16 (7-8), 284-287.

1.7 Stratégies d'optimisation en approche par fragments

Une fois qu'un ou plusieurs hits ont été identifiés par les méthodes décrites précédemment, le processus d'optimisation commence et peut s'appuyer sur différentes stratégies.

1.7.1 La stratégie de « fragment growing »

La stratégie de « fragment growing » (aussi appelée « fragment evolution ») est la plus répandue et généralement la plus efficace pour développer des hits issus d'une approche par fragment. Nous avons vu qu'un fragment est une petite molécule qui occupe généralement une des poches du domaine de liaison. La stratégie « fragment growing » consiste à ajouter des groupements fonctionnels sur cette petite molécule afin de venir interagir avec les poches voisines (Figure 61) pour augmenter l'activité.

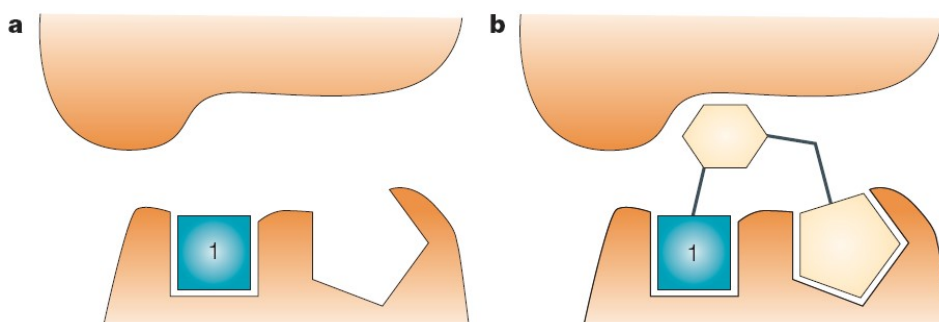
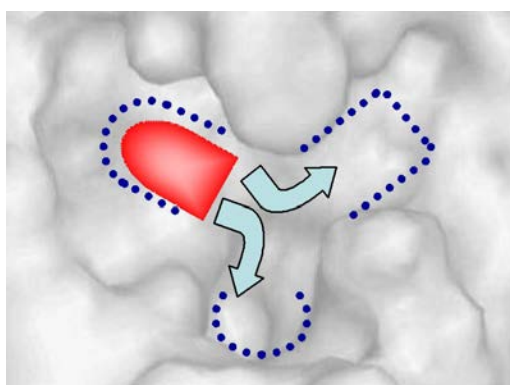


Figure 61 : Stratégie « fragment growing »

La molécule initiale étant de très petite taille, les possibilités d'évolution sont multiples. Ainsi, des informations sur le mode de liaison du composé à la cible, obtenues par spectroscopie RMN ou cristallographie aux rayons-X, permettent d'orienter et d'accélérer l'optimisation (structure-based drug design). En effet, en connaissant l'environnement du composé dans la poche de liaison, il sera plus

facile d'émettre des hypothèses sur la façon de concevoir des molécules plus élaborées qui réalisent des interactions supplémentaires avec la protéine.

Cette approche ne peut-être efficace que si le fragment identifié est réellement un point d'ancrage et ne change pas de mode de liaison au cours du processus d'optimisation.²¹⁷

1.7.2 La stratégie de « fragment linking »

Si, lors du criblage, plusieurs fragments se liant dans des poches de liaisons bien distinctes et suffisamment proches spatialement (Figure 62 a et b) sont identifiés, ils peuvent être chimiquement reliés par un « linker » pour donner des molécules plus actives (Figure 62 c). Des informations structurales permettant d'évaluer la longueur et la géométrie nécessaires pour le « linker » sont indispensables.

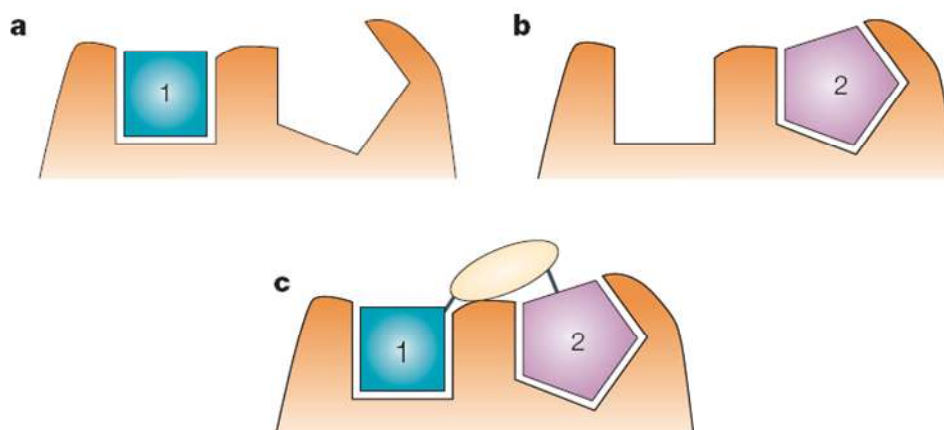


Figure 62 : Stratégie de fragment linking

On considère souvent de manière simplifiée que l'augmentation d'activité qui peut-être attendue en reliant les deux fragments est obtenue par additivité des énergies de liaison (par exemple, deux produits d'activité millimolaire peuvent conduire à un composé micromolaire). Ceci nécessite que la contribution du linker et de la perte de flexibilité des fragments initiaux soient négligeables.

Sinon, la constante de dissociation K_D^{AB} d'une molécule AB obtenue par liaison de deux fragments A et B est égale au produit des constantes K_D^A et K_D^B des deux fragments A et B et d'un coefficient de liaison E (Figure 63).^{218,219} Le coefficient de liaison E rend compte à la fois de la contribution entropique favorable due à la perte de flexibilité des deux fragments mais peut également

²¹⁷ P. J. Hajduk, *Nature Chemical Biology* **2006**, 2 (12), 658-659.

²¹⁸ W. P. Jencks, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, 78 (7), 4046-4050.

²¹⁹ V. Borsi, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 53 (10), 4285-4289.

contenir une contribution enthalpique positive ou négative due aux changements conformationnels induits par le linker ainsi qu'aux interactions favorables ou défavorables du linker avec la protéine.

$$K_D^{AB} = K_D^A \times K_D^B \times E$$

Figure 63 : Additivité des energies de liaison

De manière générale, on observe que la position initiale des fragments est rarement conservée. De plus, le nombre réduit de « linkers » disponibles limite le développement lors de la stratégie « linking », qui est souvent moins efficace que la stratégie « growing ».

1.7.3 La stratégie de « fragment self-assembly »

La stratégie d'auto-assemblage est basée sur la stratégie « linking ». Dans ce cas là, des fragments occupant des poches voisines possèdent également des fonctions chimiques susceptibles de réagir l'une avec l'autre au sein de la protéine (Figure 64, a) pour former un seul inhibiteur plus puissant que les deux fragments de départ (Figure 64, b). Dans cette stratégie, la protéine « synthétise » elle-même ses propres inhibiteurs puisqu'elle catalyse la réaction de liaison des deux fragments qu'elle préselectionne elle-même en fonction de leur affinité. Les inhibiteurs étant liés de façon non covalente à la cible, ils peuvent être isolés et analysés. Parmi les exemples d'approche d'auto-assemblage présents dans la littérature on retrouve principalement des stratégies basées sur des réactions de *click-chemistry*.

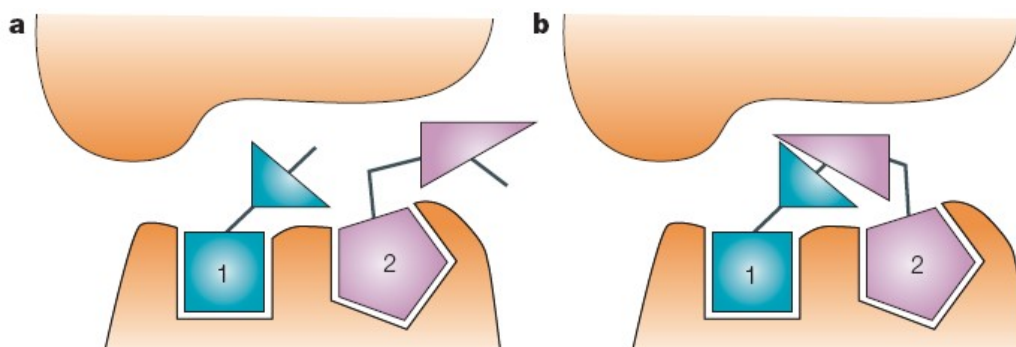


Figure 64 : Stratégie de fragment self-assembly.

1.7.4 La stratégie de « fragment merging »

Cette quatrième stratégie nécessite l'utilisation d'un ligand déjà connu de la protéine (Figure 65, B), issu ou non d'une approche par fragments. On identifie ensuite un fragment dont le mode de liaison peut être déterminé (Figure 65, A). Or, nous avons vu précédemment que les fragments ont une plus forte probabilité d'occuper de manière optimale le domaine au sein duquel ils se lient. La stratégie de « fragment-merging » consiste alors à venir introduire le fragment identifié dans la structure du ligand connu afin d'augmenter son affinité pour la cible (Figure 65, C).

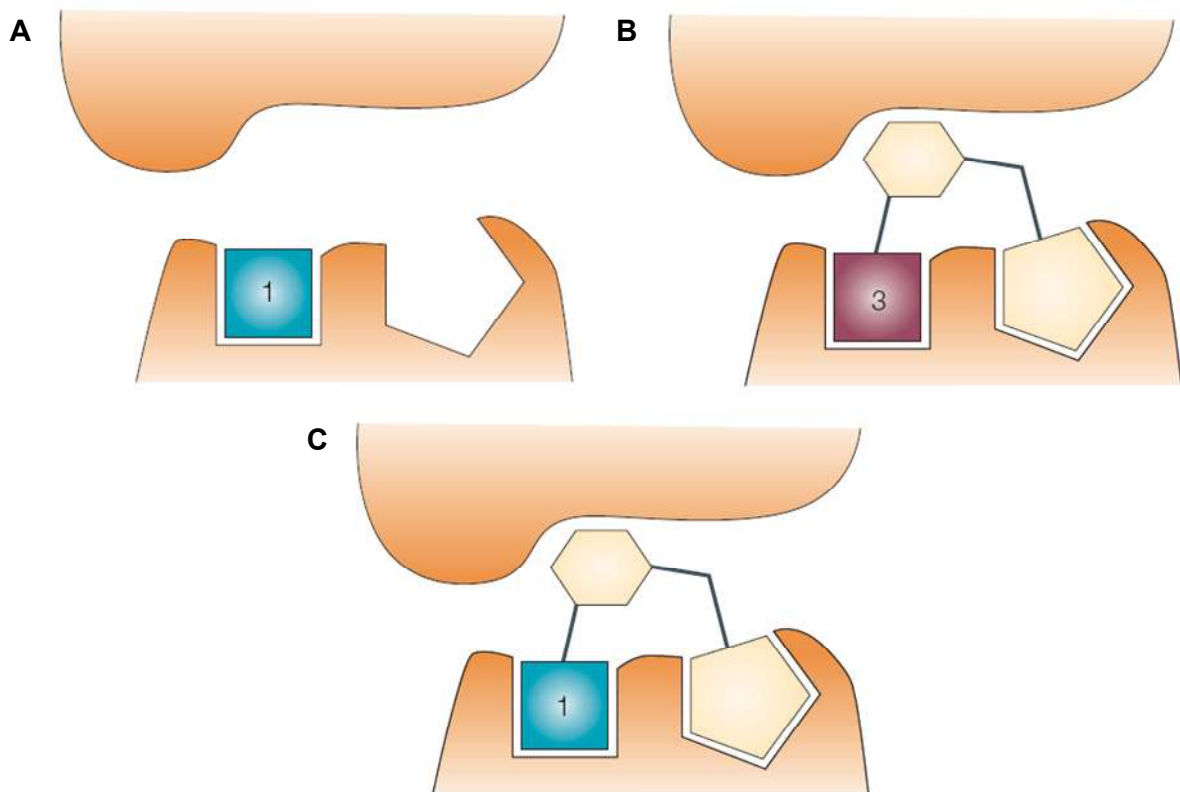


Figure 65 : Stratégie de fragment merging.

1.8 Limites de l'approche par fragments et perspectives

Nous avons insisté jusqu'à présent sur tous les points forts de l'approche par fragments par rapport aux techniques utilisées actuellement. Cependant, cette stratégie montre également quelques inconvénients et limites.

- Les faibles activités mesurées requièrent de pouvoir effectuer les tests à haute concentration. Cela signifie qu'il faut être capable de pouvoir produire la protéine en grande quantité et posséder des

techniques permettant la détection de faibles activités. Dans les conditions du test, à forte concentration, il y a également des risques de précipitation des composés ou des protéines mis en jeu.

- L'optimisation des hits se fait essentiellement sur la base de la structure de la protéine et du mode de liaison du ou des fragments. Ainsi, cette stratégie s'avère plus difficile à mettre œuvre avec par exemple des récepteurs couplés aux protéines G, des canaux ioniques ou d'autres protéines membranaires difficilement cristallisables. L'absence de connaissances à ce niveau peut alors être un frein important à l'optimisation des composés hits identifiés.

Malgré ces limitations, cette technique a déjà permis de développer des inhibiteurs pour certaines cibles récalcitrantes aux criblages HTS notamment (BACE1²¹⁶ par exemple). Le développement de l'approche par fragments va dépendre principalement dans le futur de la capacité à faire évoluer les techniques de criblages, afin d'augmenter les débits et de diminuer les coûts en protéine, mais aussi de la capacité à produire, isoler en grande quantité et obtenir des informations structurales sur un nombre toujours plus important de protéines cibles. Le succès que vont rencontrer en phases cliniques les composés lead issus d'une approche par fragment peut également amener à approfondir et à généraliser cette stratégie de découverte de médicaments.

Actuellement, les chimiothèques de fragments sont principalement constituées de molécules commerciales mais de plus en plus de groupes travaillent sur la synthèse de nouveaux motifs à incorporer à ces chimiothèques afin d'augmenter toujours plus la diversité chimique des composés issus de cette approche.

1.9 Les « fragments » en développement clinique

1.9.1 Les médicaments et candidats cliniques issus d'approches par fragments

Depuis la fin des années 90, de nombreuses entreprises de biotechnologies spécialisées dans l'approche par fragments ont vu le jour.²²⁰ La société Abbott à l'origine de l'approche par fragments a beaucoup contribué à son développement avec de nombreuses avancées techniques et de nombreuses publications sur le sujet.

L'année 2002 marque un tournant dans l'évolution de l'approche par fragments : la molécule LY-517717, inhibiteur du facteur Xa développé par la société Lilly, en partenariat avec la société Protherics, entre en essai clinique comme anticoagulant. Par la suite, les nombreuses petites entreprises spécialisées en approche par fragments ont commencé à lancer des composés en essai clinique.

A partir de 2006, très certainement en réponse au succès croissant des programmes de découverte de médicaments issus de cette approche, la quasi-totalité des grandes compagnies pharmaceutiques ont repensé leurs chimiothèques en y intégrant des « fragments ».

En 2008, Congreve et al.²²¹ ont dressé un premier récapitulatif des composés issus d'approches par fragments qui a ensuite été mis à jour en 2009 par Chessari et Woodhead.²²² Le Tableau 4 est lui-même une mise à jour des travaux de Chessari et Woodhead, mais ne présente pas les éventuels nouveaux candidats médicaments entrés en essais cliniques depuis.

Aujourd'hui, une quinzaine de composés issus de ces approches par fragments sont en essais cliniques, et ils sont encore plus nombreux actuellement en développement pré-clinique.

²²⁰ W. Warr, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2009**, 23 (8), 453-458.

²²¹ M. Congreve, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51 (13), 3661-3680.

²²² G. Chessari, *et al.*, *Drug Discovery Today* **2009**, 14 (13-14), 668-675.

Composé	Société	Cible	Indication	Statut	Méthode de détection
Vemurafenib (PLX-4032)	Plexxikon	B-Raf ^{V600E}	Mélanome avancé	Approuvé	Rayons-X
Navitoclax (ABT-263)	Abbott	Bcl-2/Bcl-X _L	Leucémie	Phase II	RMN
AT9283	Astex	Aurora	Leucémie/Cancer	Phase II	Rayons-X
LY-517717	Lilly/Protherics	FXa	Anti-coagulant	Phase II	Rayons-X
NVP-AUY-922	Novartis/Vernalis	Hsp90	Cancer du sein	Phase II	RMN
Indeglitazar (PLX-294/PPM-204)	Plexxikon	PPAR (agoniste)	Diabète de type II	Phase II	Rayons-X
AT7519	Astex	CDK2	Cancer	Phase II	Rayons-X
AT13387	Astex	Hsp90	Cancer	Phase II	RMN / Rayons-X
ABT-518	Abbott	MMP-2&9	Cancer	Phase I	RMN
IC-776	Lilly/ICOS	LFA-1	Psoriasis	Phase I	RMN
PLX-5568	Plexxikon	Kinase	Cancer du rein	Phase I	Rayons-X
SGX-523	SGX Pharmaceuticals	Met	Cancer	Phase I	Rayons-X
SNS-314	Sunesis	Aurora	Cancer	Phase I	SM

Tableau 4 : Composés en essais cliniques issus d'une approche par fragment. Données de Chessari *et al.* mis à jour le 05/07/2012.²²²

En Août 2011, le premier médicament issu d'une approche par fragment a reçu une autorisation de mise sur le marché de la FDA : le composé PLX-4032 de la société Plexxikon, développé en partenariat avec la société Roche. Ce composé est un inhibiteur spécifique de la kinase B-Raf et plus particulièrement de l'allèle V600E, où une Valine est remplacée par un acide Glutamique.

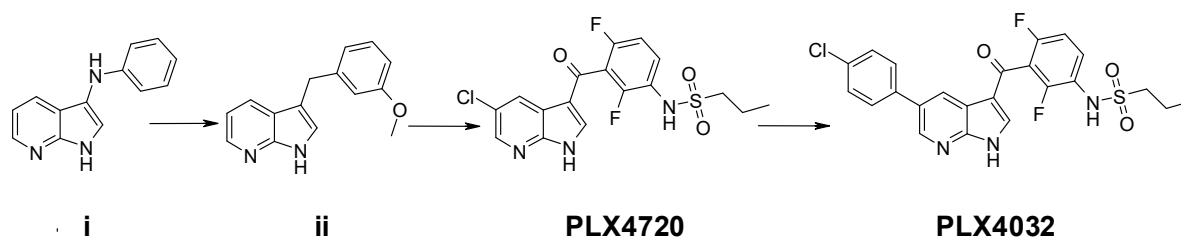


Figure 66 : Etapes dans l'optimisation du fragment 1 jusqu'au composé clinique PLX4032.

Le fragment i possédant un cycle 7-azaindole (Figure 66) a été découvert par test fonctionnel (inhibition de l'activité kinase, $IC_{50} = 100\mu\text{M}$) puis co-cristallisé avec la protéine. Il a été optimisé selon une stratégie de fragment growing pour donner les composés ii puis PLX4720, ce dernier possédant une IC_{50} de 13nM et une bonne sélectivité envers les autres kinases de la même famille (facteur >10). Une dernière phase d'optimisation a permis d'obtenir le composé PLX-4032, actuellement utilisé pour le traitement du mélanome avancé.

1.9.2 Approche par fragments et tuberculose

En 2005, Manger *et al.*²²³ ont décrit pour la première fois l'utilisation d'une approche par fragments pour la découverte de nouvelles molécules antituberculeuses, inhibitrices de la tyrosine phosphatase MptpA, impliquée dans la survie du bacille au sein des cellules du système immunitaire. Par la suite, en 2007 et 2009, Ellman *et al.*^{224,225} ont identifié grâce à cette approche de nouveaux inhibiteurs des protéines MptpB et MptpA. Jusqu'alors, les approches HTS avaient échouées dans le développement d'inhibiteurs puissants de ces deux protéines.

En 2009, Alvin *et al.*²²⁶ ont validé la panthoténate synthétase comme cible thérapeutique potentielle en utilisant à la fois une stratégie de « fragment growing » et de « fragment-linking » pour la découverte d'inhibiteurs de cette enzyme.

Enfin, Scheich *et al.*²²⁷ ont utilisé le criblage d'une chimiothèque de fragments par RMN pour identifier des inhibiteurs de l'Ag85C, impliqué dans le transfert des acides mycoliques à la paroi bactérienne.

Les fragments sont de petites molécules possédant de bonnes propriétés physico-chimiques, telle que la solubilité. Ces propriétés étant essentielles pour compenser la faible perméabilité membranaire de *M. tuberculosis*, les fragments sont donc un point de départ attractif pour le développement de nouveaux composés antituberculeux

²²³ M. Manger, *et al.*, *ChemBioChem* **2005**, 6 (10), 1749-1753.

²²⁴ M. B. Soellner, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (31), 9613-9615.

²²⁵ K. A. Rawls, *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19 (24), 6851-6854.

²²⁶ W. H. Alvin, *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48 (45), 8452-8456.

²²⁷ C. Scheich, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53 (23), 8362-8367.

II Bibliographie

190. Macarron, R., Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2006**, *11* (7-8), 277-279.
191. Brown, D.; Superti-Furga, G., Rediscovering the sweet spot in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8* (23), 1067-1077.
192. Wermuth, C. G., *The practice of medicinal chemistry-Third edition*. 2008.
193. Bohacek, R. S.; McMartin, C.; Guida, W. C., The art and practice of structure-based drug design: A molecular modeling perspective. *Medicinal Research Reviews* **1996**, *16* (1), 3-50.
194. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23* (1-3), 3-25.
195. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D., Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (12), 2615-2623.
196. Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W., Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* **1996**, *274* (5292), 1531-1534.
197. Hajduk, P. J.; Sheppard, G.; Nettesheim, D. G.; Olejniczak, E. T.; Shuker, S. B.; Meadows, R. P.; Steinman, D. H.; Carrera, G. M.; Marcotte, P. A.; Severin, J.; Walter, K.; Smith, H.; Gubbins, E.; Simmer, R.; Holzman, T. F.; Morgan, D. W.; Davidsen, S. K.; Summers, J. B.; Fesik, S. W., Discovery of Potent Nonpeptide Inhibitors of Stromelysin Using SAR by NMR. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (25), 5818-5827.
198. Hann, M. M.; Leach, A. R.; Harper, G., Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **2001**, *41* (3), 856-864.
199. Hajduk, P. J.; Greer, J., A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, *6* (3), 211-219.
200. Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H., A "Rule of Three" for fragment-based lead discovery? *Drug Discovery Today* **2003**, *8* (19), 876-877.
201. Rees, D. C.; Congreve, M.; Murray, C. W.; Carr, R., Fragment-based lead discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, *3* (8), 660-672.
202. Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A., Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discovery Today* **2004**, *9* (10), 430-431.
203. Carr, R. A. E.; Congreve, M.; Murray, C. W.; Rees, D. C., Fragment-based lead discovery: leads by design. *Drug Discovery Today* **2005**, *10* (14), 987-992.
204. Leeson, P. D.; Springthorpe, B., The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, *6* (11), 881-890.
205. Keserü, G. M.; Makara, G. M., The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *8* (3), 203-212.
206. Tarcsay, A.; Nyíri, K.; Keserü, G. M., Impact of Lipophilic Efficiency on Compound Quality. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (3), 1252-1260.
207. Mortenson, P.; Murray, C., Assessing the lipophilicity of fragments and early hits. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2011**, *25* (7), 663-667.
208. Verdonk, M. L.; Rees, D. C., Group Efficiency: A Guideline for Hits-to-Leads Chemistry. *ChemMedChem* **2008**, *3* (8), 1179-1180.
209. Abad-Zapatero, C., Ligand efficiency indices for effective drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2007**, *2* (4), 469-488.

210. Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C., Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (21), 6752-6756.
211. Jhoti, H.; Cleasby, A.; Verdonk, M.; Williams, G., Fragment-based screening using X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11* (5), 485-493.
212. Navratilova, I.; Hopkins, A. L., Fragment Screening by Surface Plasmon Resonance. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *1* (1), 44-48.
213. Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A., Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5* (7), 585-595.
214. Oslob, J. D.; Erlanson, D. A., Tethering in early target assessment. *Drug Discovery Today: TARGETS* **2004**, *3* (4), 143-150.
215. Alex, A. A.; Flocco, M. M., Fragment-based drug discovery: What has it achieved so far? *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2007**, *7* (16), 1544-1567.
216. Edfeldt, F. N. B.; Folmer, R. H. A.; Breeze, A. L., Fragment screening to predict druggability (ligandability) and lead discovery success. *Drug Discovery Today* **2011**, *16* (7-8), 284-287.
217. Hajduk, P. J., Puzzling through fragment-based drug design. *Nature Chemical Biology* **2006**, *2* (12), 658-659.
218. Jencks, W. P., On the attribution and additivity of binding energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, *78* (7), 4046-4050.
219. Borsi, V.; Calderone, V.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Sarti, N., Entropic Contribution to the Linking Coefficient in Fragment Based Drug Design: A Case Study. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *53* (10), 4285-4289.
220. Warr, W., Fragment-based drug discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2009**, *23* (8), 453-458.
221. Congreve, M.; Chessari, G.; Tisi, D.; Woodhead, A. J., Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (13), 3661-3680.
222. Chessari, G.; Woodhead, A. J., From fragment to clinical candidate-a historical perspective. *Drug Discovery Today* **2009**, *14* (13-14), 668-675.
223. Manger, M.; Scheck, M.; Prinz, H.; von Kries, J. P.; Langer, T.; Saxena, K.; Schwalbe, H.; Fürstner, A.; Rademann, J.; Waldmann, H., Discovery of Mycobacterium Tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase A (MptpA) Inhibitors Based on Natural Products and a Fragment-Based Approach. *ChemBioChem* **2005**, *6* (10), 1749-1753.
224. Soellner, M. B.; Rawls, K. A.; Grundner, C.; Alber, T.; Ellman, J. A., Fragment-Based Substrate Activity Screening Method for the Identification of Potent Inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis Phosphatase PtpB. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (31), 9613-9615.
225. Rawls, K. A.; Therese Lang, P.; Takeuchi, J.; Imamura, S.; Baguley, T. D.; Grundner, C.; Alber, T.; Ellman, J. A., Fragment-based discovery of selective inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (24), 6851-6854.
226. Alvin, W. H.; Silvestre, H. L.; Shijun, W.; Alessio, C.; Tom, L. B.; Chris, A., Application of Fragment Growing and Fragment Linking to the Discovery of Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Pantothenate Synthetase. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (45), 8452-8456.
227. Scheich, C.; Puetter, V.; Schade, M., Novel Small Molecule Inhibitors of MDR Mycobacterium tuberculosis by NMR Fragment Screening of Antigen 85C. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (23), 8362-8367.

Chapitre 3. Approche par fragments pour la découverte d'inhibiteurs d'EthR

I Découverte d'un composé hit

I.1 Identification du composé 1

Lors du développement de la famille « Lead1 » d'inhibiteurs du répresseur EthR, une approche de « click-chemistry *in situ* » a été menée avec pour objectif d'explorer plus en détails la poche de liaison de la protéine EthR.¹⁸⁹ Lors de cette approche, le composé **1** (Figure 67) a été identifié comme étant un ligand potentiel du répresseur EthR.

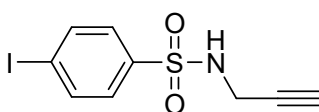


Figure 67 : Structure du composé 1.

Nous avons vu précédemment que la définition d'un « fragment » la plus largement acceptée est la règle de 3 proposée par Congreve *et al.*²⁰⁰ en 2003. Les données du Tableau 5 montrent que hormis une masse moléculaire trop élevée (due à la présence de l'atome d'iode), le composé **1** satisfait à tous les critères. De plus, sa solubilité très élevée (> 200 µM) en fait un excellent point de départ pour initier une approche par fragments afin de développer de nouveaux inhibiteurs de la protéine EthR.

Règle de 3	Composé 1
MW < 300	321,14
H-Acc < 3	2
H-Don < 3	1
LogP < 3	2,51
Nrot < 3	3
PSA < 60	54,55

Tableau 5 : Caractéristiques du composé 1.

Afin de mieux caractériser cette petite molécule, différents test biologiques ont été développés. Les informations fournies par ces trois tests sont complémentaires et permettent de valider le mode d'action des composés.

I.2 Evaluation biologique des composés

I.2.1 Le test de TSA (Thermal Shift Assay)

La dénaturation thermique des protéines est un phénomène étudié depuis longtemps, au moyen de nombreuses techniques, basées notamment sur la calorimétrie (DSC : Differential Scanning Calorimetry) ou la fluorescence (DSF : Differential Scanning Fluorimetry ou encore Fluorescence Thermal Shift Assay).²²⁸

Le test de Thermal Shift Assay utilise un marqueur fluorescent, dans notre cas le Sypro orangeTM. L'intensité de fluorescence de ce composé est amplifiée lorsqu'il se retrouve dans un environnement hydrophobe. Ainsi, dans des conditions normales, en solution aqueuse et en présence de la protéine native, le marqueur fluoresce peu, les zones hydrophobes de la protéine n'étant pas accessibles. Lorsque la protéine se dénature sous l'effet de la chaleur, le marqueur va pouvoir interagir avec ses régions hydrophobes, entraînant une augmentation de la fluorescence. On peut ainsi déterminer la température de fusion de la protéine, notée T_m , correspondant à un état où la protéine est dénaturée à 50%.

Cette technique permet de mesurer le pouvoir stabilisant ou déstabilisant sur la protéine d'un ligand spécifique. Pour cela, on effectue l'expérience avec la protéine seule puis en incubant la protéine avec un ligand potentiel. On obtient alors deux valeurs de températures de fusion différentes qui permettent de définir un écart de température ΔT_m exprimé en °C (Figure 68). Si $\Delta T_m > 0$, le ligand stabilise la protéine, si $\Delta T_m < 0$, le ligand déstabilise la protéine. Plus $|\Delta T_m|$ est grande, plus le pouvoir stabilisant ou déstabilisant du ligand est important. Or, le pouvoir stabilisant étant relié à l'affinité du ligand pour la protéine, plus ΔT_m est élevé et plus le ligand a d'affinité pour cette protéine.

²²⁸ A. Podjarny, *et al.*, *RSC Biomolecular Sciences* **2011**.

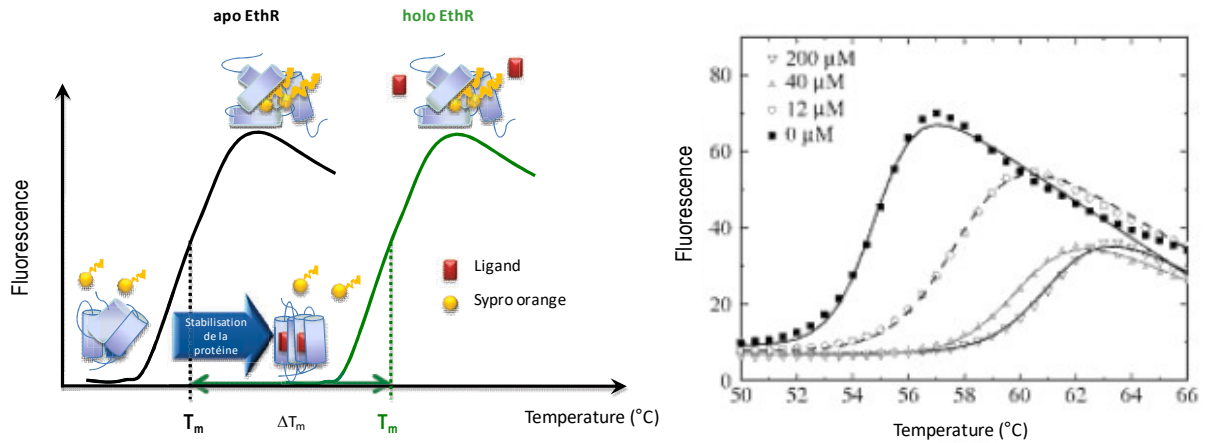


Figure 68 : A gauche : Principe de mesure du ΔT_m entre l'apoprotéine et l'holoprotéine. A droite : courbes expérimentales obtenues avec différentes concentrations de ligands. L'augmentation de la concentration entraîne une augmentation de la température de dénaturation de la protéine.²²⁸

Ce test de fluorescence TSA nous permet donc de quantifier l'affinité de nos ligands pour la protéine EthR et de les classer selon leur valeur de ΔT_m croissant.

1.2.2 Le test de Résonance Plasmonique de Surface (RPS)

Après avoir mesuré l'affinité des ligands pour la protéine, il est nécessaire de vérifier que cela conduit bien à l'inactivation du répresseur transcriptionnel, l'empêchant ainsi de se lier à son opéron.

Pour cela, nous utilisons un test fonctionnel basé sur le principe de la résonance plasmonique de surface.

La résonance plasmonique de surface (RPS) permet la visualisation en temps réel de phénomènes d'association ou de dissociation entre un partenaire immobilisé sur un biosenseur et un second partenaire injecté en flux continu sur cette surface.

Dans notre cas, la technique de RPS nous permet de visualiser l'interaction entre la protéine EthR (analyte injecté en flux continu) et le promoteur du gène *ethA* (partenaire immobilisé sur la surface).

Nous avons utilisé deux cellules pour le test : une cellule de mesure où est accroché l'ADN dit relevant, c'est-à-dire correspondant au promoteur du gène *ethA* et une cellule de contrôle où se trouve un brin d'ADN non relevant de même longueur, permettant de soustraire les interactions protéine/ADN non spécifiques. Dans un premier temps, la protéine EthR est injectée seule, jusqu'à saturation, ce qui permet de mesurer un signal SI_{EthR} correspondant à la quantité de protéine EthR venue se lier à l'ADN (Figure 69). Dans un second temps, l'expérience est réitérée en présence d'un ligand potentiel à différentes concentrations. Si le composé se lie à EthR, l'empêchant ainsi de venir se fixer sur l'ADN, une diminution de la réponse du signal ($SI_{EthR+Lig}$) dose-dépendante est observée.

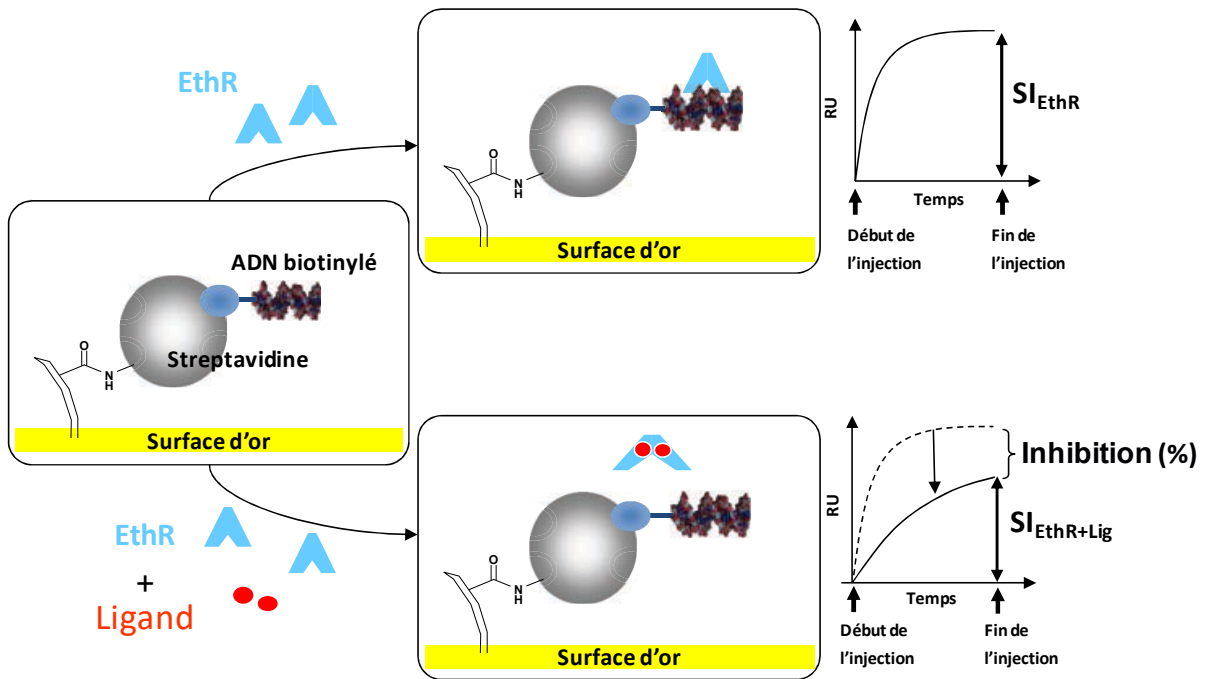


Figure 69 : Principe du test d'inhibition de l'interaction EthR/ADN par résonance plasmonique de surface.

En utilisant l'équation ci-dessous, on peut calculer pour chaque concentration un pourcentage d'inhibition du ligand étudié.

$$\%Inhibition = 100 \times \frac{SI_{EthR} - SI_{EthR+Lig}}{SI_{EthR}}$$

En représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ligand (Figure 70), nous en déduisons une valeur d'IC₅₀.

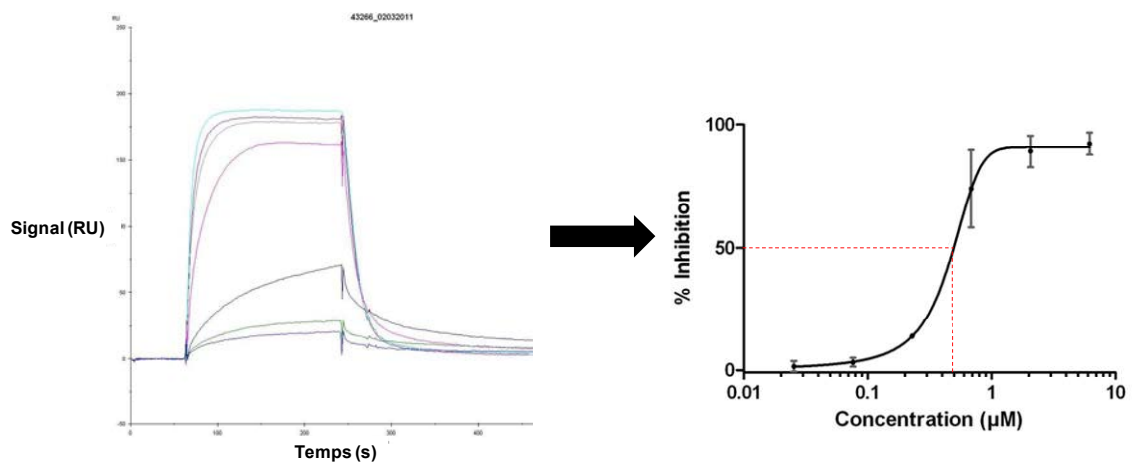


Figure 70 : Signaux obtenus pour différentes concentration de ligand (à gauche) et courbe dose réponse qui en découle (à droite).

I.2.3 Le test cellulaire de potentialisation de l'éthionamide

Le test précédent valide la capacité des composés à inhiber l'interaction EthR/ADN en se liant à la protéine EthR. Le troisième test utilisé permet de vérifier que ces composés sont capables de potentialiser l'activité bactéricide de l'éthionamide sur *M. tuberculosis* seul ou sur des macrophages infectés par *M. tuberculosis*. Ce test est un test de « High Content Screening » (HCS) ou criblage à contenu dense. Les tests HCS sont réalisés sur des cultures cellulaires qui permettent d'étudier certains caractères phénotypiques d'un microorganisme (bactérie par exemple) dans un environnement donné. Les changements phénotypiques observés peuvent aller de l'augmentation (ou la diminution) de la production de certaines protéines marquées à la modification de la morphologie du microorganisme étudié. Le terme HCS signifie que plusieurs paramètres peuvent être suivis simultanément.²²⁹

Dans notre cas, le test repose sur la technique de microscopie confocale à fluorescence. Ce test a pour but de déterminer la concentration en ligand nécessaire pour potentialiser dix fois l'activité de l'éthionamide (ETH). Dans l'organisme, nous avons vu qu'une partie de la charge bactérienne se développe au sein des macrophages. Ces bacilles intracellulaires sont souvent plus difficiles à détruire, d'où l'intérêt d'observer l'effet de nos composés sur des macrophages infectés par *M. tuberculosis*.

Dans ce test, des macrophages Raw267.4 sont infectés par *M. tuberculosis* H37Rv exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein). Deux paramètres sont alors mesurés :

- Le pourcentage de macrophages infectés. Un composé actif, en inhibant le développement de *M. tuberculosis*, va diminuer le nombre de macrophages infectés (Figure 71). Cette mesure permet de déterminer l'activité des composés.
- Le nombre total de macrophages. Cette mesure permet d'éliminer d'éventuels « faux-positifs », bactéricides par effet cytotoxique.

²²⁹ P. Brodin, *et al.*, *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, 15 (4), 534-539.

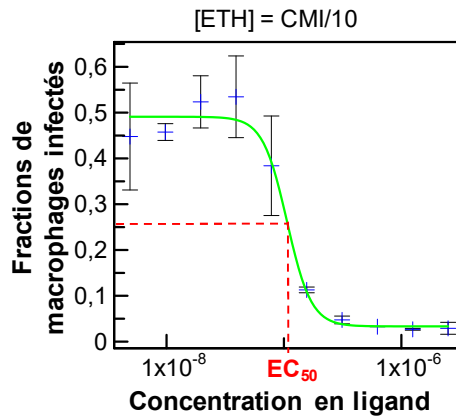


Figure 71 : Exemple de courbe obtenue pour le test intracellulaire avec un composé actif. La courbe représente le pourcentage de macrophages infectés en fonction de la concentration en ligand.

Pour mesurer la concentration de ligand nécessaire pour potentialiser dix fois l'activité de l'ETH, on se place à une concentration constante en éthionamide ($0,1 \mu\text{g/mL}$ ce qui correspond au $1/10^{\text{ème}}$ de sa CMI_{99}). En faisant varier la concentration en ligand on peut déterminer la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la pousse bactérienne, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour potentialiser dix fois l'activité de l'éthionamide. Cette concentration sera notée EC_{50} .

Ce test peut également être réalisé directement sur *M.tuberculosis* en absence de macrophages.

1.3 Evaluation du composé 1

Le composé **1** a été évalué sur les trois tests qui viennent d'être présentés (Tableau 6). Il a montré une IC_{50} de $160\mu\text{M}$ dans le test d'inhibition de l'interaction entre la protéine EthR et son opéron. Il s'est révélé peu actif sur les tests d'affinité à la protéine ($\Delta T_m=0.1^\circ\text{C}$) et de potentialisation de l'éthionamide ($EC_{50}>20\mu\text{M}$).

Composé	ΔT_m ($^\circ\text{C}$)	IC_{50} (μM)	EC_{50} (μM)	Solubilité (μM)
1	0.1	160	> 20	> 200

Tableau 6 : Activités et solubilité du composé 1.

Afin de déterminer le mode de liaison du composé **1** à la protéine, des essais de co-cristallisation ont été menés.

1.4 Etude du mode de liaison du composé 1

Le composé **1** a pu être co-cristallisé avec EthR et l'analyse des cristaux par diffraction aux rayons-X a révélé une structure de la protéine EthR sous forme dimérique, avec un espacement de $49,6\text{ \AA}$ entre les domaines HTH de chaque monomère (Figure 72). Cet état de la protéine n'est pas compatible avec une fixation aux grands sillons d'ADN comme nous l'avons vu précédemment.

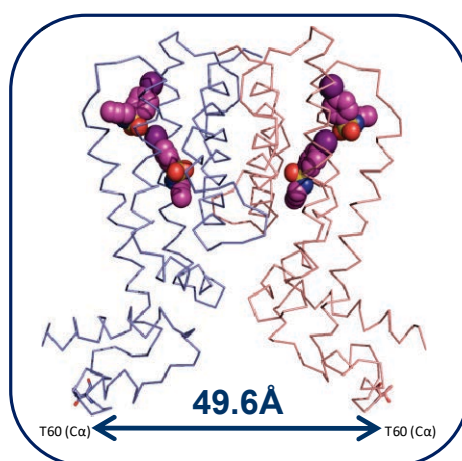


Figure 72 : Représentation de la structure de la protéine EthR co-cristallisée avec le composé 1.

Nous sommes donc en présence d'une molécule se fixant dans le domaine de régulation de la protéine et inhibant ainsi la liaison à son opérateur, comme nous l'avons montré grâce au test de RPS. Le mode d'action est donc identique à celui rencontré avec les composés de la série Lead1.¹⁸⁸

Cependant, à l'inverse des inhibiteurs développés jusqu'à présent, l'analyse du mode de liaison du composé **1** à la protéine (Figure 73) révèle la présence de deux molécules au sein du domaine de régulation de chaque monomère. Ce domaine de fixation du composé **1** présente une forme de Y avec trois poches D1, D2 et D2' bien distinctes (Figure 73).

La poche D1 est le site de fixation de tous les inhibiteurs d'EthR décrits jusqu'alors. Cette poche hydrophobe est un tunnel constitué de haut en bas par les résidus Trp207, Thr149, Ile107, Leu87, Phe110, Trp145, Met142, Leu183, Phe114 et fermé à son extrémité par deux autres résidus hydrophobes, le Trp138, et la Phe184 flexible et permettant l'accès à une nouvelle cavité (Figure 74).¹⁸⁹

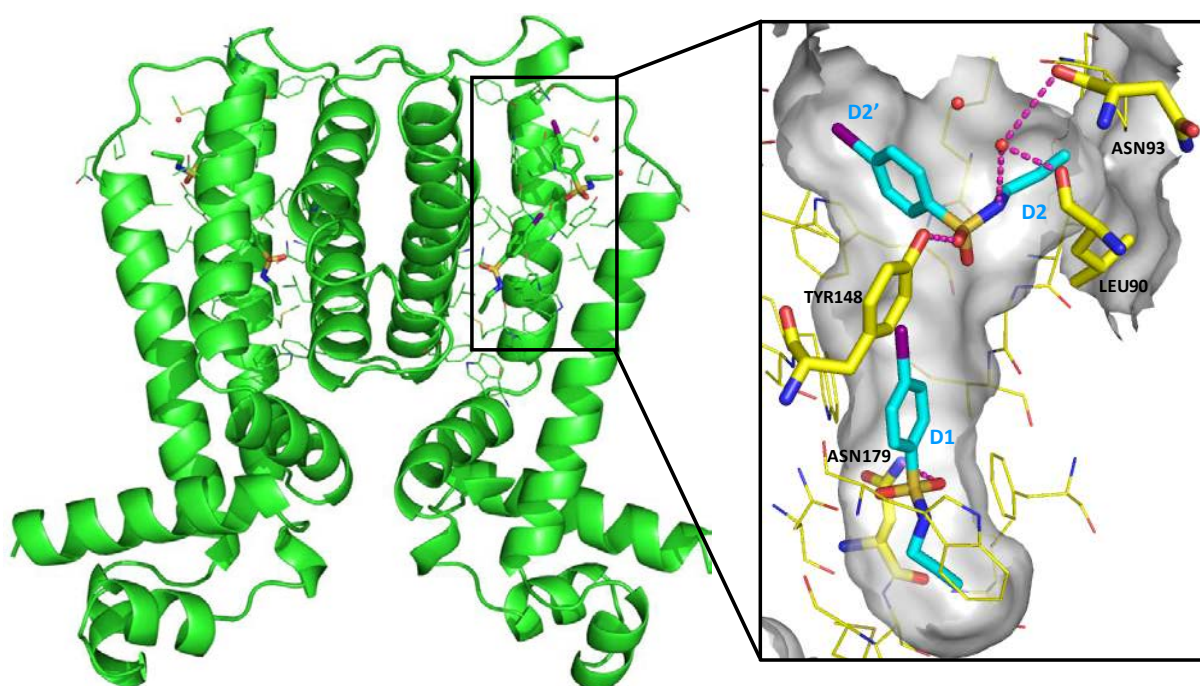


Figure 73 : Occupation du domaine de régulation par le composé **1**.

Un premier fragment se lie au sein de cette poche D1 et interagit par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène entre un des atomes d'oxygène de la fonction sulfonamide et la chaîne latérale de l'Asparagine 179 (Figure 73). Le cycle aromatique est quant à lui intercalé entre les résidus Trp207 et Phe110 (Figure 74, A).

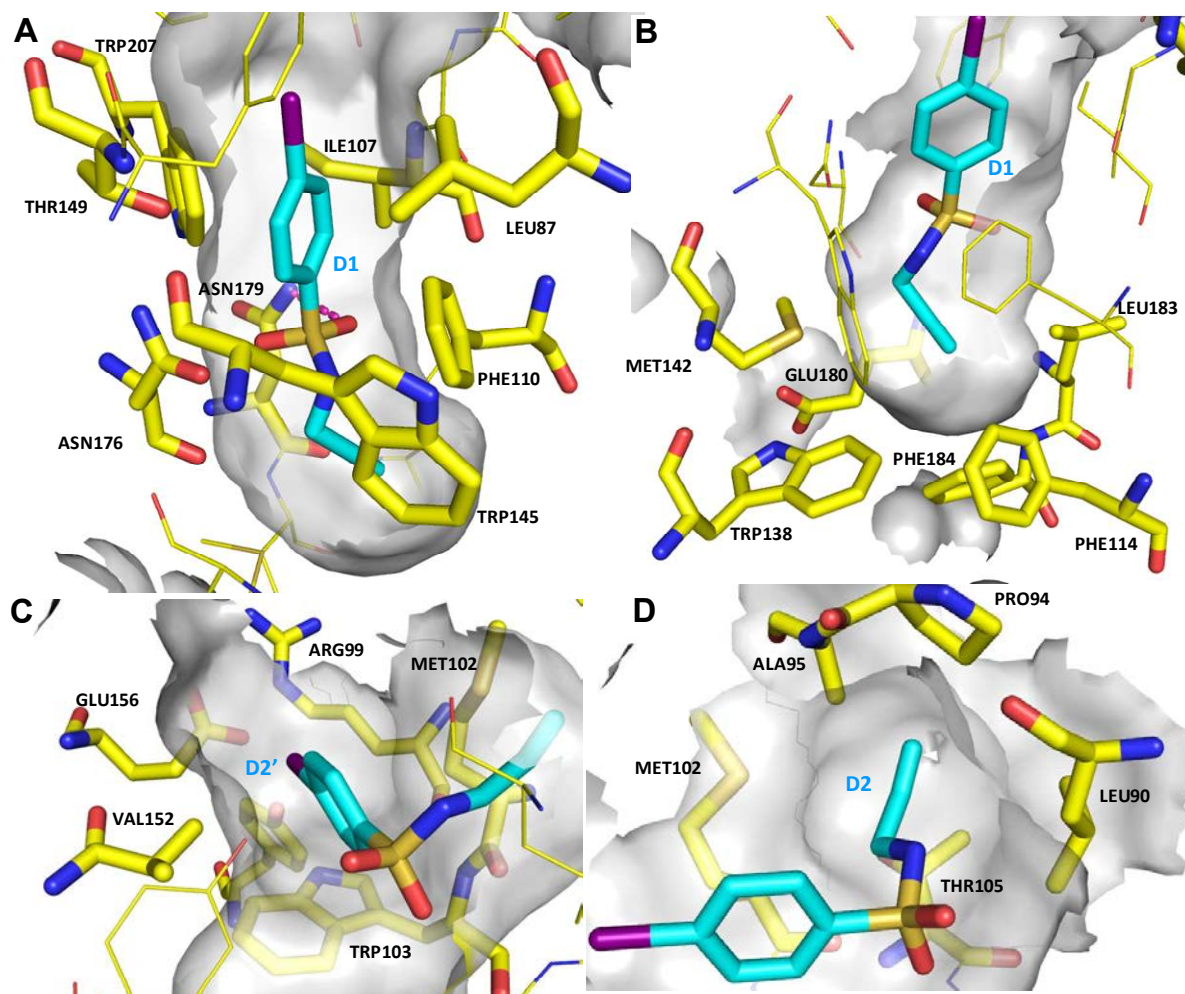


Figure 74 : Mode de liaison du composé 1 à la protéine EthR obtenu par co-cristallisation. Structure des domaines de liaison D1 (A et B), D2 (D) et D2' (C).

La poche D2 est formée par les résidus Met102, Ala95, Pro94, Leu90 et Thr 105 (Figure 74, D) et accueille la chaîne acétylénique du second fragment. La poche D2' est formée par trois résidus hydrophobes : Met102, Trp103 et Val152 et fermée par deux résidus polaires : Arg99 et Glu156. Elle accueille la partie iodophényle du second fragment (Figure 74, C). La fonction sulfonamide du fragment sépare les deux poches D2 et D2' et interagit par une liaison hydrogène à la fois avec la chaîne latérale de la Tyr148 mais également *via* une molécule d'eau avec les résidus Leu90 et Asn93 (Figure 73).

L'obtention d'une structure cristallographique nous a permis de vérifier que malgré une très faible activité dans les conditions du test TSA, le composé 1 est bien un ligand de la protéine EthR. La présence de deux molécules liées au domaine de régulation nous a permis d'envisager plusieurs stratégies pour l'optimisation du composé 1 en composé lead.

II Les stratégies d'optimisation envisagées

A partir de ce fragment de départ, nous avons mis en place trois stratégies d'optimisation couramment utilisées lors d'une approche par fragment. Tout d'abord, une stratégie de « fragment growing » a été développée, utilisant uniquement le fragment ayant un mode de liaison proche de la famille Lead1. Cette stratégie a été initiée par la conception puis le criblage *in silico* d'une chimiothèque virtuelle afin d'identifier un hit plus puissant. Par la suite ce composé hit a été optimisé de manière rationnelle par une succession de petites modifications chimiques appuyées par l'obtention de structures cristallographiques.

Par la suite, deux stratégies de « fragment merging » et « fragment linking » ont été mises en place afin d'utiliser le mode de liaison original du second fragment.

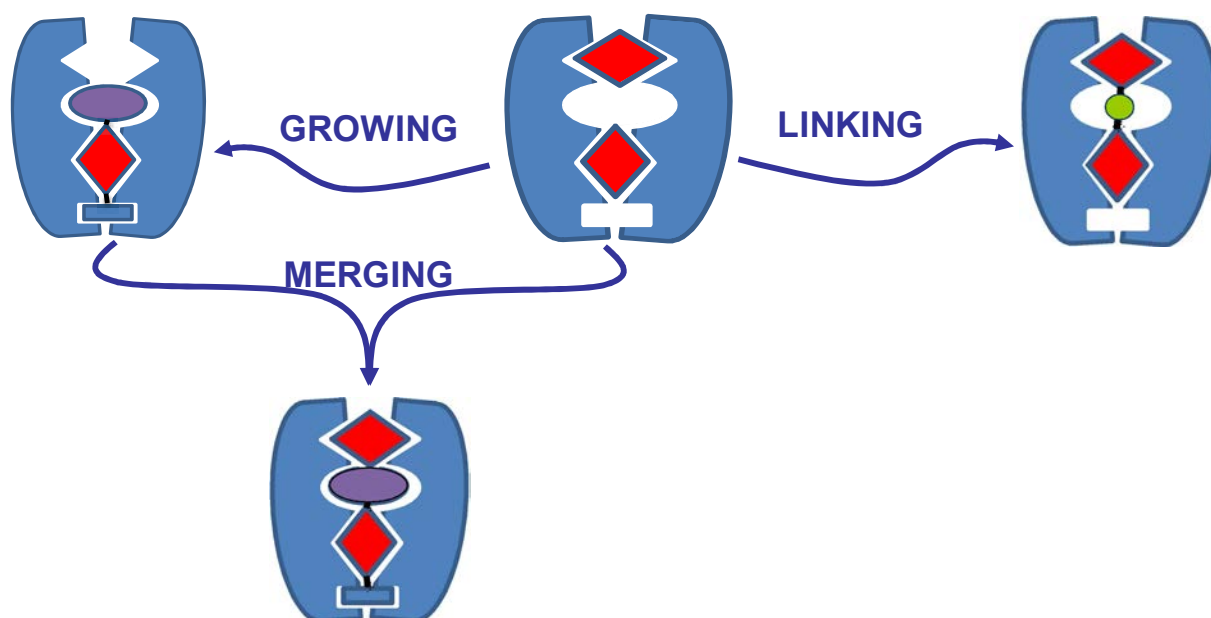


Figure 75 : Stratégies de « fragment growing », « fragment merging » et « fragment linking » utilisées pour l'optimisation du fragment 1.

La stratégie de fragment growing est présentée dans le chapitre 4. Les stratégies de fragment linking et fragment merging sont présentées dans le chapitre 5.

III Bibliographie

228. Podjarny, A.; Dejaegere, A.; Kieffer, B., *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets : Detection, Measurement and Modelling*. RSC Publishing: 2011.
229. Brodin, P.; Christophe, T., High-content screening in infectious diseases. *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15* (4), 534-539.

Chapitre 4. Stratégie de « fragment growing »

I Mise en place de la Stratégie «fragment growing »

I.1 Conception de la chimiothèque virtuelle

Nous avons vu précédemment (p.121) que la stratégie de « fragment growing » repose sur un fragment unique lié au domaine de liaison, et sur la connaissance de son mode de liaison. Dans notre cas, nous avons sélectionné comme point de départ pour cette stratégie le fragment se liant au sein de la poche D1 (Figure 73). Sur la base du motif aryl-sulfonamide de ce fragment, une chimiothèque virtuelle de 976 composés a été conçue (Figure 76). Ce motif aryl-sulfonamide effectue une liaison hydrogène avec l'Asn179, ce qui en fait un point d'ancrage spécifique. Le domaine de liaison D1 étant linéaire, la diversité chimique a été introduite dans deux directions opposées. La nature de la chaîne sulfonamide a été modifiée grâce à l'introduction de petites amines aliphatiques, et la position 4 du cycle phényle a été substituée avec des groupements plus volumineux et hydrophobes, mais possédant néanmoins des groupements accepteurs de liaison hydrogène pouvant interagir avec la chaîne latérale de la Tyr148, par analogie avec le mode de liaison du second fragment.

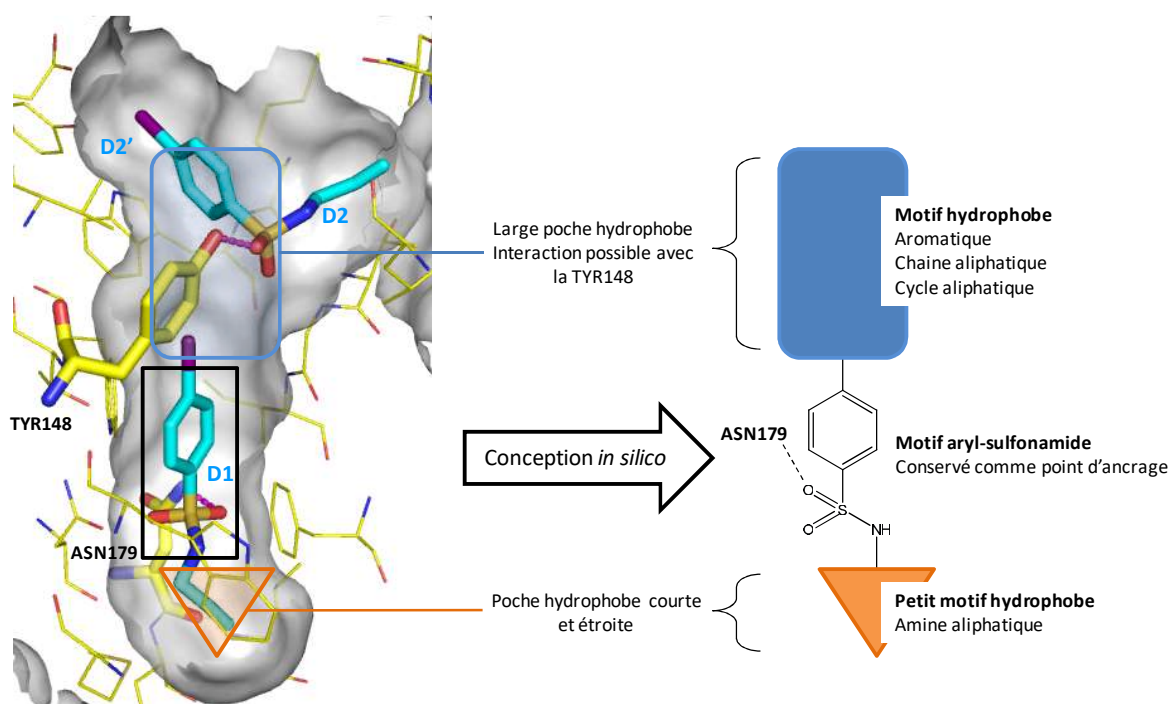


Figure 76 : Conception de la chimiothèque virtuelle basée sur la nature du domaine de régulation et sur le mode de liaison du fragment 1.

La chimiothèque virtuelle a été synthétisée *in silico* en utilisant le logiciel Pipeline Pilot, en couplant 16 amines commerciales ($MW < 100 \text{ g.mol}^{-1}$) avec 61 chlorures d'acide arylsulfoniques

substitués en position 4, également commerciaux (Figure 77). Ces amines et chlorures d'acide arylsulfoniques sont présentés dans la partie expérimentale, p365.

Cette chimiothèque a ensuite été criblée *in silico* au sein du domaine de régulation de la protéine EthR afin d'identifier les différentes conformations possibles des ligands et les interactions favorables avec les acides aminés de la poche de liaison.

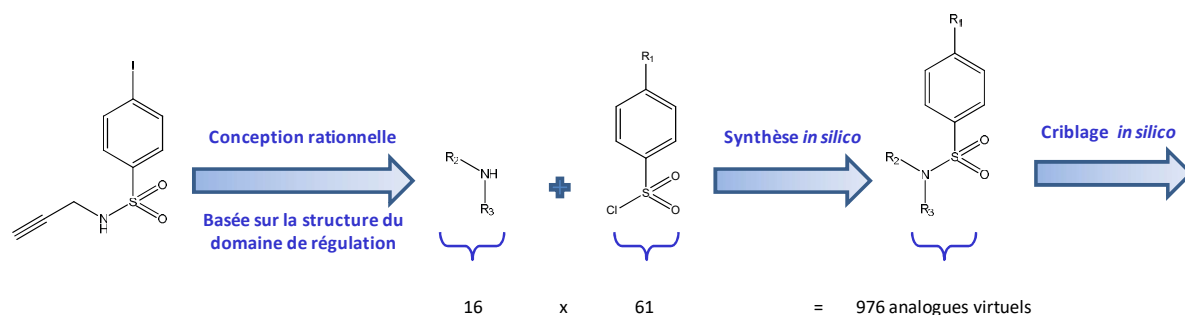


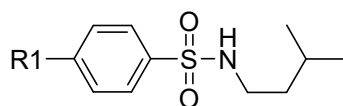
Figure 77 : Structure de la chimiothèque virtuelle.

Ce criblage a été effectué sur deux structures cristallographiques de la protéine EthR : la co-structure obtenue avec le composé **1** et la co-structure obtenue avec le composé BDM31369, issu de la famille Lead1 (Ref PDB : 3Q0V). La structure de la protéine EthR obtenue avec le composé **1** offre une meilleure occupation du haut de la poche de liaison grâce à la seconde molécule liée au sein des domaines D2 et D2'. La structure obtenue avec le composé BDM31369 correspond elle, à une occupation plus efficace du bas de la poche de liaison (Domaine D1).

En utilisant le logiciel Surflex 2.415, les 976 molécules de la chimiothèque virtuelle ont donc été criblées sur les deux conformations de la protéine EthR. Les résultats de ce criblage sont présentés dans la partie I.2 ci-dessous.

I.2 Résultats du criblage et confirmation des hits

Pour classer les composés à l'issue de ce criblage, un pK_i moyen a été calculé et seuls les 75 composés possédant un pK_i supérieur à 8 pour chacune des deux structures ont été conservés. Sur la base de ce classement et après avoir inspecté le mode de liaison de chacun des composés (en recherchant notamment les composés capables de se lier à l'asparagine 179), dix d'entre eux (environ 1% de la chimiothèque globale) ont été sélectionnés. Ces dix molécules (composés **3** à **12**, Tableau 7) résultent toutes du couplage entre différents chlorures d'acide sulfonique et l'isopentylamine. Les analyses de docking suggèrent que cette chaîne isopentyle remplit idéalement le bas de la poche D1 (Figure 76), ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec les autres familles d'inhibiteurs décrites.



Composé	R1	pK _i	Classement	Composé	R1	pK _i	Classement
1	-	5.4		7		8.6	56/75
2	I →	7.7		8		8.5	14/75
3		9.3	18/75	9		9.3	8/75
4		9.4	26/75	10		10.0	3/75
5		8.7	15/75	11		8.1	63/75
6		9.3	20/75	12		8.9	11/75

Tableau 7 : Structures et activités *in silico* des molécules issues du criblage virtuel.

Les dix hits issus du criblage *in silico* ainsi que le composé **2**, qui est l'analogue direct de **1** avec une chaîne isopentyle à la place de la chaîne propargyle (Tableau 7), ont été synthétisés et évalués à la fois sur le test TSA et sur le test de potentialisation de l'éthionamide. Les différents hits ont été comparés sur la base des activités obtenues et du coefficient d'efficacité LE (p.114) calculé selon l'équation suivante :

$$LE = \frac{-RT \times \ln(EC_{50})}{HA} \approx \frac{1.4 \times pEC_{50}}{HA}$$

Figure 78 : Formule utilisée pour le calcul du LE.

Les valeurs de ΔT_m obtenues pour les onze composés sont reportées Figure 79.

L'impact positif du remplacement de la propargylamine (composé **1**) par l'isopentylamine (composé **2**) est observé grâce au test TSA avec une augmentation de 1.8°C par rapport au composé **1** (Figure 79).

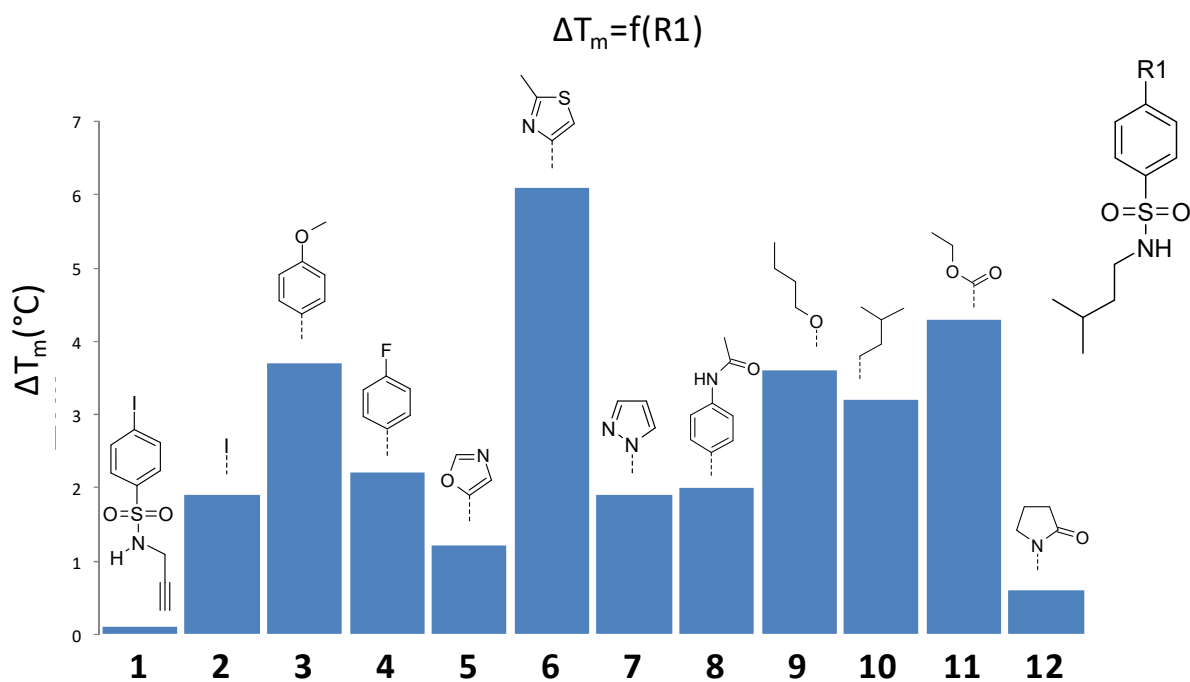


Figure 79 : Résultats des composés 1 à 12 obtenus lors du test TSA.

Sur les dix composés issus du criblage *in silico*, le composé **6** s'est révélé être le ligand le plus affiné pour la protéine ($\Delta T_m = +6.1^\circ\text{C}$). Le remplacement de l'atome d'iode (composé **2**) par un groupement 2-méthylthiazol-4-yle permet ainsi d'augmenter le ΔT_m de 4.2°C . Des augmentations plus faibles mais significatives ont également été observées pour les composés **3** ($+1.8^\circ\text{C}$), **9** ($+1.7^\circ\text{C}$), **10** ($+1.3^\circ\text{C}$) et **11** ($+2.4^\circ\text{C}$). Tous les autres produits issus du criblage *in silico* se sont révélés plus actifs que le fragment de départ, mais identiques ou moins actifs que le composé **2**, référence permettant d'évaluer l'impact des différents groupements R1. On observe notamment que le remplacement du groupement méthoxy en position para du cycle phényle (composé **3**) par un atome de fluor (composé **4**) ou un groupement acétamide (composé **8**) entraîne une diminution du ΔT_m de 1.5 et 1.7°C respectivement.

Seuls les composés **6**, **10** et **11** ont montré une activité sur le test de potentialisation de l'éthionamide avec des EC_{50} de $5.7\mu\text{M}$ ($LE=0.35$), $6.3\mu\text{M}$ ($LE=0.36$) et $10\mu\text{M}$ ($LE=0.35$) respectivement. Les trois composés présentant des activités et des efficacités similaires, c'est le composé **6** qui a été retenu pour la suite des étapes d'optimisation. En effet, l'introduction de diversité et la synthèse d'analogues est plus aisée que pour le composé **10**. De plus, le cycle thiazole est probablement plus stable en milieu biologique que l'ester porté par le composé **11** qui peut être substrat des estérases.

1.3 Etude du composé 6

Le composé **6** a par la suite été co-cristallisé avec la protéine EthR afin de vérifier son mode de liaison, qui a été comparé au mode de liaison obtenu lors de l'étude de docking. Comme prédit par l'analyse de docking, le groupement sulfonamide interagit avec la chaîne latérale de l'asparagine 179 par liaison hydrogène (Figure 80). Néanmoins, la modélisation moléculaire prévoit que les plans des deux cycles aromatiques soient décalés d'un angle de 60° environ. Or dans la structure obtenue par co-cristallisation les cycles phényle et thiazole sont parfaitement coplanaires. Cela induit également une différence dans le mode de positionnement de la chaîne isopentyle dans le bas du domaine de liaison D1.

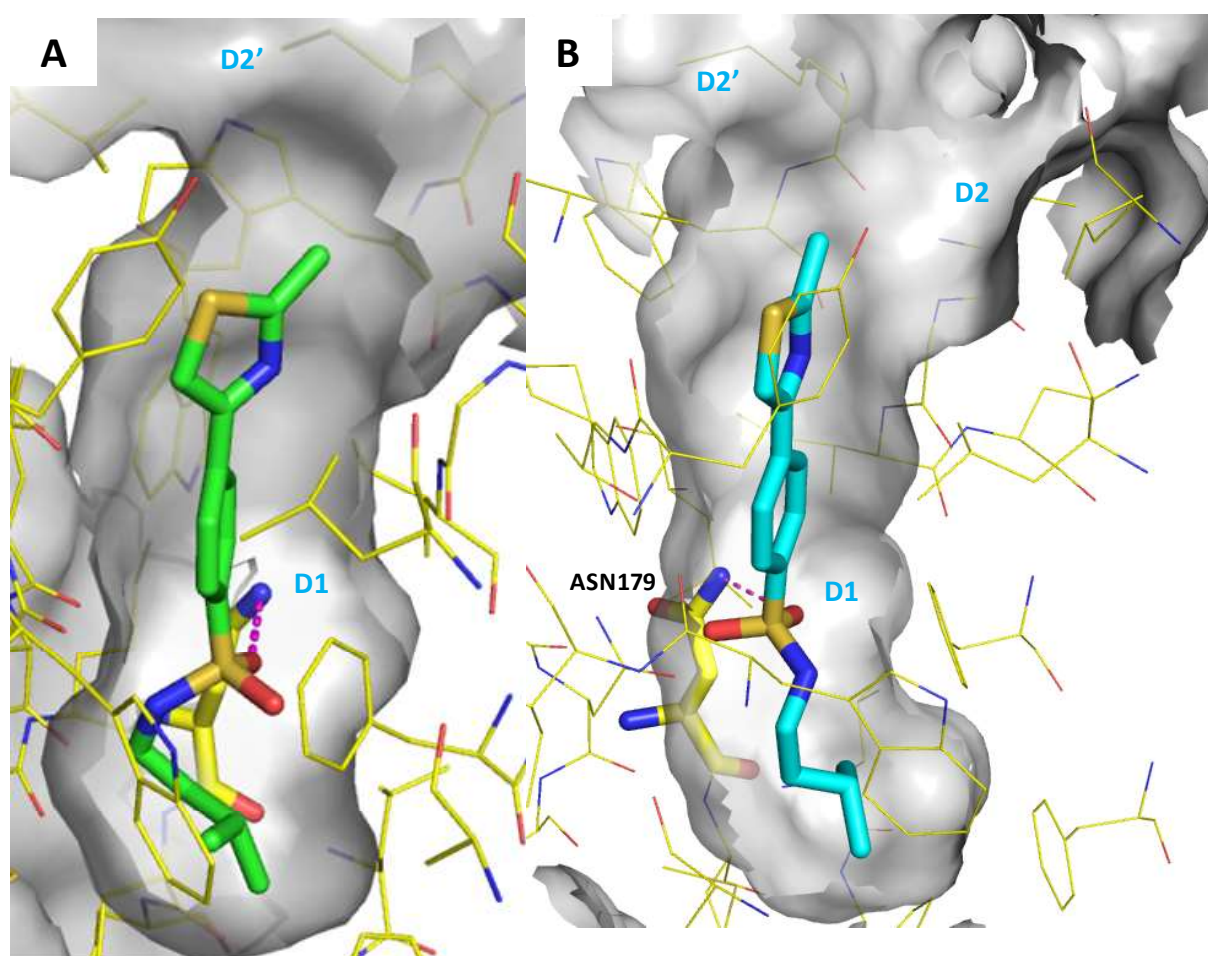


Figure 80 : Comparaison du mode de liaison du composé **6** obtenu par modélisation moléculaire (A) ou par co-cristallisation avec la protéine (résolution 2.0Å) (B).

Le cycle phényle du composé **6** est encadré par la Phe 110 et le Trp 207 (Figure 81, B) et le cycle thiazole est entouré de plusieurs résidus hydrophobes (Trp104, Tyr148 et Leu87) (Figure 81, A). Le substituant méthyle pointe vers la méthionine 102 qui occupe la poche D2' en l'absence d'une

seconde molécule de ligand. On observe également que la chaîne isopentyle remplit mieux le bas de la poche D1 que la chaîne propargyle du fragment initial.

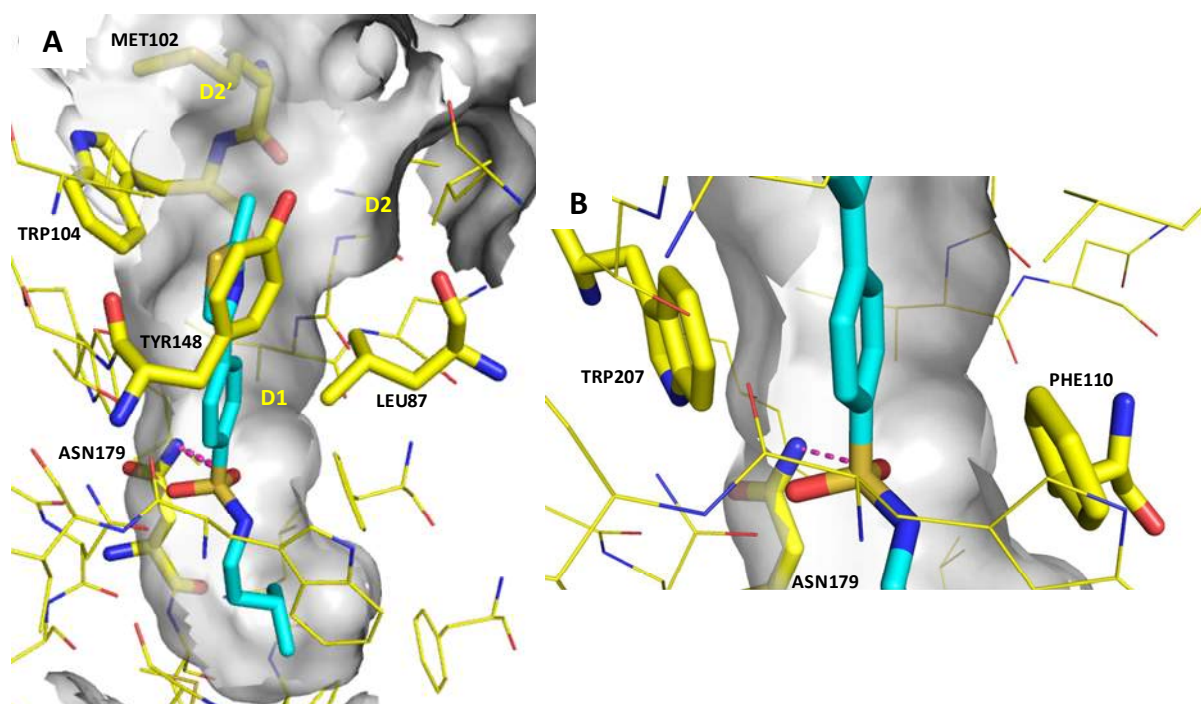


Figure 81 : Etude du mode de liaison du composé 6 à la protéine EthR, obtenu par co-cristallisation.

Le composé 6 ayant été sélectionné comme nouveau composé de référence, il a été évalué en résonance plasmonique de surface où une valeur d'IC₅₀ de 4.9µM a été mesurée (Tableau 8), ce qui représente une amélioration d'un facteur 32 par rapport au fragment initial (IC₅₀=160µM).

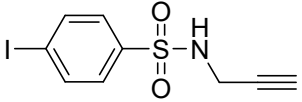
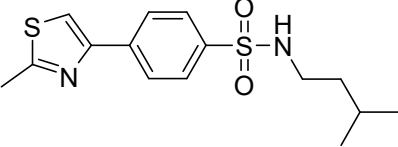
Composé	Structure	EC ₅₀ (µM)	HA	LE	IC ₅₀ (µM)	Solubilité (µM)	LogD
1		>20	14	-	160	>200	2.26
6		5.7	21	0.35	4.9±0.1	20	3.55

Tableau 8 : Caractéristiques des composés 1 et 6.

L'ajout d'un hétérocycle aromatique entraîne une augmentation du logD, mais l'on conserve néanmoins une solubilité acceptable égale à 20µM.

I.4 Stratégie d'optimisation du composé 6

Tout au long du processus d'optimisation du composé **6** (Figure 82), la contrainte fixée a été de limiter l'augmentation de la taille des molécules ainsi que leur lipophilie afin de conserver de bonnes propriétés physicochimiques et de maximiser les chances de traverser les membranes de la mycobactérie pour atteindre la cible. Cela a été suivi grâce aux coefficients LE et LLE_{AT} présentés précédemment.

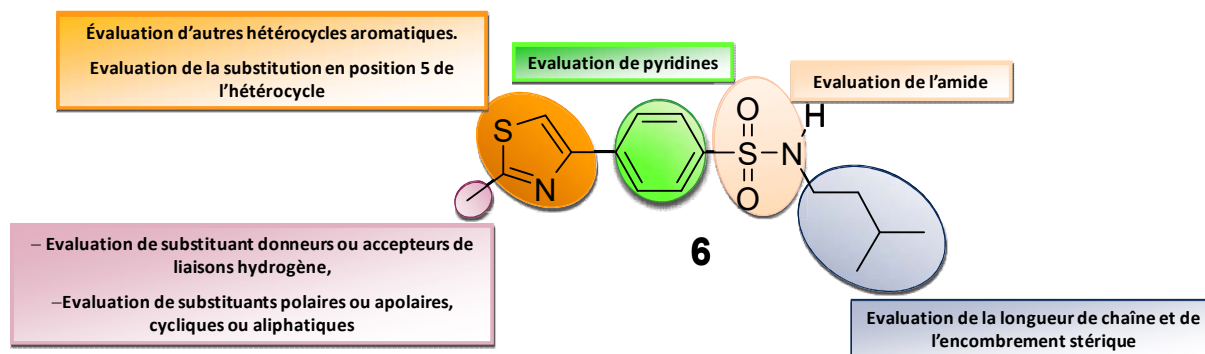


Figure 82 : Modifications envisagées lors de l'optimisation du composé 6.

Des modifications à tous les niveaux de la molécule de référence ont été envisagées au cours du processus d'optimisation. Au niveau du substituant en position 2 du cycle thiazole, des groupements relativement volumineux ont été introduits afin de générer de nouvelles interactions et d'occuper l'espace disponible dans la partie haute du domaine de régulation. A l'inverse, au niveau de la chaîne sulfonamide, du cycle phényle et du cycle thiazole, des petites modifications chimiques n'engendrant qu'une légère variation de la masse moléculaire ont été réalisées. Le cycle thiazole a été remplacé par d'autres hétérocycles aromatiques à 5 sommets et le cycle phényle a été remplacé par une pyridine. Au niveau de la chaîne alkyle, la longueur de chaîne ainsi que l'encombrement stérique ont été évalués. Enfin, la fonction sulfonamide a été remplacée par une fonction amide.

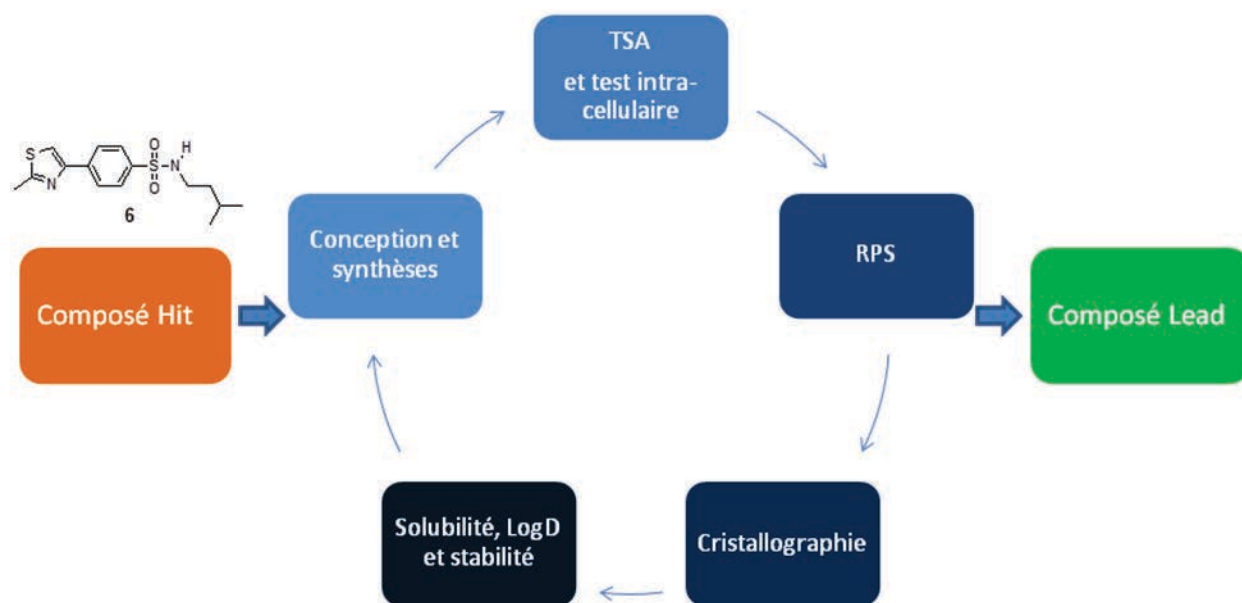


Figure 83 : Processus itératif d'optimisation des composés.

Lors de chaque phase d'optimisation, les composés synthétisés ont été évalués sur le test d'affinité à la protéine (TSA) et sur le test de potentialisation de l'éthionamide *in vitro* (Figure 83). Le mode d'action des meilleurs composés a par la suite été confirmé par résonance plasmonique de surface et le mode de liaison à la protéine a été établi par cristallographie. Les paramètres physico-chimiques (LogD, solubilité) et pharmacocinétiques (stabilités microsomaux et plasmatiques) des composés sélectionnés ont été évalués.

Nous avons alors établi le profil de l'inhibiteur idéal recherché en fonction de ces différents paramètres (Tableau 9). Ce profil a été réalisé en s'inspirant des valeurs du composé BDM41906, chef de file de la famille Lead1.

En termes d'activités, le composé attendu doit présenter un $\Delta T_m > 8^\circ\text{C}$, une $IC_{50} < 0.5\mu\text{M}$, une $EC_{50} < 0.1\mu\text{M}$ et un coefficient d'efficacité $LE > 0.4$.

Concernant les propriétés physico-chimiques, une masse moléculaire limite de $400\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a été fixée. Le logD ne doit pas être supérieur à 3 et la solubilité doit être d'au moins $10\mu\text{M}$.

Enfin, le composé cible doit respecter les règles de Veber et Lipinski, mais également posséder un temps de demi-vie plasmatique (souris femelle) supérieur à 24h et un temps de demi-vie microsomale (souris femelle) supérieur à 30min.

Activités	Composé 6	Profil	BDM41906
ΔT_m (°C)	6.1	> 8	8.3
IC ₅₀ (μM)	4.9	< 0.5	0.40
EC ₅₀ (μM)	5.7	< 0.1	0.06
LE	0.35	> 0.4	0.40
Paramètres physico-chimiques			
MW	324.47	< 400	374.10
HA	21	-	25
LogD	3.55	< 3	n.t.
Solubilité (μM)	20	> 10	1 100
Paramètres ADME			
t _{1/2} microsomes (min)	-	> 30	81
Clint (μL/min/mg)	-	< 50	15
t _{1/2} plasma (h)	-	> 24	n.t.
Lipinski	4/4	4/4	4/4
Veber	2/2	2/2	2/2

Tableau 9 : Profil du composé lead désiré.

Le composé **6** respecte les règles de Lipinski et Veber et valide les critères de solubilité et de poids moléculaire mais il est nécessaire d'augmenter à la fois son activité et son coefficient d'efficacité LE.

Pour cela, différentes phases d'optimisation du composé **6** ont été réalisées et seront présentées dans la suite de ce chapitre.

II Première Phase d'optimisation

II.1 Modification du substituant en position 2 du cycle thiazole

II.1.1 Stratégie

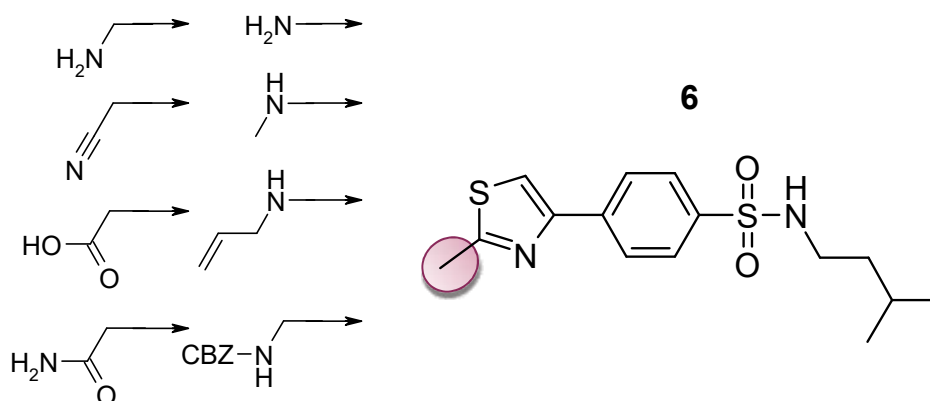


Figure 84 : Modifications de la position 2 du cycle thiazole : analogues du composé 6.

Le composé 6 se lie à la protéine au niveau du domaine de liaison D1 (Figure 80), le groupement méthyle se positionnant à l'entrée des poches D2 et D2' (Figure 80). Nous avons donc dans un premier temps souhaité évaluer l'impact du remplacement de ce groupement méthyle par des substituants polaires accepteurs (nitrile, amines) et donneurs de liaisons hydrogène (amines, acide carboxylique, carboxamide) pouvant potentiellement interagir avec la Tyr148 notamment. La stratégie de synthèse est identique pour tous ces composés et est présentée en Figure 85.

II.1.2 Synthèses

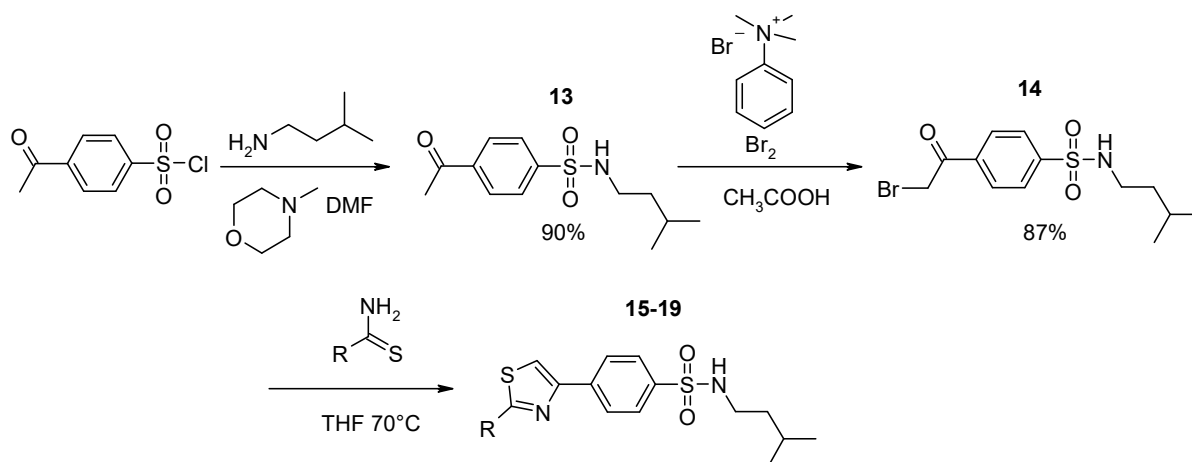


Figure 85: Schéma de synthèse des composés 15 à 19.

La première étape consiste à former le sulfonamide **13** en couplant l'isopentylamine, groupement de référence du composé **6**, au chlorure d'acide 4-acétylbenzenesulfonique en présence de N-méthylmorpholine dans le DMF. Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 90%.

Le groupement acétyle est ensuite bromé en position alpha de la fonction carbonyle, en milieu acide par l'action du tribromure de triméthylphénylammonium dans l'acide acétique à température ambiante.²³⁰ Le rendement de la synthèse de l'alpha-bromocétone **14** est de 87%.

Le cycle thiazole est ensuite formé par une réaction de Hantzsch en condensant l'alpha-bromocétone avec différents thioamides au reflux du THF.²³¹ Les différents rendements obtenus pour les produits **15** à **19** sont présentés dans le Tableau 10. Le mécanisme de formation du cycle thiazole par la synthèse de Hantzsch est présenté en Figure 86.

²³⁰ S. Michiharu, *et al.*, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2000**, 37 (2), 269-274.

²³¹ D. Dunn, *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17 (2), 542-545.

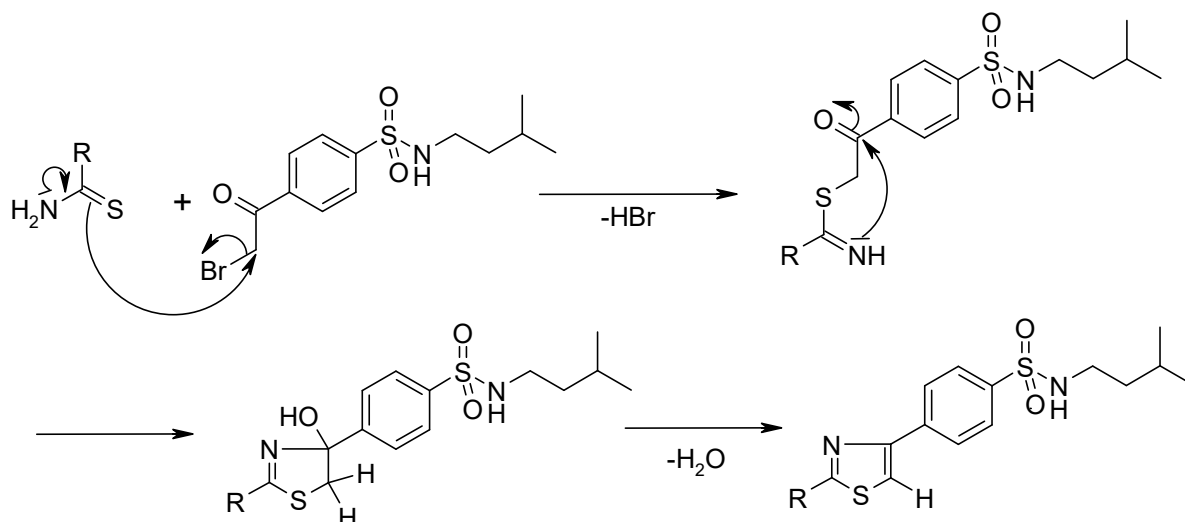


Figure 86: Mécanisme de formation du thiazole selon la synthèse de Hantzsch.

Les thioamides (ou thiourées) sont des réactifs nucléophiles qui réagissent par leur atome de soufre dont la nucléophilie est accrue par l'effet mésomère donneur de l'atome d'azote ou des atomes d'azotes dans le cas des dérivés de la thiourée (produits **16**, **18** et **19**).

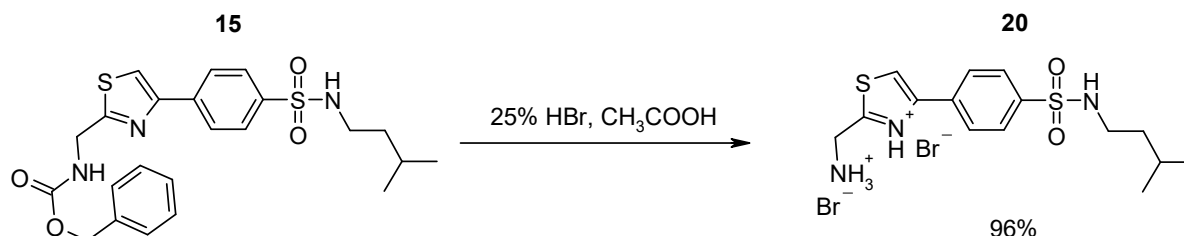
La première étape consiste en une substitution de l'atome de brome par l'atome de soufre. Ensuite, l'atome d'azote s'additionne sur l'autre site électrophile de l'alpha-bromocétone, le groupement carbonyle. Cette réaction intramoléculaire conduisant à la formation d'un cycle à cinq chaînons est favorisée. Enfin, les conditions de réaction (milieu acide, chauffage) favorisent l'élimination d'une molécule d'eau qui permet l'aromatisation.

Composé	Thioamide	Structure	Rendement
15			51%
16			61%
17			47%
18			63%
19			60%

Tableau 10 : Rendements de l'étape de cyclisation pour les composés 15 à 19.

Les composés **15** à **19** sont obtenus après purification avec des rendements allant de 47 à 63%.

Le composé **15** a servi de précurseur à la synthèse du composé **20** par déprotection du groupement CBZ. Cette déprotection a été effectuée dans une solution d'HBr à 25% dans l'acide acétique²³² (Figure 87). Le sel de di-bromhydrate précipite par ajout d'éther diéthylique à la solution d'acide acétique, le composé est alors récupéré par filtration avec un rendement de 96%.



²³² N. Irako, et al., *Tetrahedron* **1995**, 51 (46), 12731-12744.

Figure 87 : Schéma de synthèse du composé 20.

Le composé **17** a quant à lui servi de précurseur à la synthèse du dérivé carboxamide **21** et de l'acide carboxylique **22**. Le carboxamide **21** a été obtenu avec un rendement de 61% par réaction avec de l'acide sulfurique.²³³ L'acide carboxylique **22** à lui été synthétisé avec un rendement de 58% en présence de soude diluée à reflux (Figure 88).²³⁴

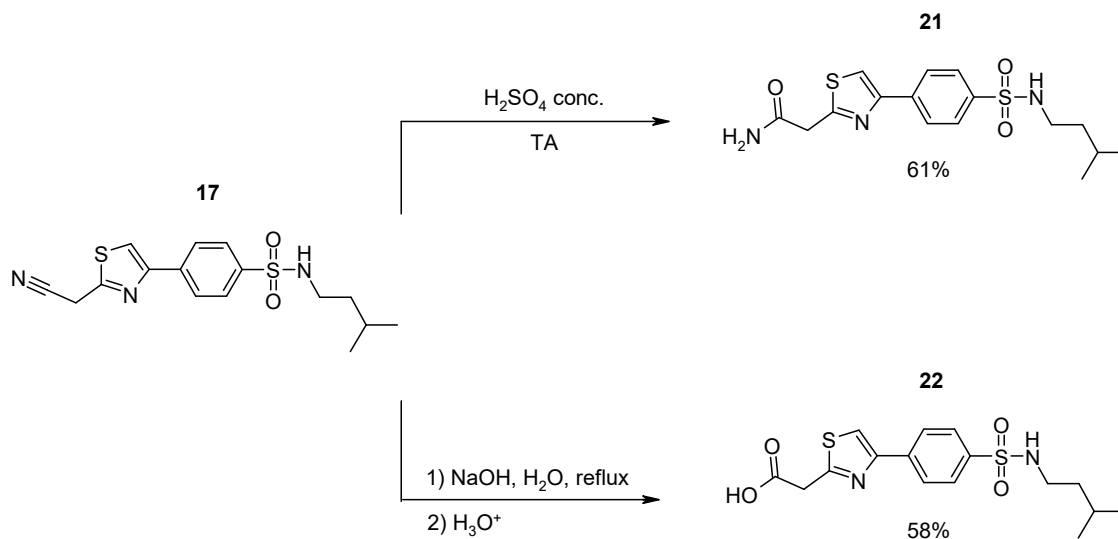


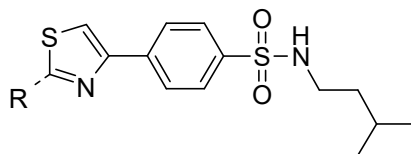
Figure 88 : Schéma de synthèse des composés 21 et 22.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 11.

²³³ C. A. Bernhart, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, 36 (22), 3371-3380.

²³⁴ L. A. Smyth, *et al.*, *Tetrahedron* **2007**, 63 (39), 9627-9634.

II.1.3 Résultats et discussion



Composé	R	ΔT_m (°C)	EC_{50} (μM)	HA	LE
6, Réf	$H_3C \rightarrow$	6.1	5.7	21	0.35
15		5.0	>20	32	-
20	$H_2N \rightarrow$	2.0	>20	22	-
16	$H_2N \rightarrow$	1.8	>20	21	-
17		5.3	7.9	23	0.31
18		5.2	>20	24	-
19		4.2	>20	22	-
21		4.6	5.0	24	0.31
22		3.4	>10	24	-

Tableau 11 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 15 à 22. LE = $1.4 * pEC_{50}/HA$.

L'introduction, en position 2 du cycle thiazole, de groupements chargés à pH physiologique (**20**, $\Delta T_m=2.0^\circ C$, $EC_{50}>20\mu M$ et **22**, $\Delta T_m=3.4^\circ C$, $EC_{50}>10\mu M$) entraîne une chute importante de l'affinité pour la protéine et de l'activité sur le test de potentialisation de l'éthionamide par rapport au composé de référence (**6**, $\Delta T_m=6.1^\circ C$, $EC_{50}=5.7\mu M$). La polarité joue également un rôle très important dans l'activité des produits. En effet, les anilines substituées **19** ($\Delta T_m=4.2^\circ C$, $EC_{50}>20\mu M$) et **18** ($\Delta T_m=5.2^\circ C$, $EC_{50}>20\mu M$) possèdent une meilleure affinité pour la protéine que l'aniline **16** ($\Delta T_m=1.8^\circ C$, $EC_{50}>20\mu M$). Néanmoins ces trois composés ne montrent aucune activité intracellulaire.

Les composés **15** ($\Delta T_m=5.0^\circ\text{C}$, $EC_{50}>20\mu\text{M}$) et **17** ($\Delta T_m=5.3^\circ\text{C}$, $EC_{50}=7.9\mu\text{M}$) possèdent des affinités similaires et légèrement inférieures au composé de référence. Cependant, le composé **15**, possédant un nombre d'atomes lourds beaucoup plus important ($HA=32$), s'avère inactif sur le test de potentialisation de l'éthionamide. A l'inverse, le nitrile **17** possède une activité du même ordre de grandeur que le composé **6** sur le test de potentialisation de l'éthionamide. Il est cependant moins efficace ($LE=0.31$ contre 0.35). Cela conforte notre hypothèse qui consiste à nous orienter vers des composés de faible poids moléculaire afin d'augmenter la capacité des produits à traverser la paroi épaisse de la bactérie.

Enfin, le composé **21** ($EC_{50}=5.0\mu\text{M}$, $\Delta T_m=4.6^\circ\text{C}$) possédant une fonction carboxamide s'est montré aussi actif que le composé de référence **6** ($EC_{50}=5.7\mu\text{M}$, $\Delta T_m = 6.1^\circ\text{C}$) en test intracellulaire bien qu'étant moins actif sur le test TSA. Ce composé est également moins efficace ($LE=0.31$) que le composé **6** du fait de l'augmentation du nombre d'atomes lourds ($HA= 24$ contre 21).

Ainsi, les différents produits synthétisés n'ont pas permis une amélioration significative de l'activité. Nous pouvons donc supposer que ces différents analogues n'ont pas réussi à créer de nouvelles interactions favorables avec les résidus des poches D2 ou D2' ou avec la Tyr148, comme nous le recherchions.

II.2 Modification de la nature de la chaîne sulfonamide

II.2.1 Stratégie

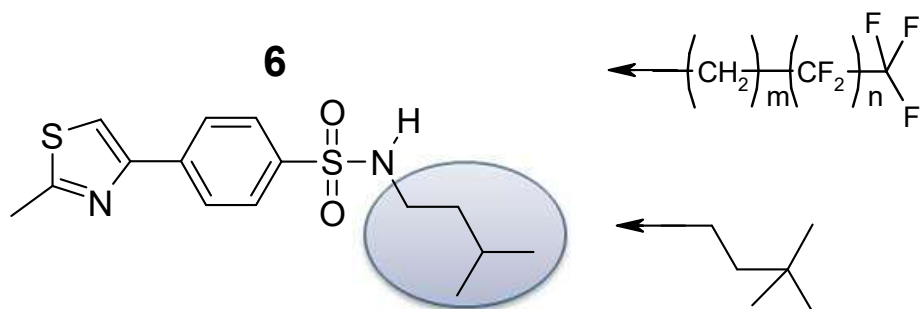


Figure 89 : Modifications de la chaîne sulfonamide : analogues du composé 6.

Le composé 6 se fixe au sein de la poche D1, la chaîne sulfonamide occupant l'extrémité du tunnel, composée des résidus Trp145, Phe110, Leu183, Met142, Phe114, Phe184, Glu180 et Trp138 (Figure 90). Afin d'optimiser les interactions avec cette région hydrophobe du domaine de liaison, plusieurs paramètres structuraux ont été modifiés.

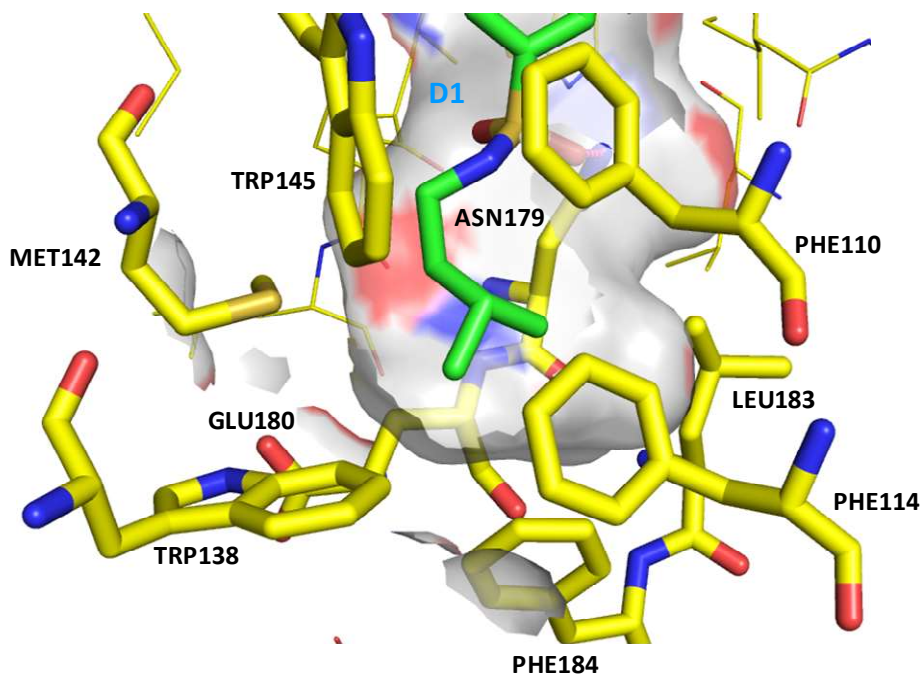


Figure 90 : Occupation du domaine D1 par la chaîne sulfonamide du composé 6.

Les résidus mentionnés précédemment forment un tunnel étroit, nous avons donc voulu tout d'abord évaluer l'impact de l'encombrement stérique, soit en remplaçant le groupement isopropyle par un tert-butyle (**23**, Tableau 12), soit en remplaçant les groupements méthyle par des atomes de fluor (**24**, **25**, Tableau 12). En effet, le groupement trifluorométhyle (CF₃) a souvent été décrit comme légèrement plus volumineux qu'un groupement isopropyle²³⁵ et représente donc une alternative intéressante lors de la synthèse d'analogues. De plus nous avons observé lors des travaux sur la famille Lead1 que l'introduction d'atomes de fluor permettait l'augmentation de la pénétration cellulaire, qui est un paramètre important pour l'activité de nos composés.^{187,236} Enfin, l'introduction d'atomes de fluor peut également s'avérer être bénéfique pour l'amélioration des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques.²³⁷

La longueur de la chaîne carbonée a également été modulée (Composé **26**, Tableau 12).

II.2.2 Première modification de la chaîne sulfonamide.

II.2.2.1 Synthèses

La synthèse des analogues **23** à **26** a été réalisée à partir du chlorure d'acide 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-benzènesulfonique, commercialement disponible. L'obtention des molécules cibles a été réalisée en une seule étape par réaction avec les amines correspondantes, dans le DMF en présence de N-méthylmorpholine (Figure 91).

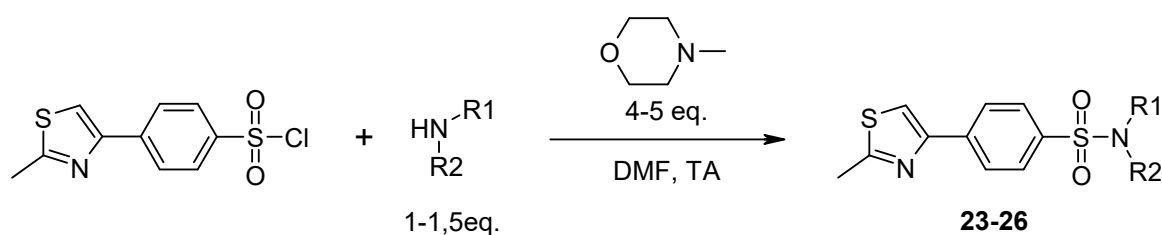


Figure 91: Schéma de synthèse des composés **23** à **26**.

²³⁵ W. K. Hagmann, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51 (15), 4359-4369.

²³⁶ J. M. Domagala, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**, 29 (3), 394-404.

²³⁷ K. Müller, *et al.*, *Science* **2007**, 317 (5846), 1881-1886.

Les rendements pour l'obtention des composés **23** à **26** varient entre 29 et 44% et sont présentés dans le Tableau 12. Au cours de ces réactions, l'impureté majoritairement présente dans le milieu réactionnel est l'acide sulfonique. Un lavage aqueux permet alors d'obtenir le produit final avec une pureté supérieure à 98%.

Composés	Structure	Rendement
23		37%
24		39%
25		29%
26		44%

Tableau 12 : Rendement obtenus pour la synthèse des composés **23** à **26**.

Les faibles rendements obtenus pour ces différents produits s'expliquent par la qualité du chlorure d'acide sulfonique de départ avant utilisation (produit largement hydrolysé). Ceci a été vérifié par la mesure du point de fusion (> 210°C au lieu de 111-115°C).

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 13.

II.2.2.2 Résultats et discussion

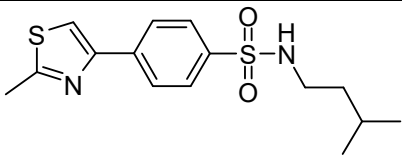
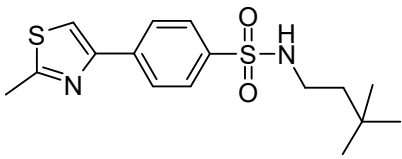
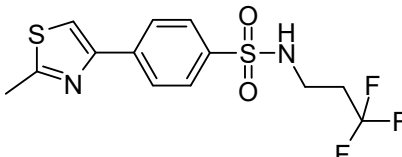
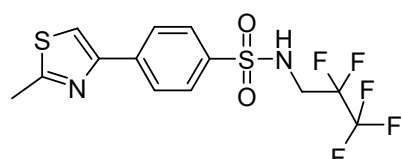
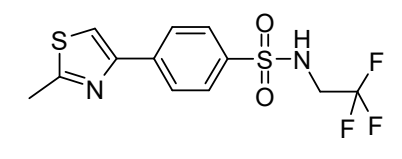
Composé	Structure	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)	HA	LE
6, Réf		6.1	5.7	21	0.35
23		2.3	>20	22	-
24		8.5	0.29	22	0.42
25		8.6	>20	24	-
26		6.3	7.9	21	0.34

Tableau 13 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 23 à 26. LE = 1.4*pEC₅₀/HA.

Les résultats obtenus pour les différents composés confirment l'importance de l'encombrement stérique à ce niveau du domaine de liaison. En effet, le remplacement de la chaîne isopentyle portée par le composé **6** de référence ($\Delta T_m=6.1^\circ\text{C}$, $EC_{50}=5.7\mu\text{M}$) par une chaîne trifluoropropyle plus volumineuse (composé **24**, $\Delta T_m=8.5^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.29\mu\text{M}$) a permis d'augmenter à la fois l'affinité pour la protéine ($\Delta(\Delta T_m) = +2.4^\circ\text{C}$) ainsi que l'activité intracellulaire (amélioration de l' EC_{50} d'un facteur 20). Malgré la présence d'un atome lourd supplémentaire (HA = 22), le composé **24** possède une meilleure efficacité (LE=0.42 contre 0.35) que le composé **6**. En revanche, l'introduction d'une chaîne *neo*-héxyle (composé **23**, $\Delta T_m=2.3^\circ\text{C}$, $EC_{50}>20\mu\text{M}$) encore plus volumineuse entraîne une perte d'activité. Cela est très certainement dû à une gêne stérique au niveau du bas du domaine de liaison D1. Ainsi, on peut supposer que la cavité formée par les résidus Phe114, Phe184, Trp138, Leu183, Glu180 et Met142 (Figure 90) n'est pas assez volumineuse pour accueillir le groupement *tert*-butyle.

La longueur de chaîne influe également sur l'activité, en effet le composé **24** est plus affiné et plus actif que son homologue inférieur **26** ($\Delta T_m=6.3^\circ\text{C}$, $EC_{50}=7.9\mu\text{M}$).

L'ajout d'atomes de fluor supplémentaires sur la chaîne sulfonamide (**25**, $\Delta T_m=8.6$, $EC_{50} > 20\mu\text{M}$) ne change pas l'affinité du composé pour la protéine mais entraîne en revanche une perte d'activité sur le test de potentialisation de l'éthionamide.

II.2.3 Seconde modification de la chaîne sulfonamide.

II.2.3.1 Synthèses

Nous venons de voir que l'introduction de la chaîne trifluoropropyle permet d'augmenter fortement l'activité des produits et que la longueur de la chaîne joue également un rôle important pour l'activité. Nous avons donc envisagé l'évaluation de nouvelles chaînes sulfonamides trifluorométhylées.

Des chaînes trifluorométhylées plus longues (**27**), contraintes (**29**) et polyfluorées (**28**) ont été synthétisées avec des rendements compris entre 43 et 61%, selon la voie de synthèse décrite précédemment (Figure 91, p.164). L'utilisation d'un nouveau lot de chlorure d'acide 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-benzènesulfonique a permis d'augmenter de manière significative les rendements de formation des différents sulfonamides.

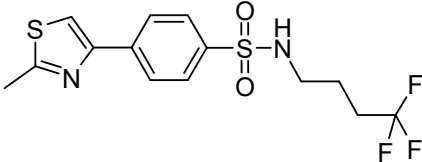
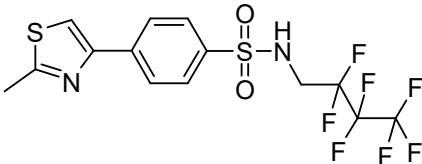
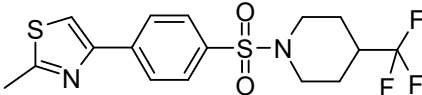
Composé	Structure	Rdt
27		53%
28		43%
29		61%

Tableau 14 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés **27** à **29**.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 15.

II.2.3.2 Résultats et discussion

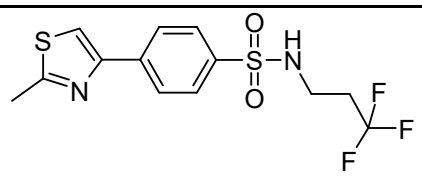
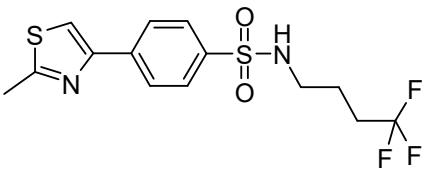
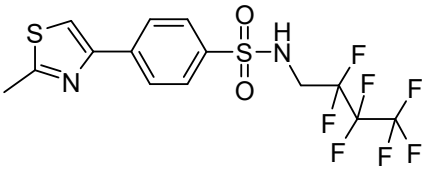
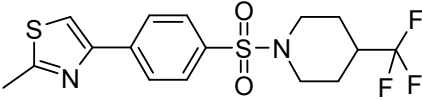
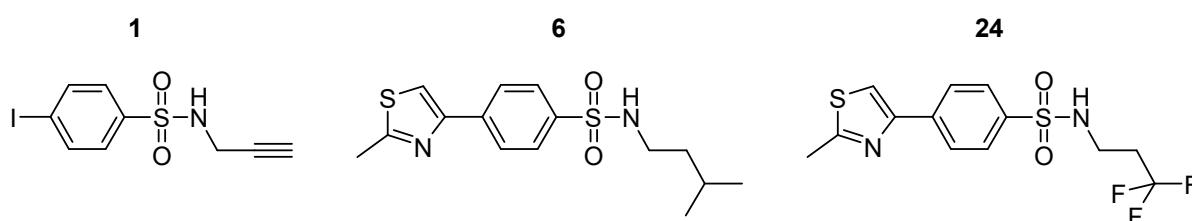
Composé	Structure	ΔT_m (°C)	EC_{50} (μM)	HA	LE
24, Réf		8.5	0.29	22	0.42
27		6.6	>2.5	23	-
28		7.3	>2.5	27	-
29		2.3	>2.5	25	-

Tableau 15 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 27 à 29, LE = 1.4*pEC₅₀/HA.

L'allongement de la chaîne sulfonamide d'un chaînon méthylénique supplémentaire (**27**, $\Delta T_m=6.6^\circ C$, $EC_{50}>2.5\mu M$) par rapport au composé de référence **24** ($\Delta T_m=8.5^\circ C$, $EC_{50}=0.29\mu M$) conduit à une diminution de l'activité. Cette chaîne à quatre atomes de carbone est probablement trop longue pour venir se loger en bas du domaine D1 (Figure 90, p.163) tout en conservant la capacité de la fonction sulfonamide à former une liaison hydrogène avec l'asparagine 179. L'introduction d'une chaîne polyfluorée (**28**, $\Delta T_m=7.3^\circ C$, $EC_{50}>2.5\mu M$) augmente l'affinité à la protéine, mais n'améliore pas l'activité intracellulaire, comme observé précédemment (composé **25**, Tableau 13). L'analogue cyclique du composé **27** possédant un cycle pipéridine (**29**, $\Delta T_m=2.3^\circ C$, $EC_{50}>2.5\mu M$) montre une perte d'affinité pour la protéine et d'activité intracellulaire. Ceci peut être expliqué encore une fois par la nature très étroite de la poche de liaison qui accueille cette chaîne sulfonamide (Figure 90, p.163).

II.2.4 Conclusion

Les modifications effectuées au niveau de la chaîne sulfonamide ont permis la découverte du composé **24**. La chaîne trifluoropropyle semble parfaitement optimisée pour l'occupation du bas du domaine de liaison D1, en termes de longueur de chaîne et d'encombrement stérique. Afin de vérifier le mode d'action de cette nouvelle molécule de référence, le composé **24** a été évalué en RPS et a également été co-cristallisé avec la protéine EthR. Enfin, ses propriétés physicochimiques ont également été mesurées (Tableau 16).



Composé	ΔT_m (°C)	EC_{50} (μM)	HA	LE	IC_{50} (μM)	Solubilité (μM)	LogD	LLE_{AT}
1	0.1	>20	-	-	160	>200	2.26	-
6	6.1	5.7	21	0.35	4.9 ± 0.1	20	3.55	0.21
24	8.5	0.29	22	0.42	0.55 ± 0.02	41.4	3.12	0.30

Tableau 16 : Comparaison du composé **24** avec les précédents composés de référence.

En terme d'activité, l'introduction de la chaîne trifluoropropyle (composé **24**, $IC_{50}=0.55\mu M$) a permis de diminuer l' IC_{50} d'un facteur 9 par rapport au composé **6** ($IC_{50}=4.9\mu M$). L' EC_{50} sur le test intracellulaire a été améliorée d'un facteur 20. Cette différence permet d'appuyer l'hypothèse selon laquelle l'introduction d'atomes de fluor en bout de chaîne permet d'améliorer le passage membranaire.

L'introduction du groupement trifluorométhyle a également permis l'amélioration des propriétés physico-chimiques, en effet le LogD a diminué de 0.4 unités logarithmiques (de 3.55 à 3.12) et la solubilité a été augmentée d'un facteur 2 (de $20\mu M$ à $41.4\mu M$). Cette diminution de logD couplée à l'augmentation de l'activité et de l'efficacité entraîne une amélioration du coefficient LLE_{AT} (0.30 pour le composé **24** contre 0.21 pour le composé **6**). Cette valeur de 0.30, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 (p.114), est souvent considérée comme valeur minimale acceptable.

La structure de la protéine EthR co-cristallisée avec le ligand **24** (Figure 92) confirme un mode de liaison pour ce composé identique à ceux observés pour les molécules précédentes. En effet, les cycles thiazole et phényle du composé **24** occupent la même position au sein du domaine D1 que ceux du composé **6**. L'un des atomes d'oxygène de la fonction sulfonamide forme également une liaison

hydrogène avec la chaîne latérale de l'asparagine 179. On remarque également que la méthionine 102 vient occuper la poche D2' comme dans la structure obtenue avec le composé **6**.

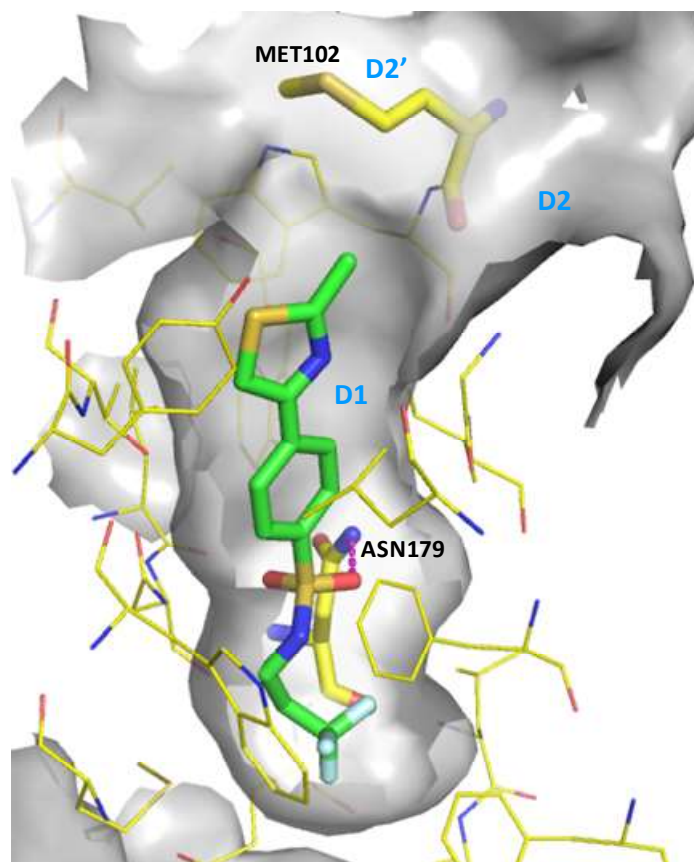


Figure 92 : Mode de liaison du composé 24 à la protéine EthR obtenu par co-cristallisation (résolution 2.3Å).

On observe que le groupement trifluorométhyle se positionne de manière idéale dans le bas du domaine D1. L'occupation de la poche est meilleure que dans le cas du composé **6** avec sa chaîne isopentyle (Figure 93). On comprend ici bien pourquoi les composés possédant des chaînes plus encombrées ou plus longues se sont montrés inactifs. En effet, la chaîne trifluoropropyle occupe déjà la totalité de la cavité hydrophobe.

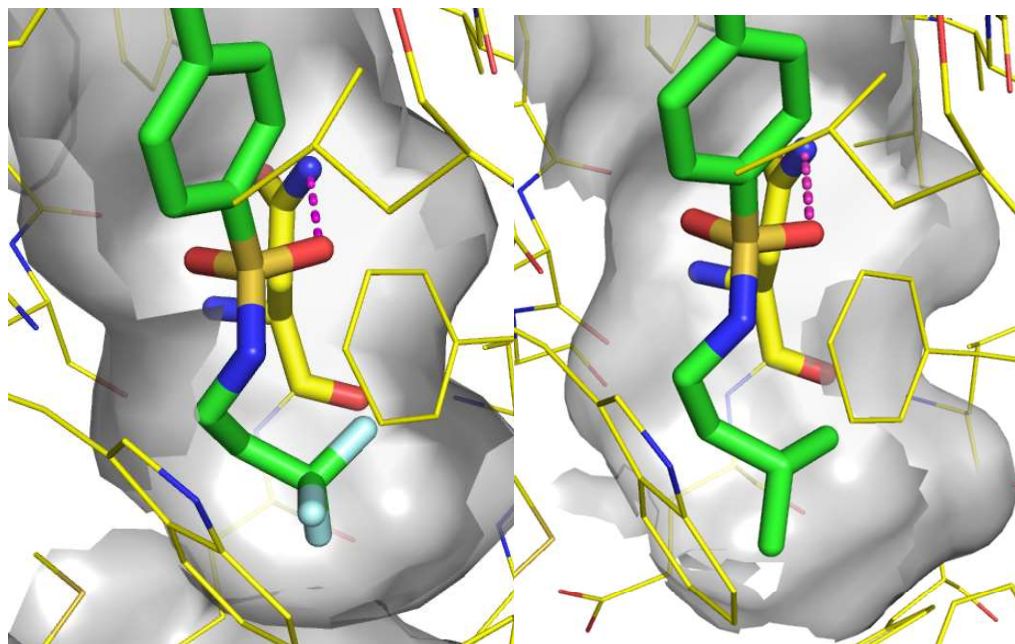


Figure 93 : Comparaison du mode de liaison des chaînes sulfonamide des composés 24 (à gauche) et 6 (à droite).

II.3 Modification du thiazole et du substituant en position 2

II.3.1 Stratégie

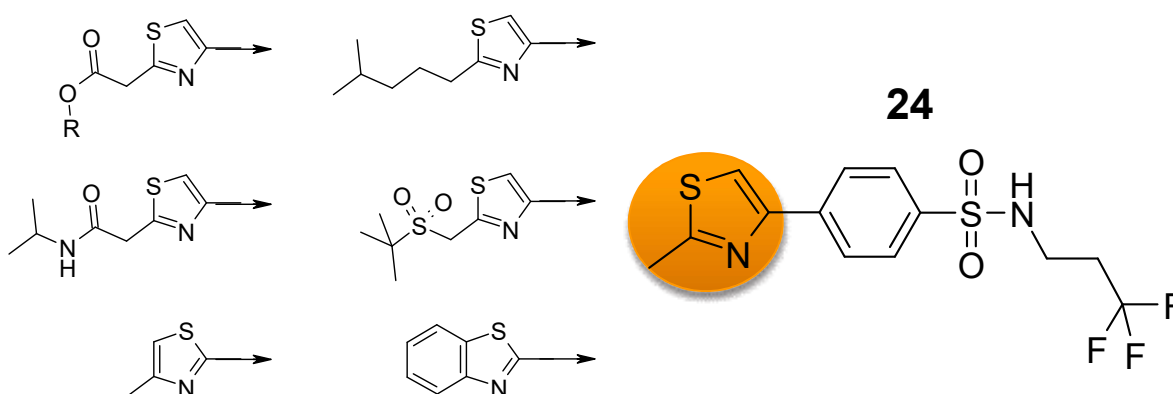


Figure 94 : Modification du cycle thiazole et du substituant en position 2 : analogues du composé 24.

Les structures cristallographiques de la protéine EthR obtenues avec les composés 6 et 24 révèlent que le groupement méthyle en position 2 du cycle thiazole pointe en direction des poches hydrophobes D2 et D2' (Figure 95). Nous avons donc cherché de nouveau à venir occuper ces poches en utilisant cette fois des groupements plus hydrophobes que précédemment, mais pouvant néanmoins

interagir avec la Tyr148, en synthétisant des amides, des esters ou des sulfones. La position de l'atome de soufre au sein de l'hétérocycle a également été modifiée afin d'évaluer son impact sur l'activité.

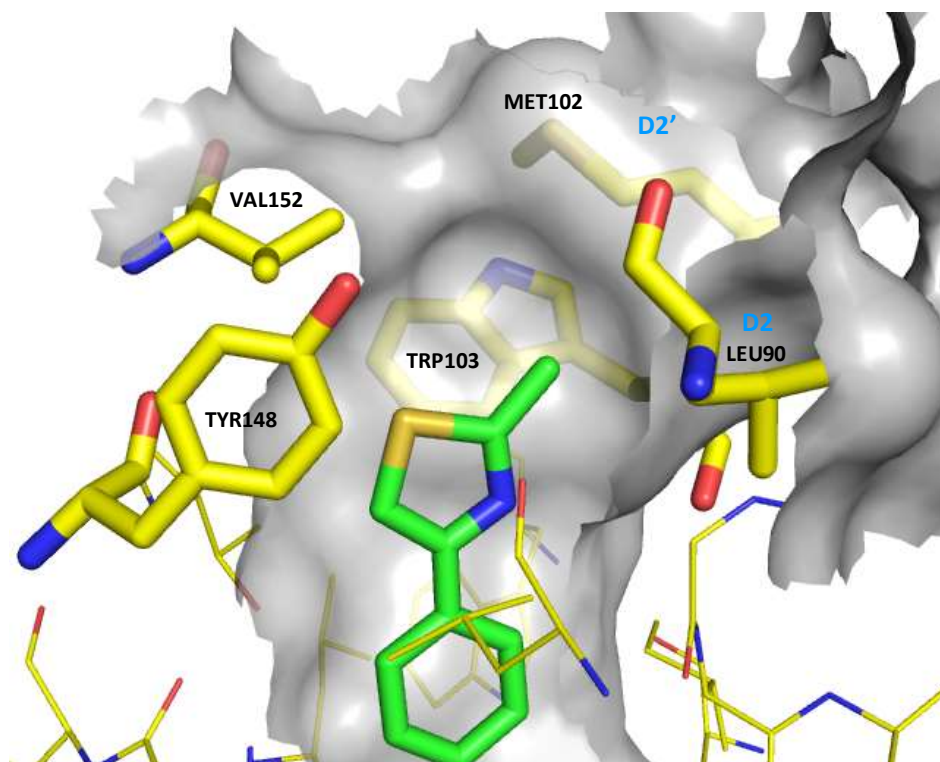


Figure 95 : Environnement du groupement méthyle du composé 6 au sein du domaine de régulation.

II.3.2 Modification du substituant en position 2 du cycle thiazole

II.3.2.1 Synthèses

La synthèse des esters a été réalisée à partir du dérivé cyano **32** (Figure 96). Ce composé est obtenu en trois étapes à partir du chlorure d'acide 4-acétylbenzenesulfonique qui est tout d'abord couplé avec le chlorhydrate de la 3,3,3-trifluoropropylamine en présence de N-méthylmorpholine, pour donner le sulfonamide **30** avec un rendement de 75%. La méthylcétone est alors bromée en position alpha du carbonyle pour donner la bromocétone avec un rendement de 93% (**31**) puis condensée sur le 2-cyanoéthanothioamide pour conduire au thiazole désiré **32** avec un rendement de 75%. Ce dérivé est ensuite fonctionnalisé en esters méthylique (**33**), éthylique (**34**) et isopropylique (**35**). Cette conversion se fait par action de l'alcool correspondant utilisé comme solvant, en milieu anhydre, en présence de TMSCl.²³⁸ Le mécanisme de cette réaction est illustré en Figure 97.

²³⁸ F.-T. Luo, *et al.*, *Tetrahedron Letters* **1998**, 39 (51), 9455-9456.

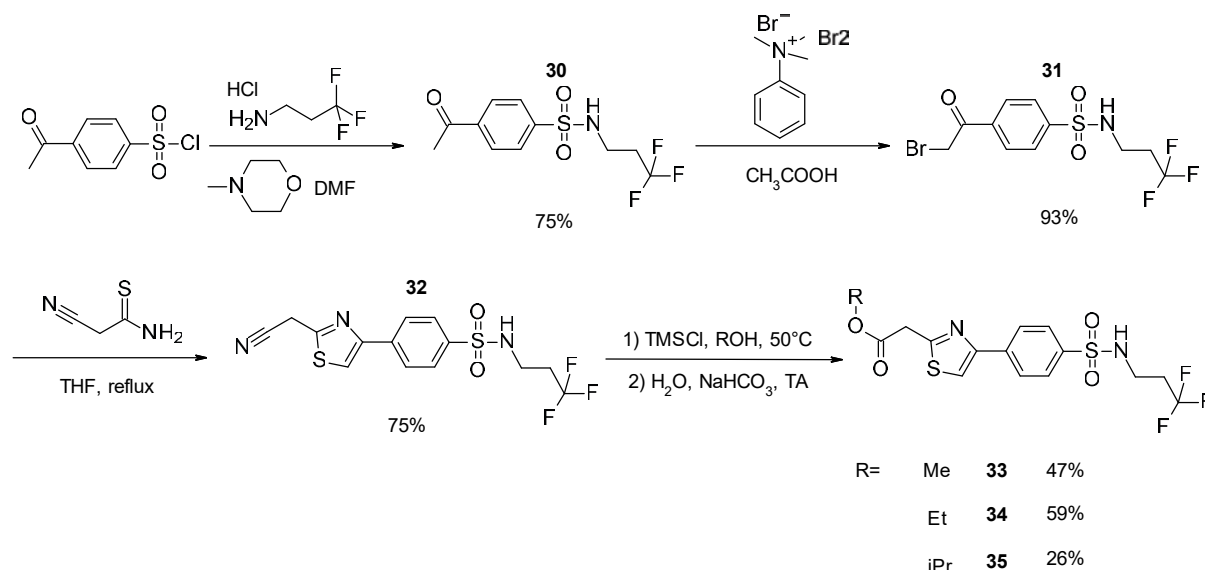


Figure 96 : Schéma de synthèse des esters 33 à 35.

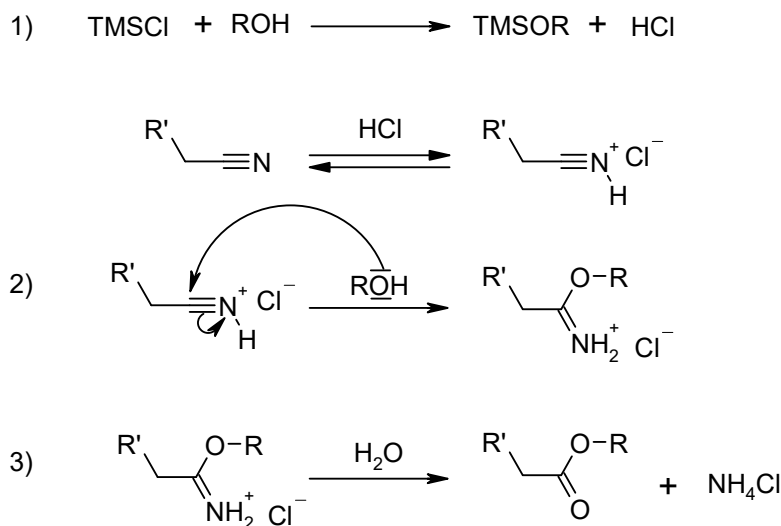


Figure 97 : Mécanisme de conversion du groupement nitrile en ester en présence de TMSCl.

Tout d'abord le TMSCl et l'alcool sont mis en contact afin de générer de l'acide chlorhydrique *in situ*, permettant de protoner partiellement la fonction nitrile. Ainsi, l'électrophilie de l'atome de carbone de la fonction nitrile est fortement augmentée (Figure 97). Un second équivalent d'alcool vient ensuite réagir comme nucléophile sur la fonction nitrile afin de former un chlorhydrate d'imidate. Enfin, l'hydrolyse du milieu conduit à la formation de l'ester attendu.

Le composé **36**, analogue amide du composé **35** a été préparé par aminolyse de l'ester **33** au reflux de l'isopropylamine, avec un rendement de 56% (Figure 98).

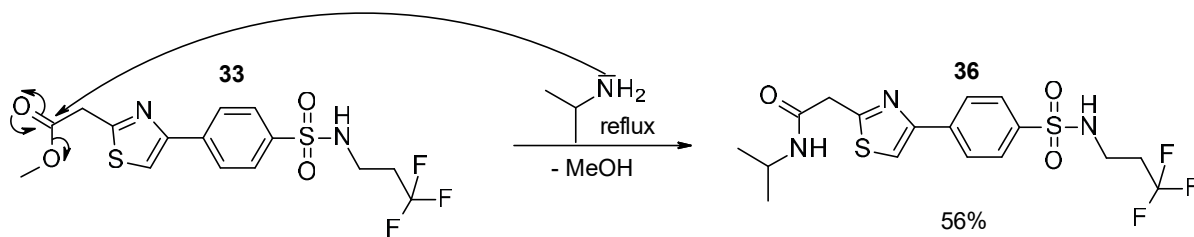


Figure 98 : Schéma de synthèse de l'amide 36.

Toujours dans le but d'introduire des substituants hydrophobes en position 2 du thiazole, l'analogue alkyle **38** de l'ester **35** a été synthétisé (Figure 99). Il est obtenu avec un rendement de 24% par condensation du 5-éthylhexanethioamide **37** et de la bromocétone **31**. Des difficultés rencontrées lors de la séparation du produit souhaité de certaines impuretés provenant de la bromocétone **31** expliquent ce faible rendement. Ces impuretés sont constituées essentiellement de la cétone non bromée et la cétone dibromée.

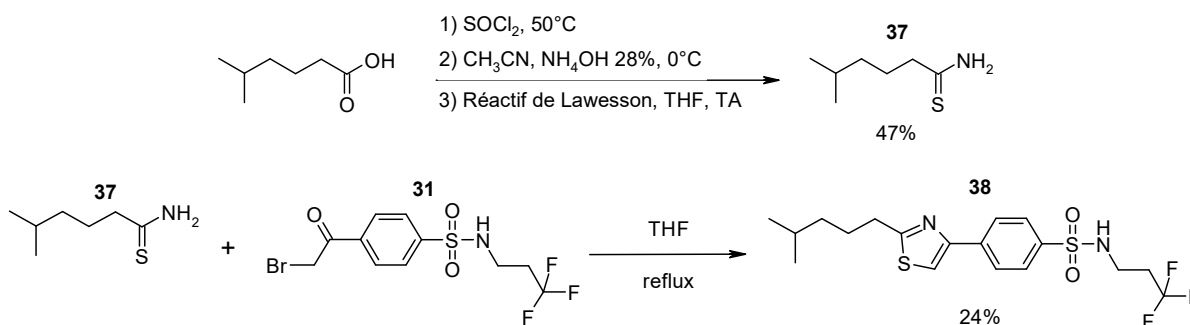


Figure 99 : Schéma de synthèse du composé 38.

La synthèse du thioamide **37** est réalisée en trois étapes à partir de l'acide 5-méthylhexanoïque. Cet acide est d'abord converti en chlorure d'acide par action du chlorure de thionyle puis en carboxamide à l'aide d'une solution aqueuse d'ammoniaque. La conversion en thioamide est effectuée par le réactif de Lawesson (Figure 100). Le rendement global est de 47% sur les trois étapes.

Le mécanisme de conversion des amides en thioamides par le réactif de Lawesson est présenté en Figure 100.

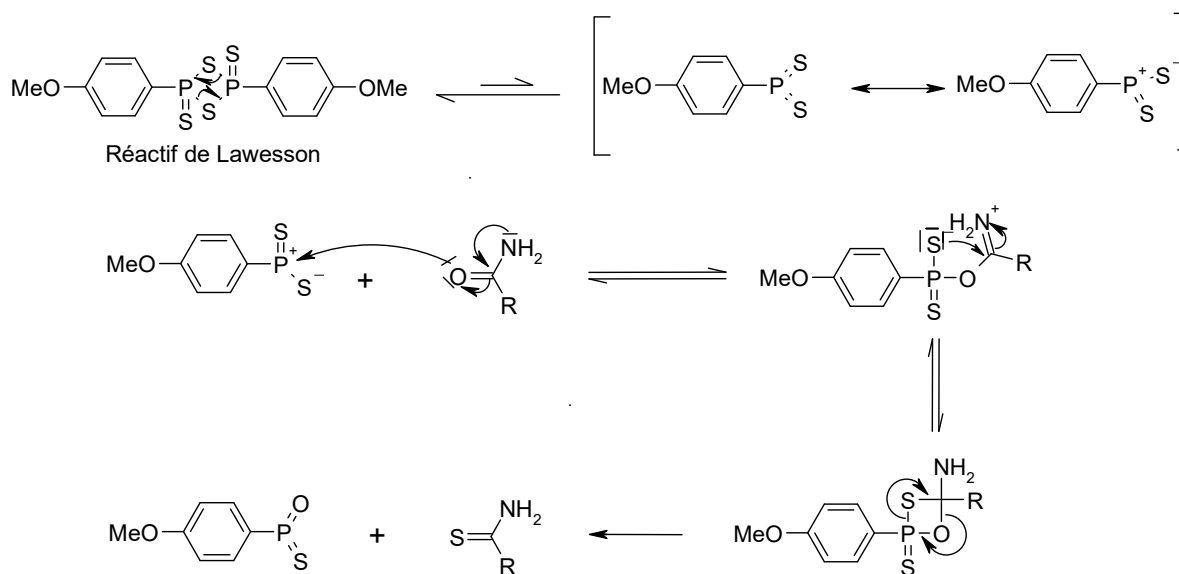


Figure 100 : Mécanisme d'action du réactif de Lawesson sur les composés carbonylés.

En solution, il s'établit un équilibre entre la forme dimère et la forme monomère du réactif de Lawesson, favorisé dans le sens de formation du dimère. Cet équilibre est déplacé en présence d'un dérivé carbonylé qui va réagir avec la forme monomérique. L'écriture des formes mésomères met très clairement en avant le caractère électrophile de l'atome de phosphore et donc le caractère nucléophile des atomes de soufre ($\Delta\chi \approx 0.4$). Dans le cas d'un amide, la nucléophilie de l'atome d'oxygène de la liaison C=O est exacerbée par l'effet mésomère donneur de l'atome d'azote, ce qui conduit donc à une attaque nucléophile de l'oxygène du dérivé carbonylé sur l'atome de phosphore du réactif de Lawesson. Il se produit ensuite une réaction intramoléculaire rapide entre l'atome de soufre chargé négativement et l'atome de carbone appauvri en électrons de la fonction iminium pour former un intermédiaire cyclique à 4 sommets similaire à ceux rencontrés dans les réactions de type Wittig. Cet intermédiaire instable peut se réarranger selon deux processus, l'un redonne les produits de départ, le second, favorisé par le caractère oxophile de l'atome de phosphore conduit à la formation du dérivé thiocarbonylé.

Enfin, le composé **39** possédant une fonction sulfone a été obtenu avec un rendement de 63% par réaction entre la bromocétone **31** et le 2-(tert-butylsulfonyl)éthanethioamide (Figure 101).

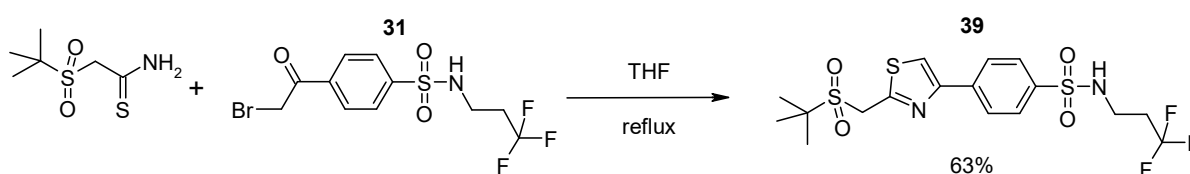
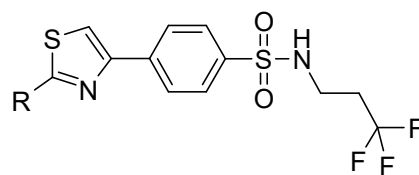


Figure 101 : Schéma de synthèse du composé **39**.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 17.

II.3.2.2 Résultats et discussion



Composé	R	ΔT_m (°C)	EC_{50} (μM)	HA	LE
24, Réf	$H_3C \rightarrow$	8.5	0.29	22	0.42
33		9.5	0.86	26	0.33
34		9.7	0.15	27	0.35
35		11.6	0.30	28	0.33
36		n.d.	0.21	28	0.33
38		12.4	0.39	27	0.33
39		7.3	0.20	29	0.32

Tableau 17 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 33 à 39. LE = $1.4 * pEC_{50} / HA$. n.d. : non déterminable.

Concernant les esters méthylique (**33**, $\Delta T_m=9.5^\circ C$, $EC_{50}=0.86\mu M$), éthylique (**34**, $\Delta T_m=9.7^\circ C$, $EC_{50}=0.15\mu M$) et isopropylique (**35**, $\Delta T_m=11.6^\circ C$, $EC_{50}=0.30\mu M$), on observe que l'augmentation de la lipophilie et de l'encombrement entraîne une augmentation de l'affinité pour la protéine par rapport au composé de référence **24** ($\Delta T_m=8.5^\circ C$, $EC_{50}=0.29\mu M$), probablement due à de nouvelles interactions hydrophobes. Cependant, cela ne se traduit pas par une nette augmentation de l'activité intracellulaire. La taille de ces molécules peut rendre difficile le passage des membranes cellulaires et bactériennes et peut donc être une explication à cette absence de corrélation entre les résultats obtenus sur les deux tests. Ces trois esters possédant un nombre d'atomes lourds (HA) supérieur au composé de référence, leur coefficient d'efficacité est donc beaucoup plus faible ($LE < 0.35$) que celui du composé **24** ($LE=0.42$).

Le constat est le même pour le composé **38** ($\Delta T_m=12.4^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.39\mu\text{M}$), le plus hydrophobe de tous les composés et également le plus affiné pour EthR, mais qui s'avère être moins actif que le composé de référence **24** ($EC_{50}=0.29\mu\text{M}$) sur le test de potentialisation de l'éthionamide et également moins efficace (LE de 0.33 contre 0.42).

Inversement, le composé **39** ($\Delta T_m=7.3^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.20\mu\text{M}$) possédant une fonction sulfone, se montre légèrement moins affiné pour EthR que **24** mais présente une activité intracellulaire équivalente. Cependant, là encore, le coefficient d'efficacité reste faible (0.32) en raison du nombre important d'atomes ajoutés.

Enfin, le composé **36** comportant une fonction isopropylamide s'est avéré peu soluble dans les conditions utilisées pour le test TSA, son affinité pour la protéine n'a donc pas pu être déterminée. Néanmoins, il présente une activité équivalente à la référence ($EC_{50}=0.21\mu\text{M}$) sur le test de potentialisation de l'éthionamide mais s'avère moins efficace (LE=0.32) à cause du nombre important d'atomes ajoutés ($\Delta\text{HA}=+6$).

Certains des composés synthétisés ici présentent donc une affinité meilleure pour la protéine que la molécule **24** de référence, néanmoins, cela se traduit rarement par une amélioration de l'activité en test intracellulaire. De plus, tous ces composés possèdent un nombre d'atomes largement supérieur au composé de référence, provoquant une chute importante des coefficients d'efficacité LE.

II.3.3 Modification du cycle thiazole

Nous avons étudié ici l'influence de la position de l'atome de soufre dans le cycle thiazole. Ainsi, le cycle phényle substitué par le groupement 2-méthylthiazol-4yle dans le composé de référence **24**, a été substitué par un groupement 4-méthylthiazol-2yle dans le composé **41**, et par le groupement benzo[*d*]thiazol-2-yl dans le composé **42** (Figure 102).

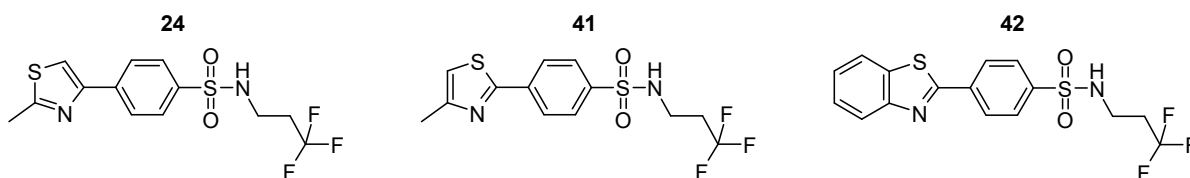


Figure 102 : Modifications réalisées au niveau du cycle thiazole du composé **24** de référence.

L'obtention du composé **41** par une synthèse de type Hantzsch utilisée jusqu'alors pour la synthèse des différents cycles thiazoles nécessite au moins cinq étapes, le thioamide correspondant n'étant pas commercial et devant être préparé à partir de l'acide carboxylique (Figure 103).

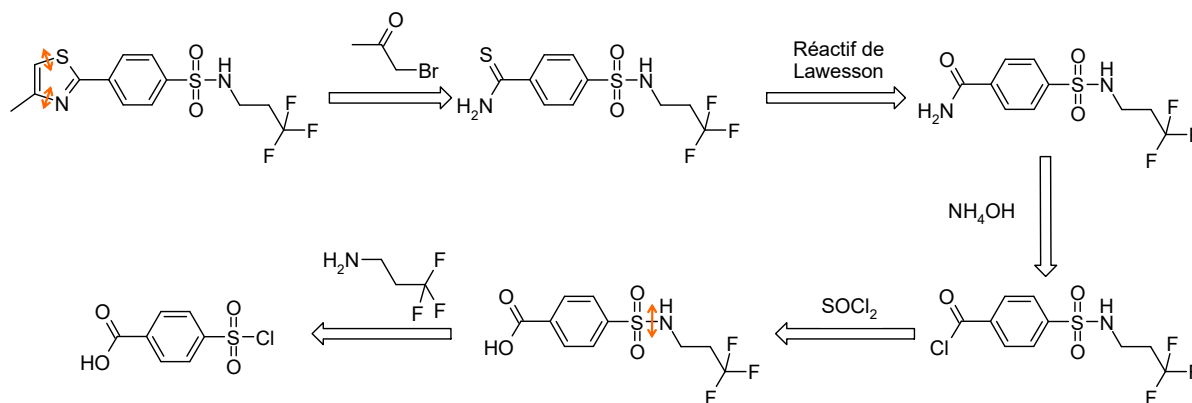


Figure 103 : Schéma de rétrosynthèse du composé **41** par une synthèse de Hantzsch.

Il a donc été envisagé une stratégie d'insertion originale de l'hétérocycle sur le cycle benzénique par une réaction pallado-catalysée de type Sonogashira, l'hétérocycle jouant le rôle d'un alcyne. En effet, l'atome d'hydrogène en position 2 de l'hétérocycle possède un pK_a équivalent à celui d'un alcyne terminal ($pK_a \approx 25-30$). Cette voie de synthèse permet d'accéder aux deux composés **41** et **42** (Figure 104)

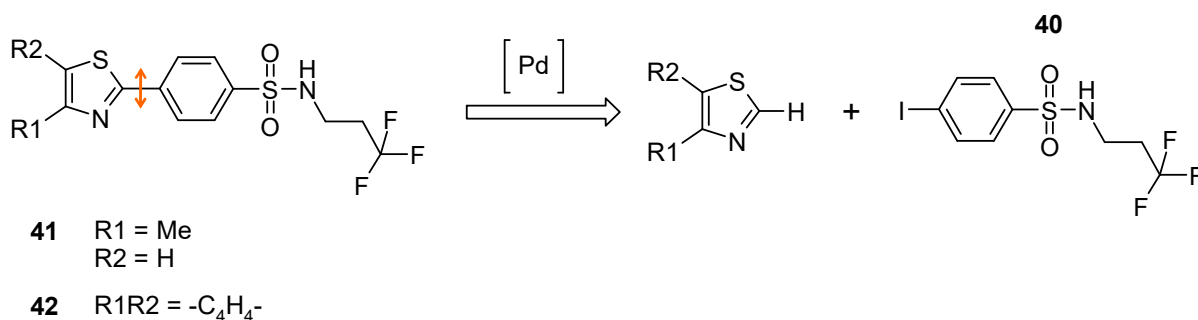


Figure 104 : Schéma de la rétrosynthèse des composés **41** et **42** par couplage pallado-catalysé.

Le synthon **40** nécessaire à l'obtention des composés **41** et **42** a été obtenu par réaction entre le chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine et le chlorure d'acide 4-iodobenzènesulfonique en présence de N-méthylmorpholine avec un rendement de 94% (Figure 105).

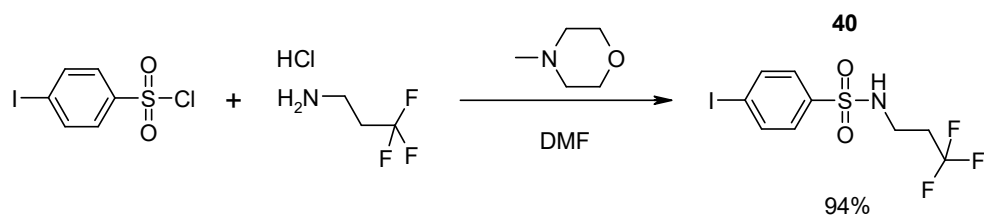


Figure 105 : Schéma de synthèse du composé 40.

Il a ensuite été mis en réaction avec le 4-méthylthiazole et le benzothiazole pour donner respectivement les composés **41** et **42** (Figure 106). Les conditions opératoires de la réaction ont été mises au point à partir des travaux décrits par Bellina *et al.*²³⁹, en l'absence de base. Ceci est préférable dans notre cas car nos composés possèdent une fonction sulfonamide facilement déprotonable ($pK_a \approx 8$), pouvant conduire à d'éventuels sous-produits issus d'une N-arylation. Les réactions ont été réalisées sous atmosphère d'argon, en présence d'acétate de palladium et de CuI dans le DMF. Le composé **41** a ainsi été obtenu avec un rendement de 53%. La purification du composé **42** a nécessité une chromatographie sur colonne de silice suivie d'une recristallisation, expliquant le faible rendement (20%) obtenu.

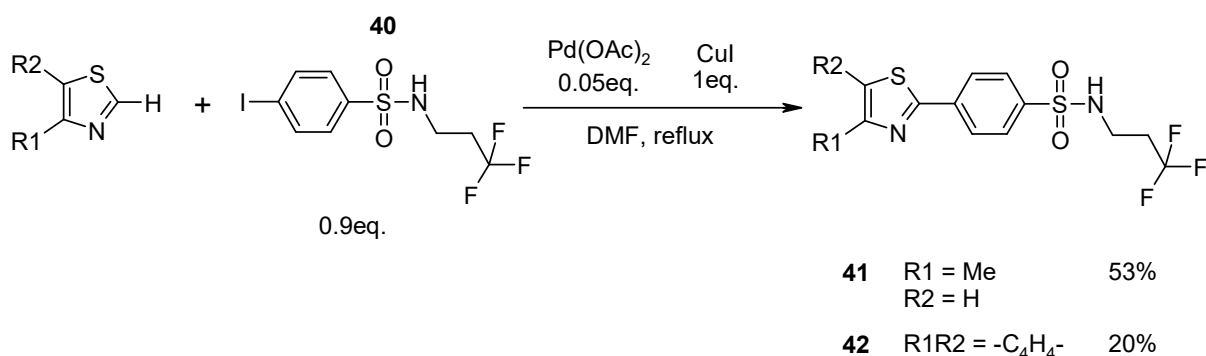


Figure 106 : Schéma de synthèse des composés 41 et 42.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 18.

²³⁹ F. Bellina, *et al.*, *ChemInform* **2006**, 37 (26).

II.3.3.1 Résultats et discussion

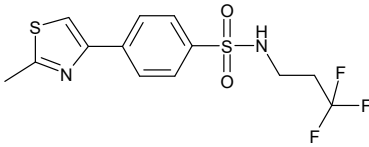
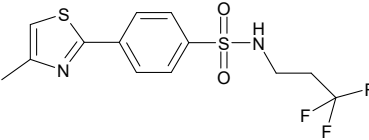
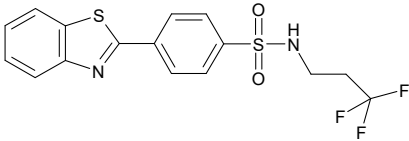
Composé	Structure	ΔT_m (°C)	EC_{50} (μM)	HA	LE
24, Réf		8.5	0.29	22	0.42
41		6.8	0.66	22	0.39
42		n.d.	0.30	25	0.37

Tableau 18 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 41 et 42. $LE=1.4 \cdot pEC_{50}/HA$. n.d. : non déterminable.

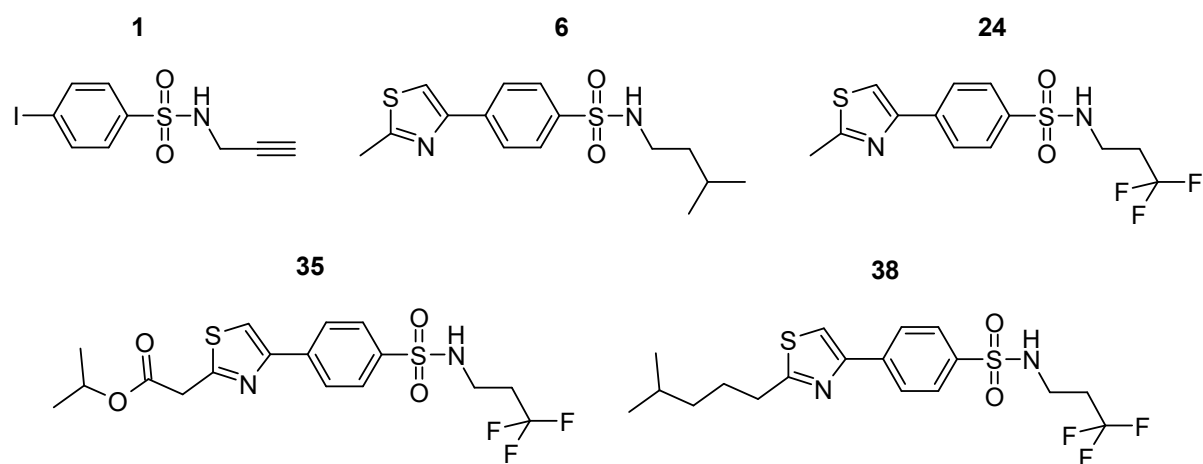
Le remplacement du groupement 2-méthylthiazol-4-yl (composé de référence **24**, $\Delta T_m=8.5^\circ C$, $EC_{50}=0.29\mu M$) par un 4-méthylthiazol-2-yl (**41**, $\Delta T_m=6.8^\circ C$, $EC_{50}=0.66\mu M$) entraîne une perte assez importante de l'affinité pour la protéine ($\Delta(\Delta T_m)=-2^\circ C$). L'activité sur test intracellulaire n'est cependant que très peu affectée (diminution d'un facteur 2).

Comme le composé **36** précédemment, le composé **42** s'est avéré peu soluble dans les conditions du test TSA donc son affinité pour la protéine EthR n'a pas pu être déterminée. Cependant, ce composé présente une activité intracellulaire équivalente au composé de référence, pour un nombre d'atome néanmoins supérieur, donc une efficacité moindre par rapport au composé de référence (0.37 contre 0.42).

II.3.4 Conclusion

La majorité des modifications apportées au niveau du cycle thiazole ainsi que du substituant en position 2 a conduit à des produits aussi actifs voire même plus actifs que le composé **24** de référence. Cependant, ces modifications chimiques s'accompagnent d'une augmentation importante du nombre d'atomes et de la masse molaire des composés. Le gain d'activité obtenu étant faible, cela engendre une perte d'efficacité (diminution du LE) pour les différentes molécules synthétisées.

La solubilité et le LogD des deux analogues les plus affins pour la protéine (**35** et **38**) ont également été mesurés. L'introduction de groupements plus volumineux et hydrophobes en position 2 du cycle thiazole entraîne une forte chute de la solubilité ainsi qu'une augmentation importante du LogD (+0.6 unités pour le composé **35**, +0.9 unités pour le composé **38**) (Tableau 19). Cette augmentation du logD provoque une diminution du coefficient LLE_{AT} (0.23 pour le composé **35**, 0.22 pour le composé **38**) par rapport au composé **24** (0.30).



Composé	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)	HA	LE	IC ₅₀ (μM)	Solubilité (μM)	LogD	LLE _{AT}
1	0.1	>20	14	-	160 ±	> 200	2.26	-
6	6.1	5.7	21	0.35	4.9 ±0.1	20	3.55	0.21
24	8.5	0.29	22	0.42	0.55 ±0.02	41.4	3.12	0.30
35	11.6	0.30	28	0.33	n.t.	2.8	3.76	0.23
38	12.4	0.39	27	0.33	n.t.	< 1	> 4	0.22

Tableau 19 : Comparaison des composés **35** et **38** avec les précédentes molécules de référence.

L'ester **35** a pu être co-cristallisé avec la protéine EthR (Figure 107). On observe que les groupements communs avec le composé **24**, c'est-à-dire la chaîne trifluoropropyle, le cycle phényle ainsi que le cycle thiazole se positionnent de manière identique au composé **24**. La fonction ester

n'interagit pas avec la Tyr148 et ne semble pas se loger dans l'un des domaines D2 ou D2'. Le gain en affinité observé pour les composés possédant une fonction ester semble donc uniquement apporté par un contact hydrophobe avec les résidus autres que la Tyr148.

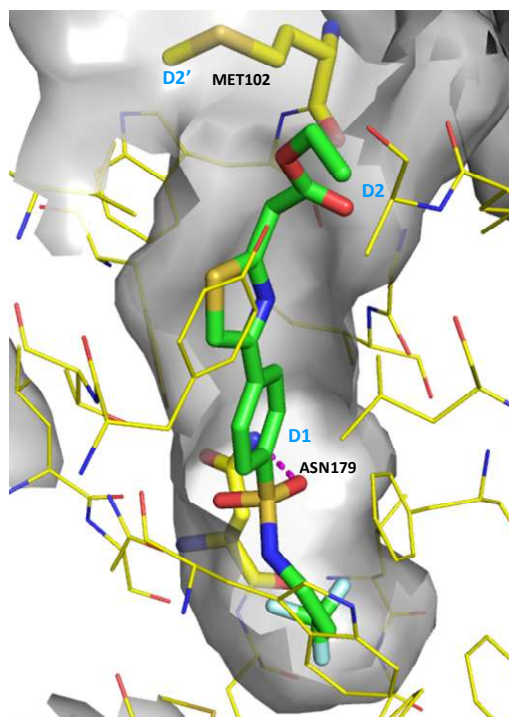


Figure 107 : Mode de liaison du composé 34 à la protéine EthR obtenu par co-cristallisation (résolution 2.5Å).

La molécule **24** présentant des coefficients d'efficacité (LE et LLE_{AT}) et des paramètres physico-chimiques meilleurs, elle a été conservée comme molécule de référence pour la suite du travail d'optimisation.

III Seconde phase d'optimisation

III.1 Modification de la fonction sulfonamide

III.1.1 Stratégie

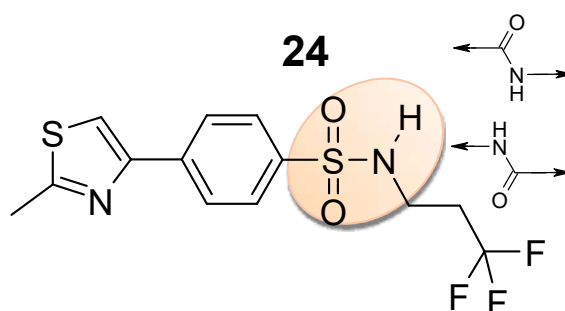


Figure 108 : Modification de la fonction sulfonamide : analogues du composé 24.

La fonction sulfonamide du composé **24** effectue une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de l'asparagine 179 (Figure 109) et joue donc un rôle clé dans la fixation de cette famille d'inhibiteurs au sein du domaine de régulation de la protéine EthR. A ce stade de l'optimisation de la série growing, nous avons donc souhaité connaître l'influence du remplacement de cette fonction sulfonamide par une fonction amide (Figure 108).

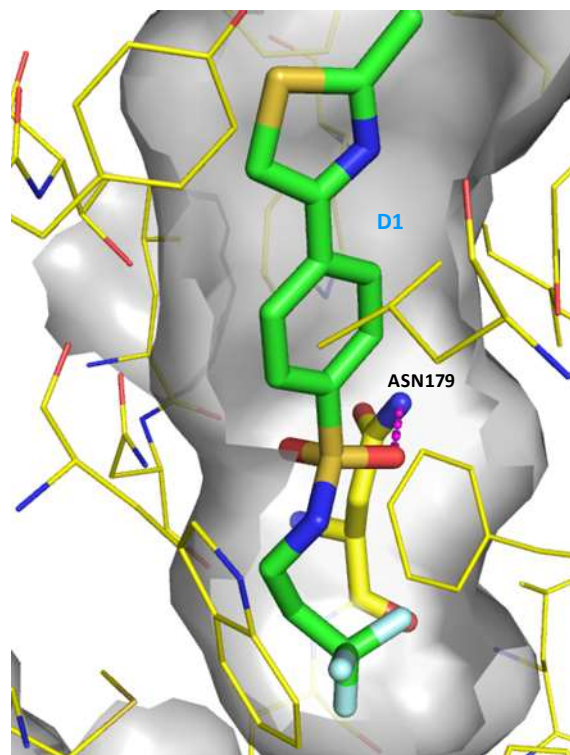


Figure 109 : Mode de liaison du composé 24 à la protéine EthR obtenu par co-cristallisation.

III.1.2 Synthèses

Le composé **43**, analogue amide du composé **24**, a été obtenu avec un rendement de 93% par couplage de la 3,3,3-trifluoropropylamine avec l'acide 4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzoïque, commercialement disponible, en présence d'HBTU, d'HOBT et de DIEA dans le DMF (Figure 110).

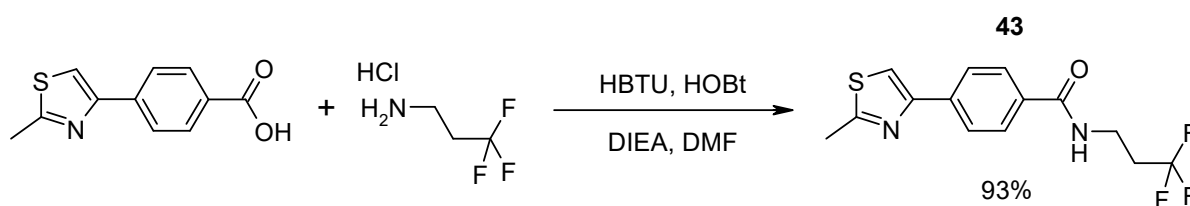


Figure 110 : Schéma de synthèse de l'analogue amide **43**.

L'analogue rétro-amide **44** a quant à lui été synthétisé en mettant en réaction la 4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzénamine avec de l'acide 4,4,4-trifluorobutyrique en présence d'anhydride propylphosphonique (T3P) et de DIEA dans le DMF²⁴⁰ (Figure 111).

²⁴⁰ J. K. Augustine, *et al.*, *Tetrahedron* **2009**, 65 (48), 9989-9996.

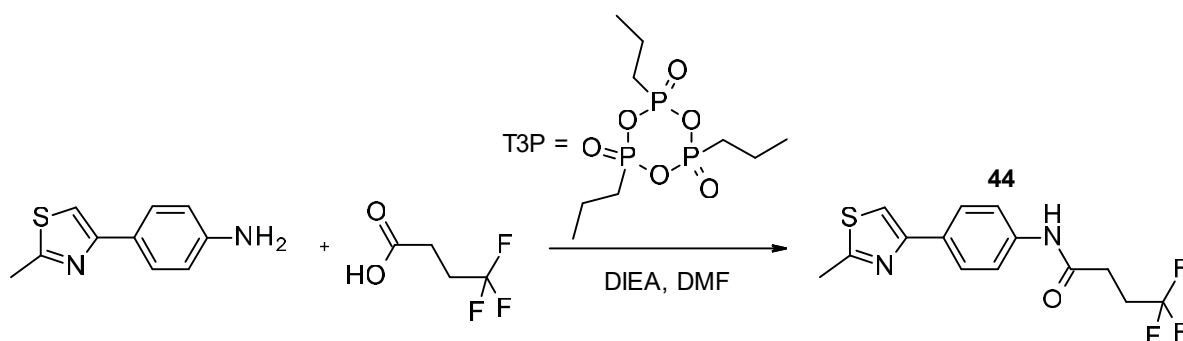


Figure 111 : Schéma de synthèse du rétro-amide 44.

Le T3P est un anhydride phosphonique cyclique découvert dans les années 1980 en tant que réactif de couplage dans des synthèses peptidiques.²⁴¹ Il est de plus en plus utilisé depuis une dizaine d'années comme réactif de couplage peptidique ou déshydratant pour la formation de nitriles, d'amides de Weinreb, d'isonitriles ou d'hétérocycles entre autres.²⁴⁰ Ce composé a l'avantage d'être très peu toxique, soluble dans l'eau et d'engendrer peu d'épimérisation.

En présence d'une base, le carboxylate se forme et vient attaquer l'anhydride phosphonique entraînant l'ouverture du cycle et la formation d'un anhydride mixte. Cet acide activé va alors pouvoir réagir avec différents nucléophiles (Figure 112).

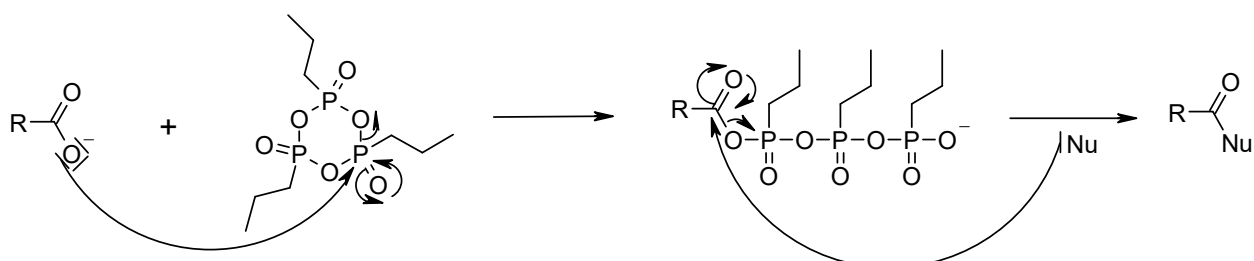


Figure 112 : Activation de la fonction acide carboxylique à l'aide du T3P.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 20.

²⁴¹ H. Wissmann, *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1980**, 19 (2), 133-134.

III.1.3 Résultats et discussion

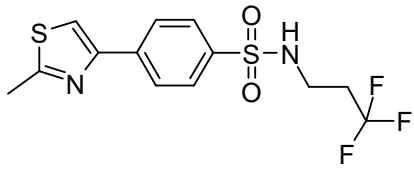
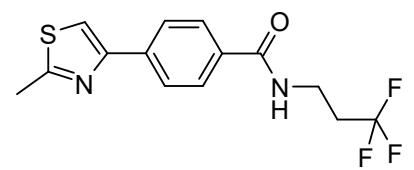
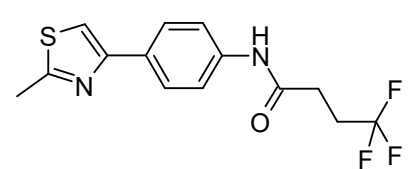
Composé	Structure	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)	HA	LE
24, Réf		8.5	0.29	22	0.42
43		11.4	0.083	21	0.47
44		4.7	>2.5	21	-

Tableau 20 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 43 et 44. LE=1,4*pEC₅₀/HA.

Le remplacement de la fonction sulfonamide du composé de référence **24** ($\Delta T_m=8.5^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.29\mu\text{M}$) par une fonction amide (composés **43**, $\Delta T_m=11.4^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.083\mu\text{M}$) s'avère bénéfique tant sur l'affinité pour la protéine EthR ($\Delta(\Delta T_m) = +2.9^\circ\text{C}$) que sur l'activité intracellulaire (amélioration d'un facteur 3.5). La différence de géométrie de ces groupements peut être à l'origine de cette amélioration. En effet, l'atome de soufre dans la fonction sulfonamide est tétraédrique alors que la liaison amide est plane. Le positionnement dans la poche de liaison et donc la capacité à former des liaisons hydrogène sont différents. Par ailleurs, le nombre d'atomes lourds ayant été réduit d'une unité, cette augmentation d'activité entraîne une forte augmentation du coefficient d'efficacité LE (de 0.42 à 0.47).

En revanche, le rétro-amide **44** ($\Delta T_m=4.7^\circ\text{C}$, $EC_{50}>2.5\mu\text{M}$) est beaucoup moins actif que les composés **24** et **43**. La position de l'atome d'oxygène semble être cruciale pour l'activité des inhibiteurs. Cette observation semble confirmer que les dérivés amides engagent leur groupement carbonyle comme accepteur de liaison hydrogène de la protéine.

III.1.4 Conclusion

Afin de comprendre la forte augmentation d'activité obtenue en remplaçant la fonction sulfonamide par une fonction amide, le composé **43** a été co-cristallisé avec la protéine EthR (Figure 113). Les cycles phényle et thiazole occupent la même position au sein du domaine D1 que les composés précédents. L'atome d'oxygène de la fonction amide du composé **43** forme une liaison hydrogène avec l'asparagine 179, de manière semblable à la fonction sulfonamide pour les composés **6** et **24**. Néanmoins, cette fonction amide forme une nouvelle liaison hydrogène avec la chaîne latérale de l'asparagine 176, jamais observée jusqu'alors, par l'intermédiaire de son atome d'azote. Cette liaison hydrogène supplémentaire permet d'expliquer en partie le gain d'activité obtenu lors du remplacement de la fonction sulfonamide par une fonction amide. Cette substitution entraîne également une modification du positionnement de la chaîne trifluoropropyle dans le bas du domaine D1 (Figure 114). On observe un ancrage plus optimal du groupement trifluorométhyle, offrant une meilleure occupation de la cavité hydrophobe formée par les résidus Trp145, Phe110, Leu183, Met142, Phe114, Phe184, Glu180 et Trp138. Ce phénomène permet également d'expliquer le gain d'activité observé entre les composés **24** et **43**.

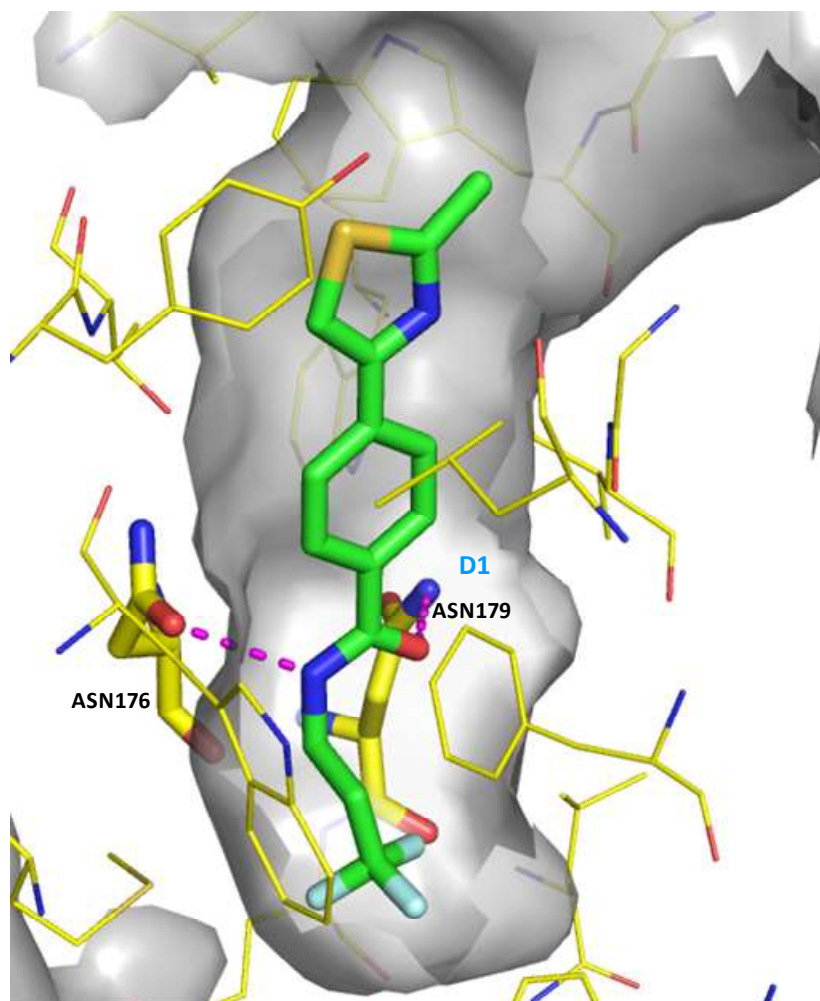


Figure 113 : Mode de liaison du composé 43 à la protéine EthR obtenu par co-cristallisation (résolution 2.0Å).

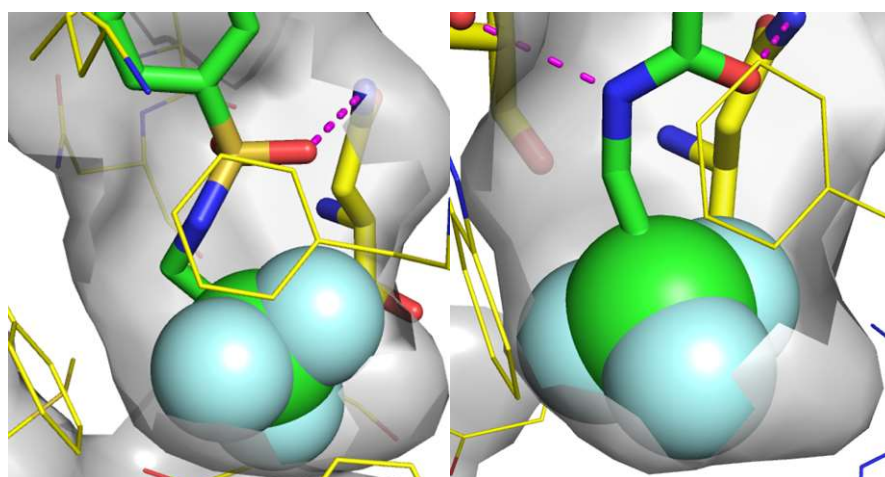
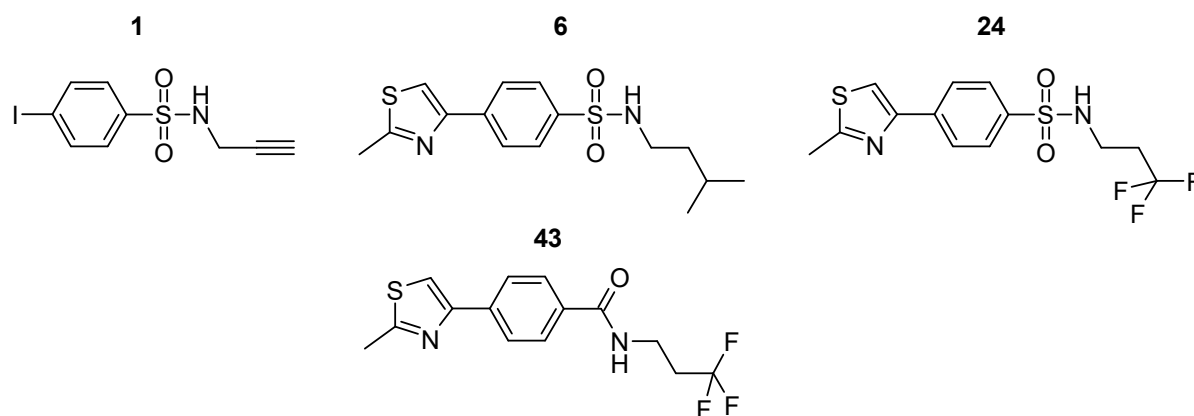


Figure 114 : Comparaison du mode de liaison des groupements CF₃ des composés 24 (à gauche) et 43 (à droite).

L'IC₅₀, la solubilité et le LogD du composé **43** ont également été mesurés (Tableau 21). Ce composé présente une IC₅₀ de 480nM sur le test de résonance plasmonique de surface, soit une légère amélioration par rapport au composé **24** (IC₅₀=550nM). Le remplacement de la fonction sulfonamide par une fonction amide permet d'augmenter légèrement la solubilité (46.9μM contre 41.4μM) et de diminuer le LogD de 0.3 unités logarithmiques. Cela se traduit également par une nouvelle augmentation du coefficient d'efficacité LLE_{AT} (0.36 contre 0.30).



Composé	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)	HA	LE	IC ₅₀ (μM)	Solubilité (μM)	LogD	LLE _{AT}
1	0.1	>20	-	-	160 ±	> 200	2.26	-
6	6.1	5.7	21	0.35	4.9 ±0.1	20	3.55	0.21
24	8.5	0.29	22	0.42	0.55 ±0.02	41.4	3.12	0.30
43	11.4	0.083	21	0.47	0.48 ±0.06	46.9	2.82	0.36

Tableau 21 : Comparaison du composé **43** avec les précédentes molécules de référence.

A ce stade de l'optimisation, le composé **43** a été sélectionné comme la nouvelle molécule de référence tant par rapport à ses activités que pour ses propriétés physico-chimiques. Nous avons alors souhaité comparer les caractéristiques de ce composé au profil du candidat idéal dressé précédemment.

III.2 Comparaison du composé 43 avec le profil envisagé

Les valeurs d'activité fixées dans le profil de départ sur les trois tests sont toutes atteintes par le composé **43** (Tableau 22). Il est souvent difficile lors d'une approche par fragments d'améliorer l'efficacité du hit initial. Cependant, dans notre cas, grâce à de légères modifications structurales entraînant de fortes augmentations d'activité, l'efficacité du composé **6** (LE = 0.35) a pu être améliorée (LE = 0.47 pour le composé **43**) afin de répondre à l'objectif fixé (LE > 0.4).

Le composé **43** a également été évaluée sur la technique Bactec (partie expérimentale, p.362). Cette expérience indique que jusqu'à une concentration de 10 μ M, le composé **43** seul n'a aucune activité sur la croissance de *M. tuberculosis*. En revanche, il a été montré que le composé **43** utilisé à une concentration de 0.25 μ M permet de diminuer la CMI de l'éthionamide à 0.1 μ g/mL contre 1 μ g/mL lorsqu'elle est utilisée seule. Ces résultats sont accords avec ceux obtenus sur les autres tests et valde le mode d'action des composés.

Activités	Composé 6	Profil	Composé 43
ΔT_m (°C)	6.1	>8	11.4
IC ₅₀ (μ M)	4.9	<0.5	0.48
EC ₅₀ (μ M)	5.7	<0.100	0.083
LE	0.35	>0.4	0.47

Tableau 22 : Comparaison des activités du composé 43 par rapport au profil souhaité.

La masse molaire (MW = 314.3) et le nombre d'atomes lourds (21) n'ont pas été augmentés par rapport au composé **6** (MW = 324.47, HA = 21). Le logD a pu être diminué de 0.7 unités logarithmiques par rapport au composé **6**, permettant ainsi de revenir sous la limite (logD < 3) imposée par le profil. Enfin, la solubilité a pu être augmentée d'un facteur 2 par rapport au composé **6** (Tableau 23).

Paramètres physico-chimiques	Composé 6	Profil	Composé 43
MW	324.47	<400	314.3
HA	21	-	21
LogD	3.55	<3	2.82
Solubilité (μ M)	20	>10	46.9

Tableau 23 : Comparaison des paramètres physico-chimiques du composé 43 par rapport au profil souhaité.

La stabilité de la molécule sur microsomes hépatiques et sur plasma de souris femelle a été mesurée pour le composé **43**, afin de le comparer au profil idéal envisagé en début de stratégie (Tableau 24).

Paramètres ADME	Composé 6	Profil	Composé 43
t_{1/2} microsomes (min)	-	> 30	10
Cl_{int} (μL/min/mg)	-	50 <	144
t_{1/2} plasma (h)	-	> 24	> 24
Lipinski	4/4	4/4	4/4
Veber	2/2	2/2	2/2

Tableau 24 : Comparaison des paramètres ADME du composé 43 par rapport au profil souhaité.

Le composé **43** satisfait aux règles de Lipinski et de Veber tout comme le composé **6**. Il possède également une très bonne stabilité plasmatique ($t_{1/2} > 24\text{h}$). Cependant, il est très vite dégradé en présence de microsomes hépatiques de souris femelle avec un temps de demi-vie de dix minutes seulement. Ce paramètre de stabilité microsomale est le seul qui n'est pas en accord avec le profil souhaité.

Cette faible stabilité microsomale ne permet pas d'envisager d'expérience *in vivo* avec cette molécule. Dans la suite des travaux présentés ici, nous avons synthétisé des analogues du composé **43** avec comme objectif de conserver de l'activité en essayant d'améliorer notamment la stabilité microsomale de la molécule afin d'obtenir des valeurs plus comparables au composé BDM41906 et conformes au profil envisagé.

III.3 Modification du substituant en position 2 du cycle thiazole

III.3.1 Stratégie

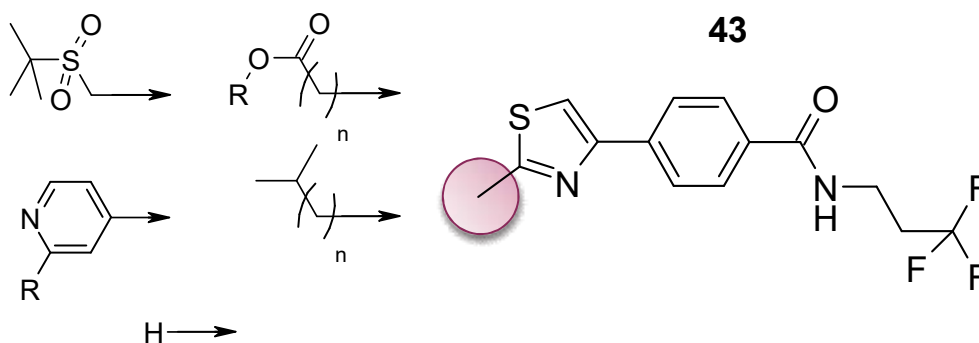


Figure 115 : Modifications du substituant en position 2 du cycle thiazole : analogues du composé 43.

Afin de valider le gain d'activité apporté par la fonction amide, les analogues amides des composés les plus actifs obtenus précédemment ont été synthétisés.

De plus, nous avons observé que ces substituants hydrophobes assez volumineux permettent d'augmenter l'affinité pour la protéine mais ont également pour effet de dégrader les propriétés physico-chimiques des composés (solubilité, LogD). Ainsi, des analogues plus courts ont été synthétisés. Des cycles pyridines pouvant se positionner à l'entrée de la poche de liaison et interagir potentiellement avec la zone d'accès au solvant ont également été introduits. Enfin, l'absence de substituant a été évaluée.

III.3.2 Synthèses

La stratégie de synthèse envisagée pour accéder à toutes ces molécules est similaire à celle utilisée pour les analogues possédant le groupement sulfonamide et est présentée sur la Figure 116.

Au cours de la première étape, l'acide 4-acétylbenzoïque est mis en réaction avec le chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine en présence de T3P et de TEA dans l'AcOEt pour former l'amide **45** avec un rendement de 86%.

Il a été observé précédemment la présence de cétone non bromée et de cétone dibromée lors de la formation de la bromocétone. Ces impuretés étaient en grande partie responsables dans les phases d'optimisation précédentes des mauvais rendements des étapes de cyclisation. La réaction de bromation permettant la synthèse de l'alpha-bromocétone **46** a donc été optimisée.

Les réactions de bromation ont jusque là été réalisées en présence de tribromure de triméthylphénylammonium dans l'acide acétique. A partir des résultats obtenus par Kajigaeshi *et al.*²⁴² pour la préparation des alpha-chlorocétone, nous avons optimisé les conditions de bromation (Figure 116). Ces conditions utilisent un mélange DCE 5/2 Méthanol comme solvant et une température de 50°C. Le composé **46** est ainsi obtenu avec un rendement quantitatif et une pureté supérieure à 95% (contre 80% précédemment). Cette optimisation a alors permis d'améliorer les rendements lors des étapes de cyclisation ultérieures, permettant d'accéder aux composés **49**, **50**, **52** à **58**.

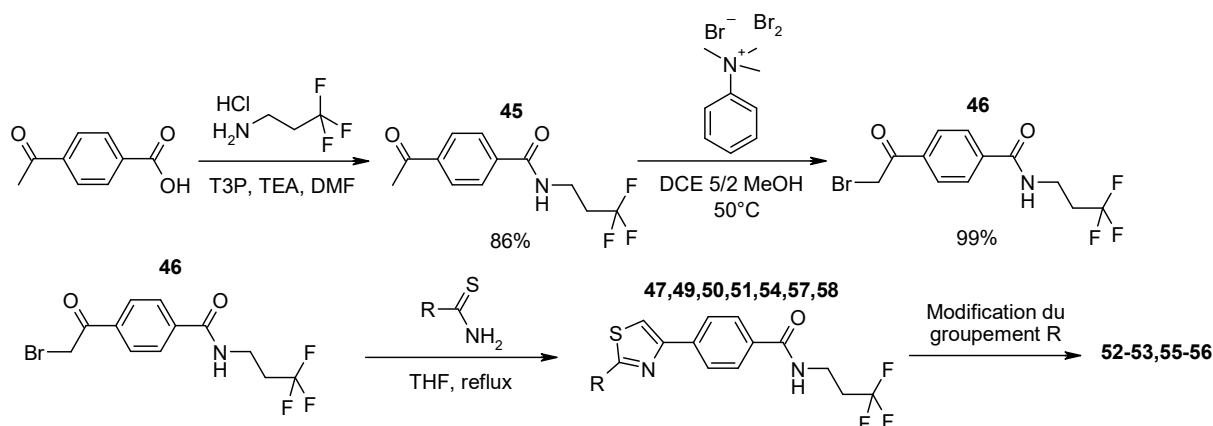


Figure 116 : Schéma de synthèse de la bromocétone **46** et des composés **47** à **58**.

La synthèse du composé **47** a été effectuée par condensation du thioamide **37** sur la bromocétone **46**, avec un rendement de 22% (Figure 117).

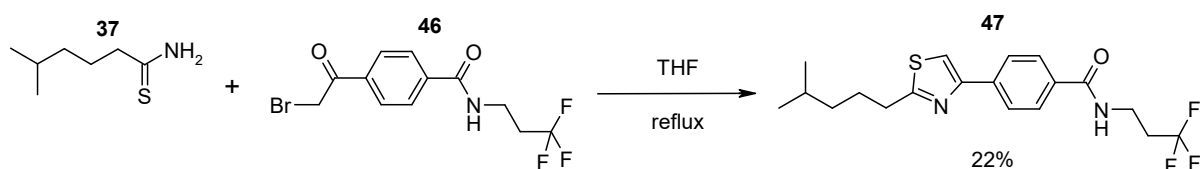
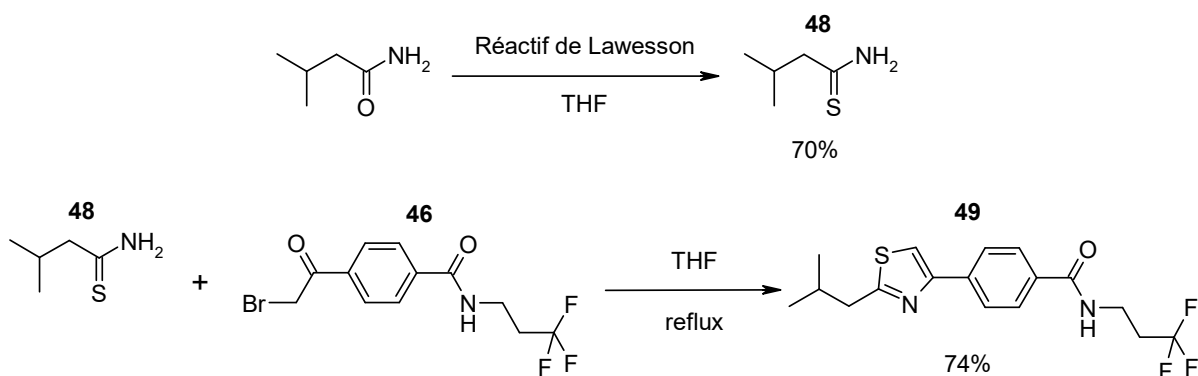


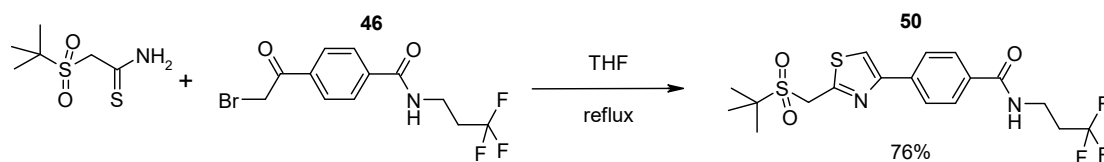
Figure 117 : Schéma de synthèse du composé **47**.

La chaîne isohexyle portée par le composé **47** a ensuite été remplacée par une chaîne isobutyle plus courte (composé **49**, Figure 118). Cette synthèse a été réalisée par condensation du thioamide **48** sur la bromocétone **46** avec un rendement de 74%. Le thioamide **48** a été obtenu avec un rendement de 70% par action du réactif de Lawesson sur le 3-méthylbutanamide dans le THF.

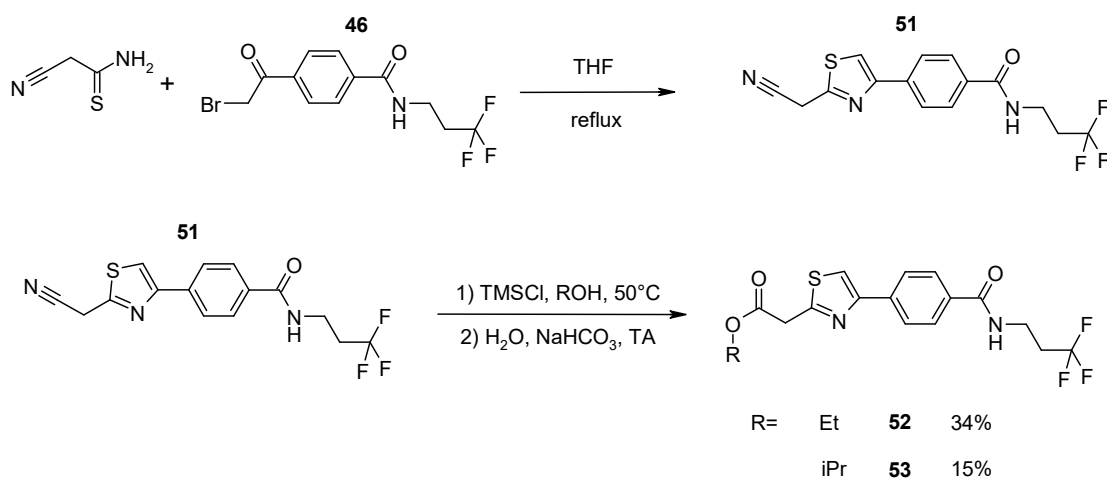
²⁴² S. Kajigaeshi, *et al.*, *Synthesis* **1988**, 545-546.


 Figure 118 : Schéma de synthèse du composé **49**.

Le composé **50** possédant la fonction sulfone a quant à lui été synthétisé par condensation de la bromocétone **46** et du 2-(tert-butylsulfonyl)éthanthioamide, avec un rendement de 76% (Figure 119).


 Figure 119 : Schéma de synthèse de l'analogue sulfone **50**.

Les composés **52** et **53** (Figure 120) ont été synthétisés de manière analogue aux esters précédemment présentés. Le dérivé nitrile intermédiaire (**51**) obtenu par cyclisation entre la bromocétone **46** et le 2-cyanoéthanthioamide n'a pas été isolé. Les esters éthylique (**52**) et isopropylique (**53**) ont été obtenus avec un des rendements de respectivement 34% et 15% sur les deux étapes.


 Figure 120 : Schéma de synthèse des esters **52** et **53**.

Les analogues de ces composés possédant une fonction ester directement branchée sur le cycle thiazole, ont été préparés suivant le schéma de synthèse présenté en Figure 121.

Tout d'abord, l'ester éthylique **54** a été obtenu avec un rendement de 61% par condensation du 2-amino-2-thioacétate d'éthyle sur la bromocétone **46**. La stratégie pour obtenir l'ester isopropylique **55** a été de synthétiser tout d'abord l'acide carboxylique correspondant par β -élimination en présence d'isopropanolate. Cet acide carboxylique a ensuite été mis en réaction avec l'isopropanol en présence de SOCl_2 . Au cours de cette réaction, deux produits ont été formés en proportions équivalentes (détermination par HPLC) et séparés par HPLC préparative : l'ester isopropylique **55** souhaité et le sous-produit **56** issu de la décarboxylation.

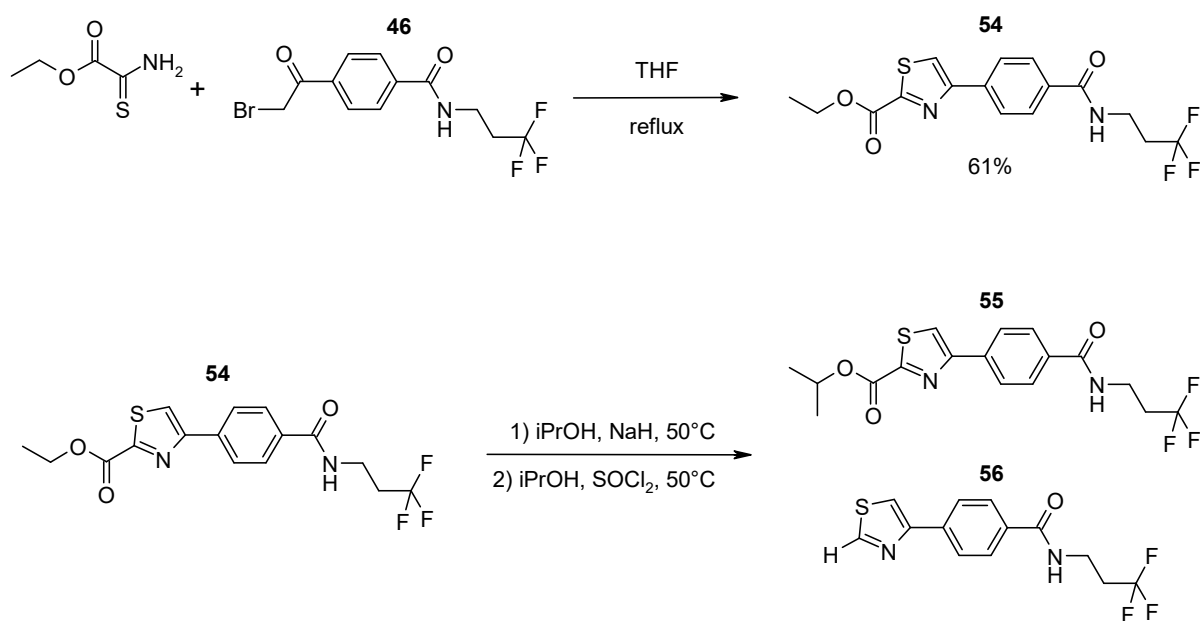


Figure 121 : Schéma de synthèse des composés **54** à **56**.

Enfin, des cycles pyridines substitués ou non ont été introduits. L'atome d'azote situé en position 4 devrait potentiellement être capable d'interagir avec des molécules de solvants à l'entrée de la poche de liaison. Comme précédemment, les composés **57** et **58** ont été obtenus avec des rendements de 66% et 63% respectivement par condensation des thioamides correspondant avec la bromocétone **46** (Figure 122).

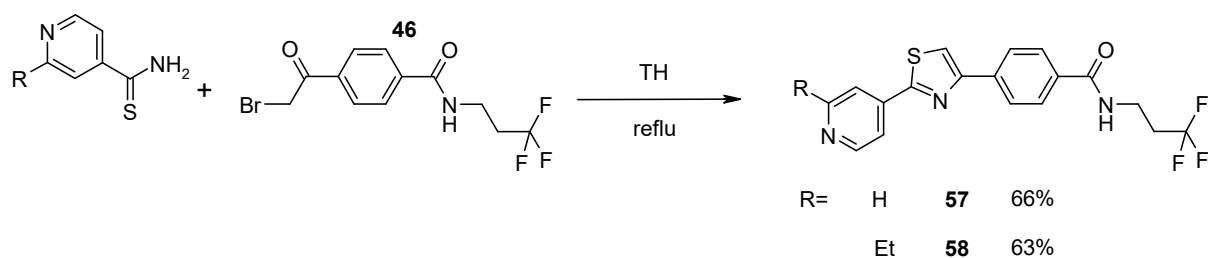
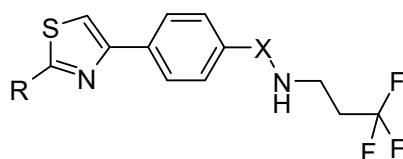


Figure 122 : Schéma de synthèse des composés **57** et **58**.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans les Tableau 25 et Tableau 26.

III.3.3 Résultats et discussion



Composé	R	X	ΔT_m (°C)	EC_{50} (μM)	HA	LE
24		SO ₂	8.5	0.29	22	0.42
43		CO	11.3	0.083	21	0.47
34		SO ₂	9.7	0.15	27	0.35
52		CO	10.1	0.19	26	0.36
35		SO ₂	11.6	0.30	28	0.33
53		CO	13.2	0.33	27	0.34
39		SO ₂	7.3	0.20	29	0.32
50		CO	9.6	0.041	28	0.37
38		SO ₂	12.4	0.39	27	0.33
47		CO	13.0	0.030	26	0.41

Tableau 25 : Impact du remplacement de la fonction sulfonamide par la fonction amide sur les activités biologiques. $LE=1.4 \cdot pEC_{50}/HA$.

Nous avons observé précédemment, dans le cas où le cycle thiazole est substitué par un méthyle en position 2, que l'introduction de la fonction amide (composé **43**, $\Delta T_m=11.3^\circ C$, $EC_{50}=0.083\mu M$) à la place de la fonction sulfonamide (composé **24**, $\Delta T_m=8.5^\circ C$, $EC_{50}=0.29\mu M$) permet d'augmenter fortement l'affinité des ligands à la cible mais aussi leur activité intracellulaire (Tableau 25). Ceci est encore vrai avec une chaîne isohexyle ou triméthylsulfone, pour les composés

47 ($\Delta T_m=13.0^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.030\mu\text{M}$) et **50** ($\Delta T_m=9.6^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.041\mu\text{M}$), par rapport aux composés **38** ($\Delta T_m=12.4^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.39\mu\text{M}$) et **39** ($\Delta T_m=7.3^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.20\mu\text{M}$) respectivement.

En revanche, cela n'est pas vérifié dans le cas des esters **52** ($\Delta T_m=10.1^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.19\mu\text{M}$) et **53** ($\Delta T_m=13.2^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.33\mu\text{M}$), par rapport aux composés **34** ($\Delta T_m=9.7^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.15\mu\text{M}$) et **35** ($\Delta T_m=11.6^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.30\mu\text{M}$) respectivement. En effet, si l'on observe une légère augmentation de l'affinité des composés, les activités sur le test intracellulaire sont du même ordre de grandeur avec la fonction amide ou sulfonamide.

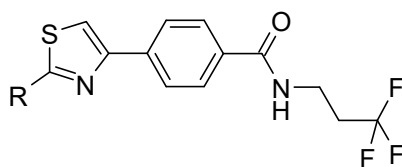
Néanmoins, dans tous les cas, le remplacement de la fonction sulfonamide par une fonction amide permet d'améliorer l'efficacité des ligands.

Les résultats biologiques des composés **47** à **58** sont présentés dans le Tableau 25.

L'introduction directe des fonctions esters sur le cycle thiazole (**54**, $\Delta T_m=9.6^\circ\text{C}$, $EC_{50}>2.5\mu\text{M}$ et **55**, $\Delta T_m=8.2^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.73\mu\text{M}$) entraîne à la fois une baisse d'affinité pour la protéine et une perte d'activité dans le test intracellulaire par rapport aux esters **52** et **53**. Le composé **56** ne portant pas de substituant en position 2 du thiazole, possède également une affinité beaucoup plus faible ($\Delta T_m=8.1^\circ\text{C}$) mais conserve néanmoins une activité intracellulaire et une efficacité acceptables ($EC_{50}=0.36\mu\text{M}$, $LE=0.45$).

Le composé **49** ($\Delta T_m=12.6^\circ\text{C}$, $EC_{50}<0.040\mu\text{M}$), issu du raccourcissement de deux chaînons méthyléniques de la chaîne alkyle présente dans le composé **47** ($LE=0.41$), est au moins aussi actif que ce dernier, et s'avère donc plus efficace ($LE>0.43$). Le coefficient LE ne peut pas être calculé car l' EC_{50} n'a pas pu être déterminée dans les conditions du test, le composé étant trop actif.

Enfin, les deux composés possédant un noyau pyridine (**57** : $\Delta T_m=12.6^\circ\text{C}$, $EC_{50}<0.010\mu\text{M}$ et **58** : $\Delta T_m=13.3^\circ\text{C}$, $EC_{50}<0.010\mu\text{M}$) se sont révélés très actifs sur les deux tests. Cependant, un nombre d'atome relativement important a été ajouté par rapport au composé **43** de référence ($\Delta\text{HA}=+5$ et $\Delta\text{HA}=+7$ respectivement). Comme précédemment, l'efficacité ne peut pas être évaluée car les composés sont très actifs et l' EC_{50} ne peut pas être calculée.



Composé	R	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)	HA	LE
43, Réf	H ₃ C →	11.3	0.083	21	0.47
52		10.1	0.19	26	0.36
53		13.2	0.33	27	0.34
54		9.6	>2.5	25	-
55		8.2	0.73	26	0.33
50		9.6	0.041	28	0.37
47		13.0	0.030	26	0.41
49		12.6	< 0.040	24	> 0.43
56	H	8.1	0.36	20	0.45
57		12.6	< 0.010	26	> 0.43
58		13.3	< 0.010	28	> 0.40

Tableau 26 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 47 à 58. LE=1.4*pEC₅₀/HA.

Les composés 47, 49 et 52 ont pu être co-cristallisés avec la protéine EthR.

Le composé **52** se lie à la protéine EthR de manière similaire à son analogue sulfonamide **34** (Figure 123). Comme observé précédemment pour le composé **43**, la fonction amide forme une liaison hydrogène supplémentaire avec l'asparagine 176 et la chaîne trifluoropropyle se positionne différemment afin d'occuper le bas du domaine D1 de manière optimale. Comme nous l'avons constaté pour le composé **34**, la fonction ester du composé **52** ne se lie pas aux domaines D2 ou D2' et interagit uniquement par des contacts hydrophobes avec les résidus de la protéine à la jonction de ces deux domaines.

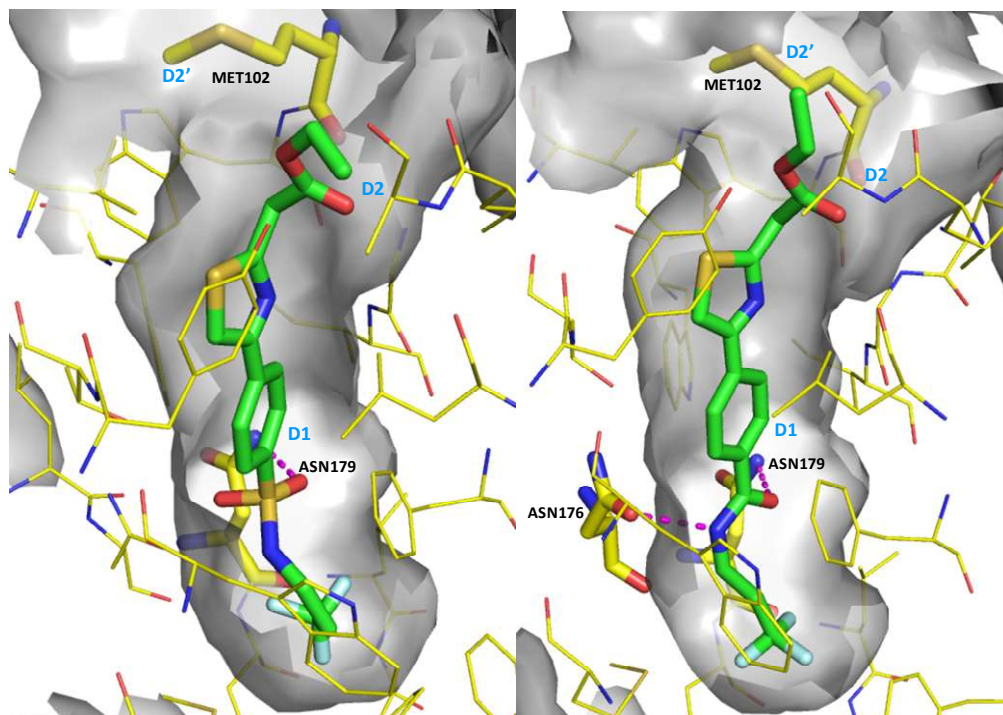


Figure 123 : Comparaison des modes de liaisons des esters 34 (à gauche) et 52 (à droite, résolution 1.9Å) obtenus pas co-cristallisation.

Le fait que le composé **47**, plus hydrophobe, soit plus actif, vient confirmer cette hypothèse. Ce composé a également été co-cristallisé avec la protéine EthR (Figure 124). La chaîne alkyle se positionne de manière identique à la chaîne ester du composé **52** et interagit par contact hydrophobe. Le reste de la molécule se fixe également de manière semblable aux autres composés. Le gain d'affinité observé semble donc causé par des forces hydrophobes de désolvation.

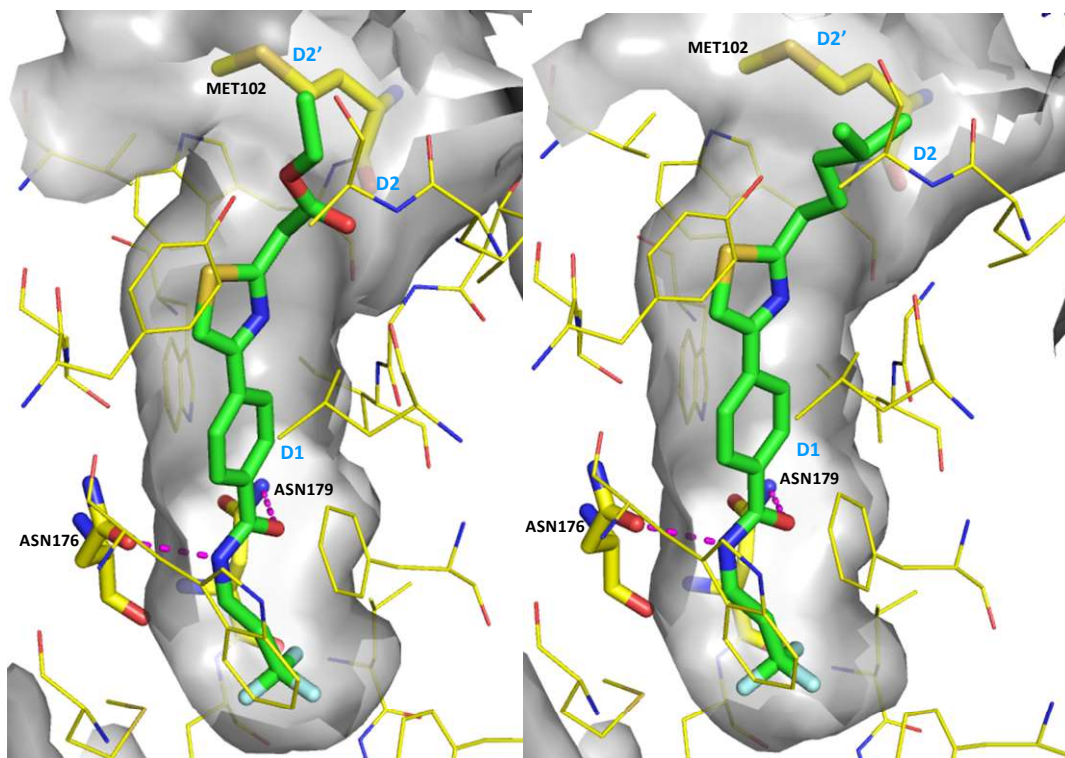


Figure 124 : Comparaison des modes de liaisons de l'ester 52 (à gauche) et du composé 47 (à droite, résolution 1.6Å) obtenus par co-cristallisation.

Le composé **49** s'est révélé aussi affiné pour la protéine et actif sur test intracellulaire que le composé **47** malgré une chaîne alkyle plus courte. On observe cependant dans le mode de liaison du composé **49** que la chaîne isobutyle vient se loger de manière optimale entre la méthionine 102 et la leucine 87, permettant d'expliquer la forte affinité de ce composé pour la protéine EthR (Figure 125).

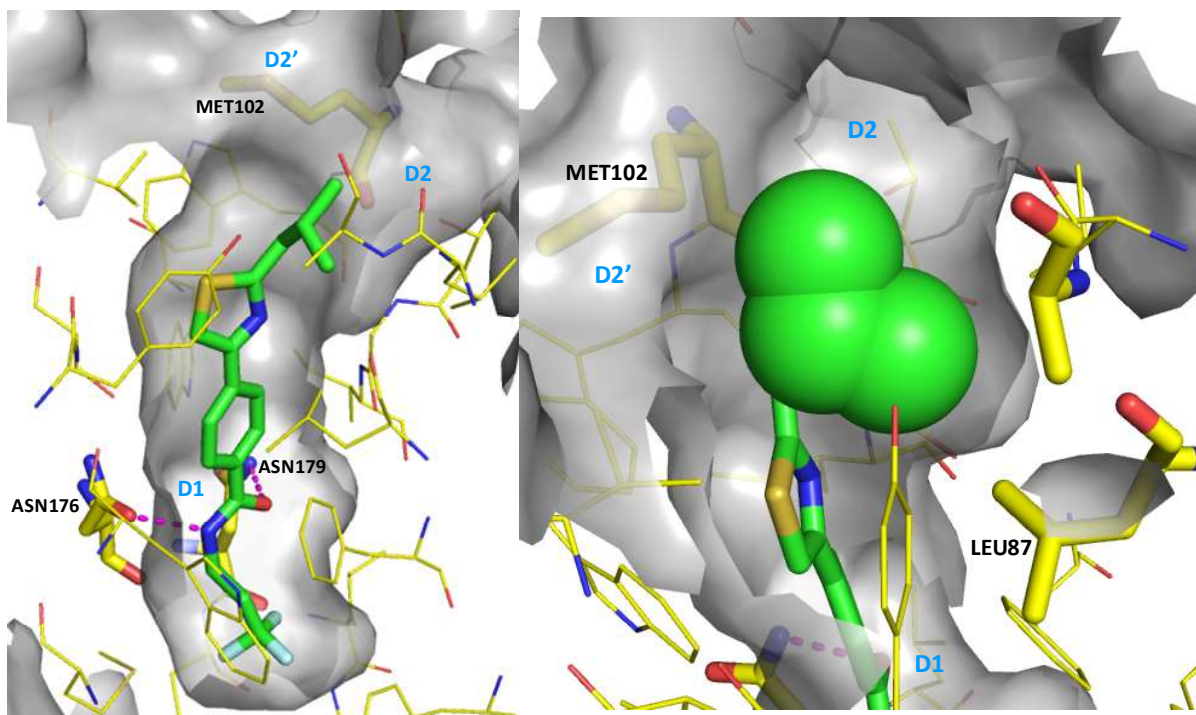
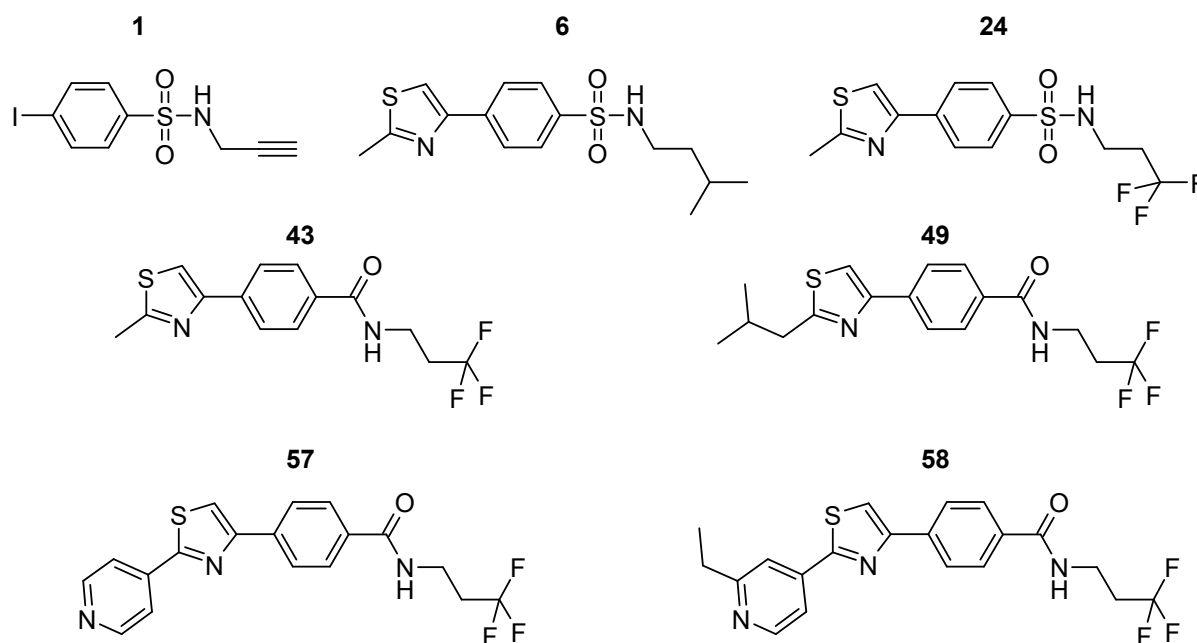


Figure 125 : Mode de liaison du composé 49 à la protéine EthR obtenu par co-cristallisation (résolution 1.8Å).

III.3.4 Conclusion

Un grand nombre de composés synthétisés (**47**, **49**, **50**, **57** et **58**) se sont révélés plus actifs que le composé **43** de référence. Comme précédemment (II.3.2), certains composés (**47** et **50**) présentent néanmoins une efficacité faible tandis que les composés **49**, **57** et **58** conservent de bons coefficients d'efficacité. Leur IC_{50} , leur solubilité et leur LogD ont donc été mesurés (Tableau 27). Ces composés sont actuellement testés dans des gammes de concentration plus faibles afin de déterminer les valeurs exactes des EC_{50} . Leurs valeurs d' IC_{50} sur le test de RPS seront également mesurées.



Composé	ΔT_m (°C)	EC_{50} (μM)	HA	LE	IC_{50} (μM)	Solubilité (μM)	LogD	LLE_{AT}
1	0.1	>20	14	-	160	> 200	2.26	-
6	6.1	5.7	21	0.35	4.9 ± 0.2	20	3.55	0.21
24	8.5	0.29	22	0.42	0.55 ± 0.02	41.4	3.12	0.30
43	11.4	0.083	21	0.47	0.48 ± 0.06	46.9	2.82	0.36
49	12.6	<0.040	24	>0.43	0.44 ± 0.01	4.4	3.91	>0.29
57	12.6	<0.010	26	>0.43	n.t.	29	3.07	>0.35
58	13.3	<0.010	28	>0.40	n.t.	3.3	3.95	>0.29

Tableau 27 : Comparaisons des activités et propriétés des composés 49, 57 et 58 avec les précédents composés de référence.

Les composés **49** (solubilité=4.4 μM , LogD=3.91) et **58** (solubilité=3.3 μM , LogD=3.95) possèdent une solubilité dix fois plus faible et un LogD augmenté d'une unité par rapport au composé **43**. Seul le composé **57** (solubilité=29 μM , LogD=3.07) conserve des propriétés physico-chimiques équivalentes au composé **43**.

La mesure exacte des valeurs d' EC_{50} permettra de calculer les coefficients LE et LLE_{AT} de chaque composé, afin de déterminer notamment si le composé **57** peut être considéré comme plus intéressant que le composé **43** malgré un nombre d'atomes lourds plus important.

La stabilité microsomale, principal point faible du composé **43** de référence, a été évaluée pour les composés **49** et **57** (Tableau 28). Malheureusement, ni le composé **49** ($t_{1/2}=11\text{min}$) ni le composé **57** ($t_{1/2} = 17\text{min}$) n'ont montré d'amélioration significative de la stabilité par rapport au composé **43**.

Composé	$t_{1/2}$ (min)	Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)
43	10	144
49	11	127
57	17	135

Tableau 28 : Résultats de l'étude de stabilité métabolique des composés 49 et 57.

Lors de la troisième phase d'optimisation, des modifications au niveau du cycle thiazole et du cycle phényle ont été réalisées.

IV Troisième phase d'optimisation

IV.1 Modification de la position 5 du cycle thiazole

IV.1.1 Stratégie d'optimisation de la stabilité des analogues thiazole

Le composé **43** ainsi que les dérivés **49** et **57** présentent une stabilité microsomale très faible ($t_{1/2} < 20$ min, $Cl_{int} > 100$ $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$). Tous ces composés ont en commun le cycle thiazole, qui est connu pour être métabolisé par les cytochromes P450 notamment.²⁴³ Le principal mécanisme d'oxydation pour les hétérocycles de types « azoles » à cinq chaînons consiste en une oxydation de la double liaison entre les positions 4 et 5 pour former un époxyde puis un dihydrodiol conduisant à l'ouverture du cycle thiazole libérant ainsi un métabolite α -dicarboxylé très électrophile, et un métabolite thioamide qui peut par la suite subir une S-oxydation donnant lieu à un acide sulfénique ou sulfonique, électrophile, capable d'oxyder ou de former des adduits avec de nombreuses macromolécules ou le GSH^{244,245,246} (Figure 126). Le cycle thiazole peut également subir une oxydation de la position 5 uniquement si elle n'est pas substituée.

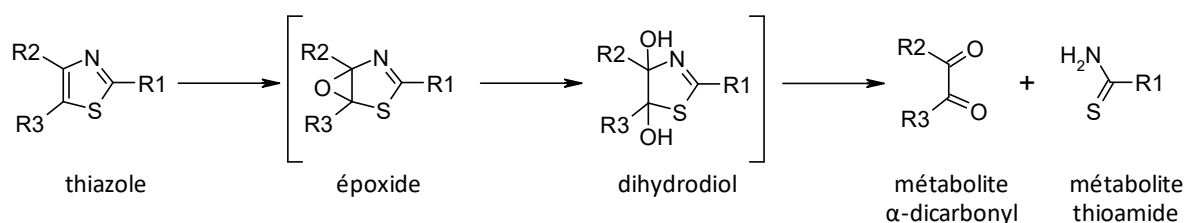


Figure 126 : Mécanisme d'ouverture du cycle thiazole par oxydation selon Dalvie *et al.*²⁴³

²⁴³ D. K. Dalvie, *et al.*, *Chemical Research in Toxicology* **2002**, 15 (3), 269-299.

²⁴⁴ T. Mizutani, *et al.*, *Drug Metabolism and Disposition* **1994**, 22 (5), 750-755.

²⁴⁵ T. Mizutani, *et al.*, *Toxicology Letters* **1996**, 85 (2), 101-105.

²⁴⁶ G. J. Stevens, *et al.*, *Chemical Research in Toxicology* **1997**, 10 (7), 733-741.

A ce stade de l'optimisation, aucun substituant n'a encore été introduit en position 5 du cycle thiazole. Ainsi, afin éventuellement de limiter le phénomène d'oxydation et d'élargir les relations structure-activité, nous avons envisagé l'introduction d'un atome de fluor ou de chlore dans cette position.

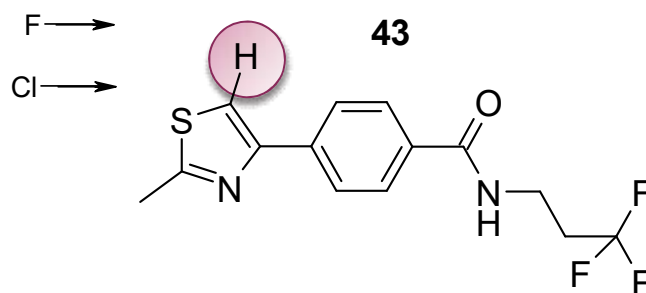


Figure 127 : Modifications du substituant en position 5 du cycle thiazole : analogues du composé 43.

IV.1.2 Synthèses

L'analogue fluoré **62** peut être obtenu à partir de la bromocétone **46** selon deux voies de synthèse (Figure 128). La voie de synthèse A, en deux étapes, consiste en une fluoration directe et sélective de la position 5 du cycle thiazole du composé **43**. La voie de synthèse B, en trois étapes, passe par la condensation d'une α -bromofluorocétone (**61**) condensée avec un thioamide pour former le cycle thiazole. Bien que faisant intervenir une étape supplémentaire, la voie de synthèse B a tout d'abord été mise en œuvre pour deux raisons :

- La réaction de fluoration dans la voie de synthèse A est décrite avec de très faibles rendements dans la littérature.
- La voie de synthèse B permet l'introduction d'une plus grande diversité, en dernière étape, par condensation de la bromofluorocétone avec différents thioamides.

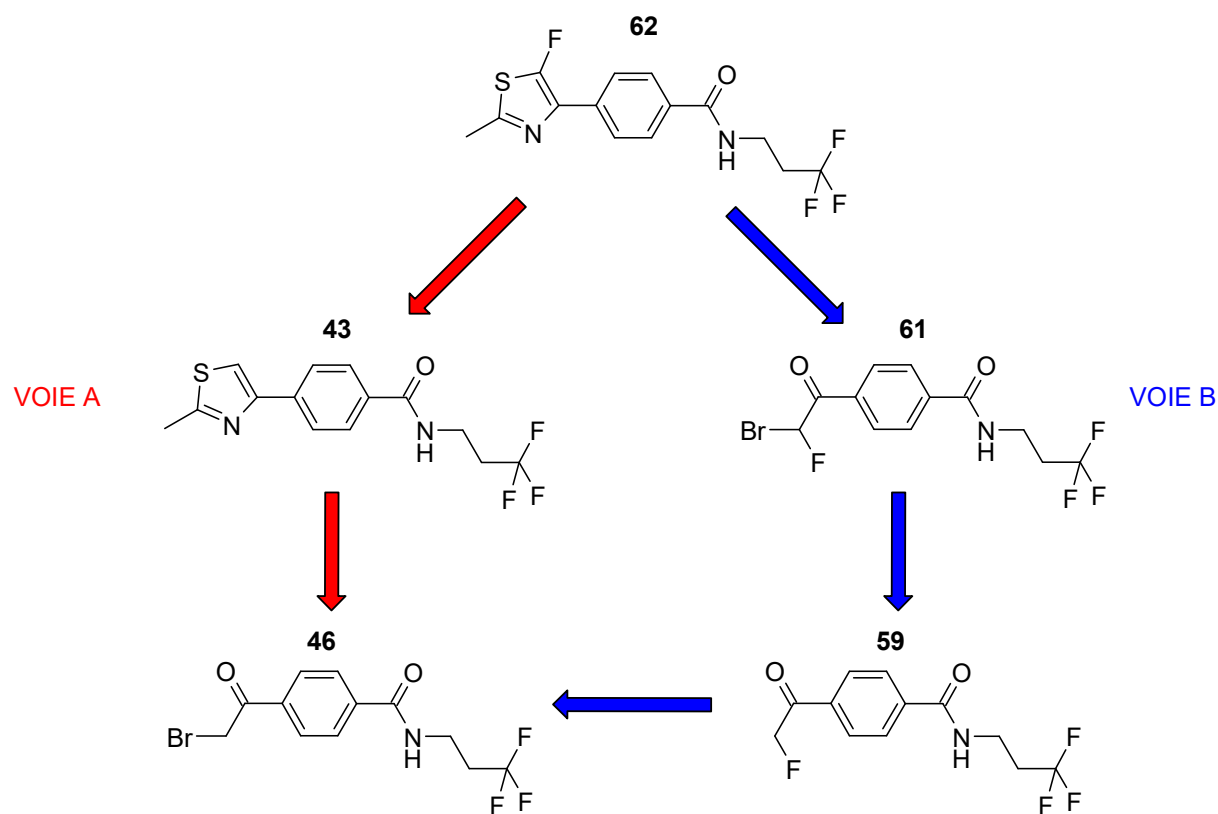


Figure 128 : Schéma de rétrosynthèse du composé **62** à partir du composé **46**.

La préparation de la fluorocétone **59** a été réalisée de manière quantitative à partir de la bromocétone **46** en présence de KF et d'éther 18-couronne-6 dans l'acétonitrile à reflux (Figure 129).²⁴⁷

²⁴⁷ C. Bolea, 2010, WO/2010/079239.

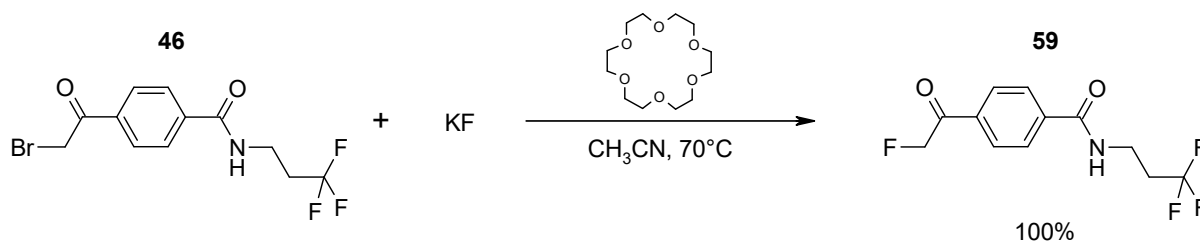


Figure 129 : Schéma de synthèse de la fluorocétone **59**.

L'analyse RMN du composé **59** montre la présence à hauteur d'environ 30% de la cétone non bromée **45**, provenant essentiellement d'une conversion incomplète lors de la formation du composé **46**. Le mélange n'a pas été purifié à ce stade car les deux composés sont difficilement séparables et la cétone **45** ne peut a priori en rien gêner la suite de la synthèse.

Lors de cette réaction, la bromocétone **46** doit être ajoutée par un goutte-à-goutte très lent à une solution de KF et d'éther couronne dans l'acétonitrile à reflux, afin d'éviter la formation majoritaire du composé **60** (Figure 130).²⁴⁸

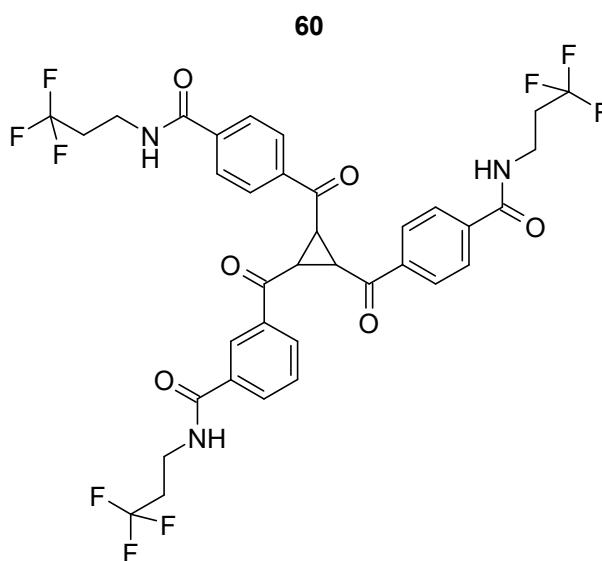


Figure 130 : Structure du produit secondaire **60** pouvant être obtenu lors de la préparation de la fluorocétone **59**.

L'étape suivante est la bromation de la fluorocétone **59** (Figure 131). Les conditions utilisées précédemment pour la bromation des méthylcétone (tribromure de triméthylphénylammonium dans un mélange DCE 5/2 méthanol) n'ont donné aucune conversion du composé de départ (Tableau 29, entrée 1). Les conditions décrites par Bolea *et al.*²⁴⁷ utilisant du CuBr₂ dans l'acétate d'éthyle n'ont également donné aucune conversion de la fluorocétone (Tableau 29, entrée 2).

²⁴⁸ E. Fuglseth, *et al.*, *Tetrahedron* **2008**, *64* (30-31), 7318-7323.

Cependant, une conversion totale a pu être obtenue en ajoutant du tribromure de triméthylphénylammonium aux conditions précédentes (Tableau 29, entrée 3). Dans ces conditions de réaction, la cétone non bromée présente comme impureté au sein du composé **59** est totalement convertie en cétone dibromée, usuellement non réactive dans les réactions de cyclisation avec des thioamides, et facilement séparable une fois le cycle thiazole formé.

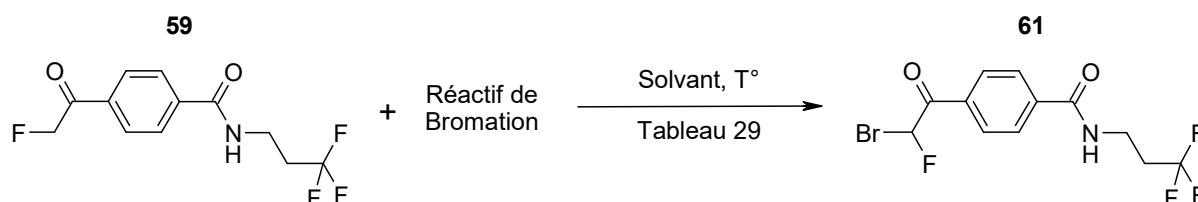


Figure 131 : Schéma de synthèse du composé 61.

Entrée	Réactif de bromation	Solvant	Température	Temps de réaction	Résultat
1	Tribromure de triméthylphénylammonium	DCE 5/2/ MeOH	50°C	1h	Aucune conversion
2	CuBr ₂	AcOEt	90°C	1h30	Aucune conversion
3	Tribromure de triméthylphénylammonium + CuBr ₂	AcOEt	90°C	4h	Conversion totale

Tableau 29 : Conditions pour la bromation du composé 59.

La bromofluorocétone **61** est alors mise en réaction avec le thioacétamide dans le THF à reflux afin de former le cycle thiazole (Figure 132). Dans ces conditions la conversion du composé **61** de départ est complète mais aucune trace du thiazole **62** fluoré en position 5 n'est observé, seul le composé **43** ne portant pas l'atome de fluor semble avoir été formé.

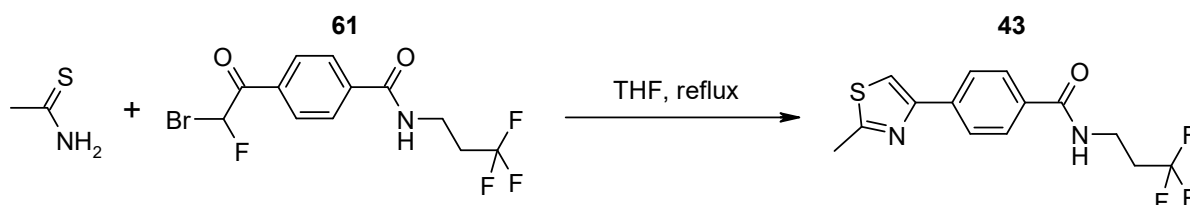


Figure 132 : Schéma de la réaction entre le thioacétamide et le composé 61.

Nous avons alors envisagé la synthèse du composé **62** par la voie de synthèse A présentée précédemment (Figure 128). La fluoration directe des cycles aromatiques se fait non pas à l'aide de réactifs sources de fluor nucléophile comme le DAST (Figure 133), mais grâce à des réactifs

possédant des atomes de fluor électrophiles. Les réactifs les plus récemment développés dans cette famille sont le Selectfluor et l'Accufluor. Ils possèdent tous deux des atomes de fluor portés par une fonction ammonium (Figure 133), ce qui les rend très électrophiles.²⁴⁹ Néanmoins, le mécanisme exact de ces réactifs de fluoration reste encore mal connu.

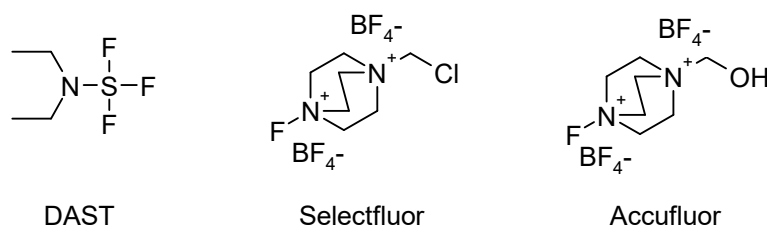


Figure 133 : Structure de trois réactifs de fluoration : le DAST, le Selectfluor et l'Accufluor.

Le composé **43** est mis en contact avec du Selectfluor (Figure 133) à 0°C dans le DMF. Le milieu réactionnel est alors ensuite réchauffé progressivement jusqu'à la température ambiante. Une solution d'ammoniaque 2M dans l'éthanol est ensuite ajoutée. Le produit fluoré **62** est alors obtenu avec un rendement de 16% après purification (Figure 134).

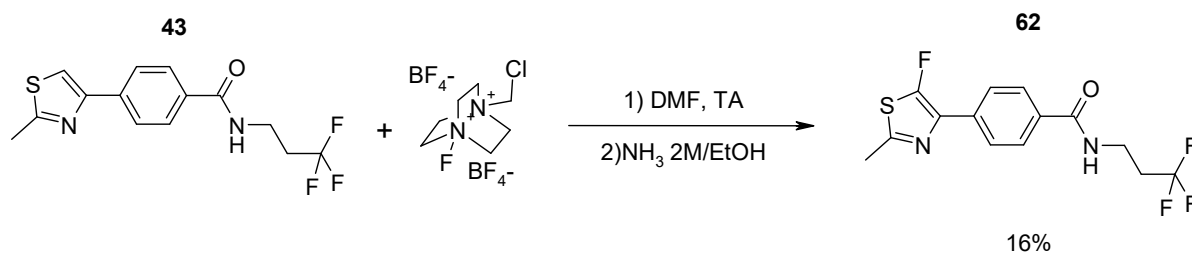


Figure 134 : Schéma de synthèse du composé **62**.

L'analogue chloré **64** est obtenu à partir de l'acide 4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzoïque qui est tout d'abord mis en réaction en présence de SOCl_2 pour donner le chlorure d'acide **63**, chloré sur la position 5 du cycle thiazole. Ce chlorure d'acide n'est pas isolé et il est mis directement en réaction avec le chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine en présence de DIEA afin de donner le composé **64** avec un rendement global de 29% (Figure 135).

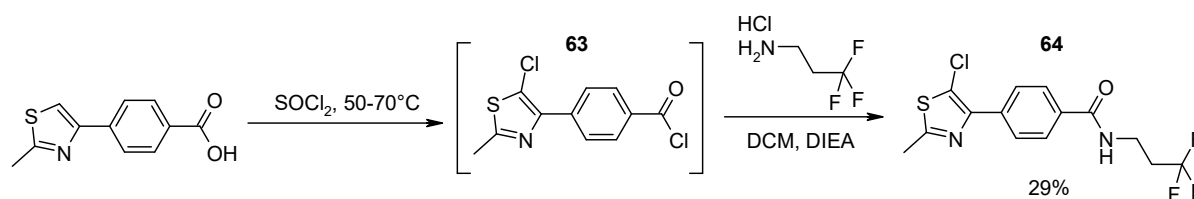


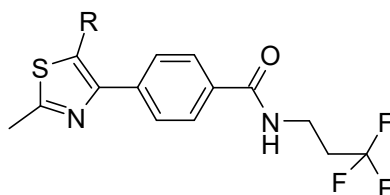
Figure 135 : Schéma de synthèse du composé **64**.

²⁴⁹ N. Paul T., et al., *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 192-212.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 30.

IV.1.3 Résultats et discussion

Le test de potentialisation de l'activité de l'éthionamide peut être réalisé soit sur macrophages infectés par *M. tuberculosis* soit directement sur le pathogène seul. Pour le composé fluoré **62** ainsi que pour d'autres composés qui vont suivre dans la stratégie d'optimisation « growing », les valeurs d' EC_{50} présentées ont été mesurées sur *M. tuberculosis* en absence de macrophages, pour des raisons techniques. Le composé **43** de référence a également été testé dans ces conditions afin d'avoir un point de comparaison. Pour ces composés, l'évaluation sur macrophages infectés est actuellement en cours de réalisation.



Composé	R	ΔT_m (°C)	EC_{50} (μM) _{bact}	EC_{50} (μM) _{macro}	HA	LE
43, Réf	H	11.3	0.058	0.083	21	0.47
62	F	n.t.	0.055	n.t.	22	0.46
64	Cl	8.7	n.t.	0.35	22	0.41

Tableau 30 : Résultats biologiques obtenus pour les composés **62** et **64**. $LE=1,4 \cdot pEC_{50}/HA$.

L'introduction d'un atome de fluor en position 5 du cycle thiazole (composé **62**, $EC_{50}=0.055 \mu M$) ne modifie pas l'activité par rapport au composé de référence (composé **43**, $EC_{50}=0.058 \mu M$, $\Delta T_m=11.3^\circ C$). L'ajout de cet atome lourd entraîne une légère chute de l'efficacité (0.47 contre 0.46). En revanche, l'introduction d'un atome de chlore plus volumineux en cette position (composé **64**, $\Delta T_m=8.7^\circ C$, $EC_{50}=0.35 \mu M$) conduit à la fois à une perte d'affinité pour la protéine ($\Delta(\Delta T_m)=-2.6^\circ C$) ainsi qu'à une diminution de l'activité cellulaire d'un facteur quatre.

La structure cristallographique de la protéine EthR obtenue avec le composé **43** indique que le cycle thiazole occupe un tunnel très étroit (Figure 136). On peut alors supposer que la différence d'activité observée entre le composé fluoré **62** et chloré **64** en position 5 du thiazole est attribuable à un effet de gêne stérique.

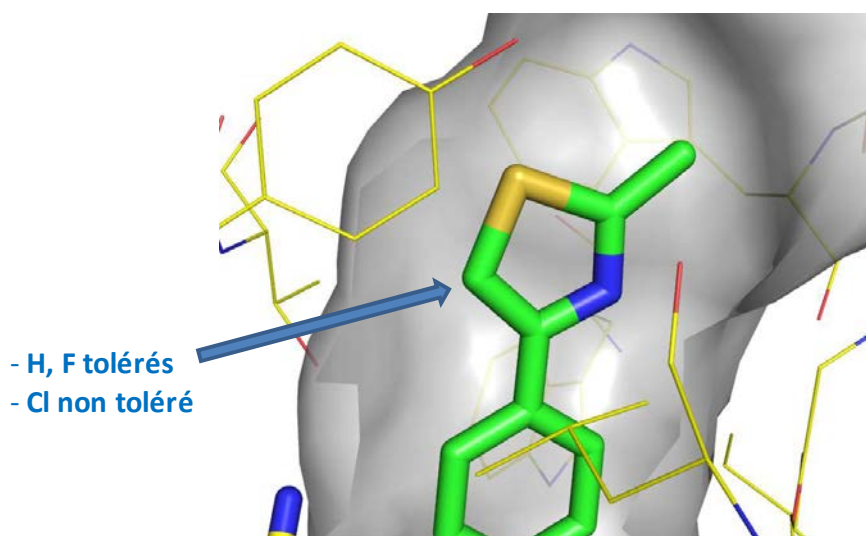


Figure 136 : Mode de liaison du composé 43 à la protéine EthR obtenu par co-cristallisation.
Agrandissement sur le cycle thiazole du composé 43.

IV.1.4 Conclusion

Nous avons postulé précédemment que l'introduction d'halogènes en position 5 du cycle thiazole pouvait potentiellement permettre d'améliorer la stabilité microsomale de nos composés. Ainsi, le composé fluoré **62** s'étant montré aussi actif que le composé de référence, sa stabilité microsomale a également été évaluée (Tableau 31). Cependant, ce composé s'est révélé encore moins stable ($t_{1/2} = 1.5\text{min}$) que le composé de référence ($t_{1/2}=10\text{min}$).

Composé	$t_{1/2}$ (min)	Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)
43	10	144
62	1.5	606

Tableau 31 : Résultats de l'étude de stabilité métabolique avec le composé 62.

D'autres modifications ont donc été envisagées afin de compléter les relations structure-activité et d'essayer d'augmenter la stabilité microsomale.

IV.2 Modification du cycle phényle

IV.2.1 Stratégie

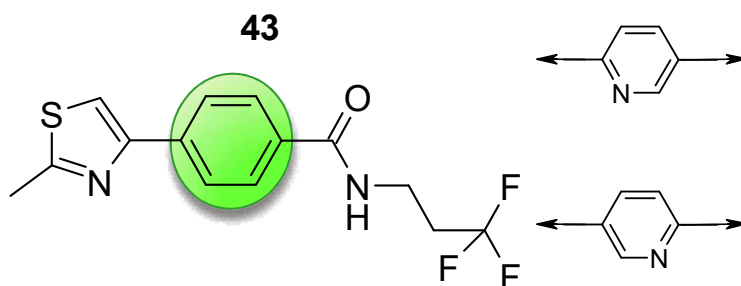
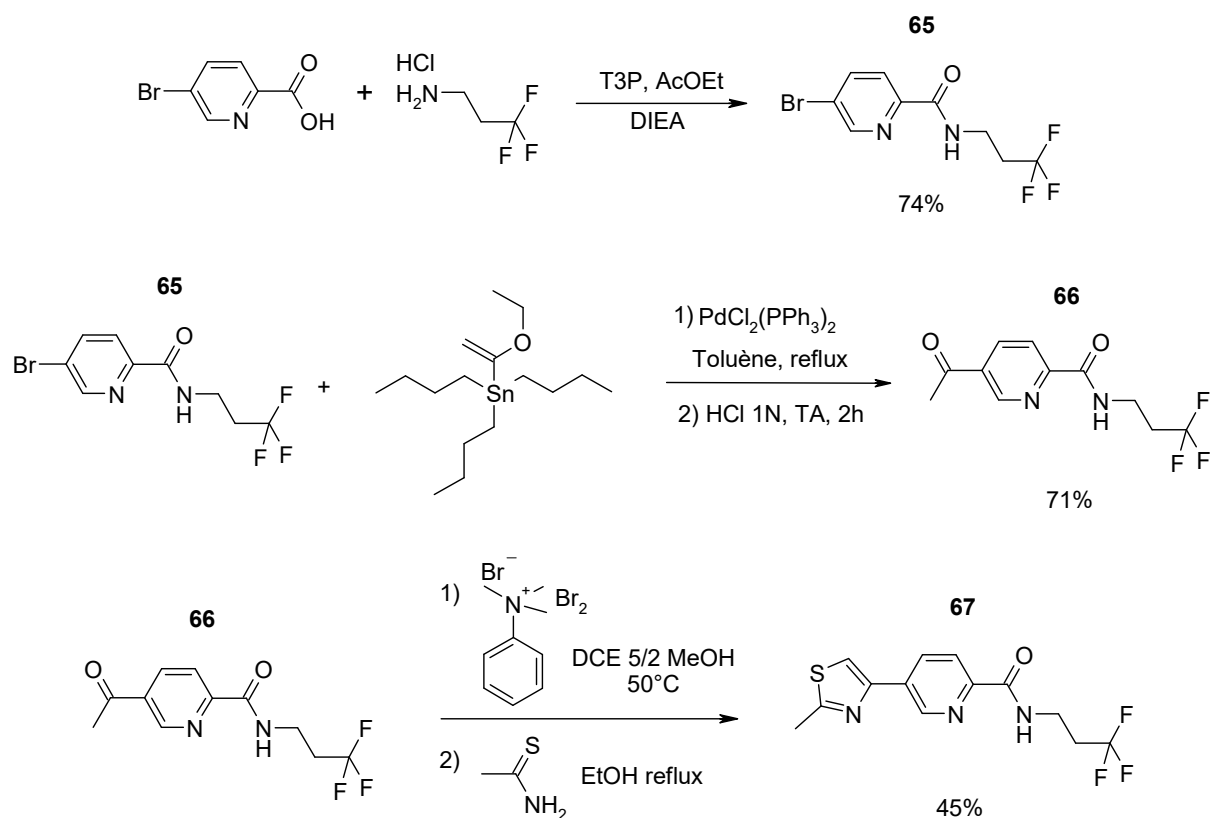


Figure 137 : Modifications du cycle phényle : analogues du composé 43.

Tous les composés présentés jusqu'à présent partagent le même cycle aromatique central. Nous avons donc tenté de remplacer le cycle phényle par un cycle pyridine.

IV.2.2 Synthèses

La synthèse de l'analogue **67** possédant le cycle thiazole en position 5 du cycle pyridine a été obtenu en quatre étapes à partir de l'acide 5-bromopicolinique (Figure 138). Un couplage avec la trifluoropropylamine en présence de T3P et de DIEA dans l'acétate d'éthyle a tout d'abord permis d'obtenir l'amide **65** avec un rendement de 74%.

Figure 138 : Schéma de synthèse du composé **67**.

Ce composé a ensuite été engagé dans une réaction de Stille avec du tributyl(1-ethoxyvinyl)stanneux en présence de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ dans le toluène à reflux.²⁵⁰ L'hydrolyse acide du milieu réactionnel a permis l'obtention de la méthylcétone **66** avec un rendement de 71%.

Le composé a enfin été bromé puis cyclisé avec le thioacétamide dans les conditions déjà décrites précédemment. Le composé **67** a été obtenu avec un rendement de 45% sur les deux dernières étapes. Ce rendement relativement faible par rapport à ceux obtenus jusqu'alors sur ce type de réaction s'explique par la très faible réactivité de la fonction cétone portée par le composé **66** lors de l'étape de bromation.

Le mécanisme de la réaction de Stille est présenté en Figure 139. La première étape de la réaction de Stille consiste en une addition oxydante du dérivé halogéné sur le palladium au degré d'oxydation 0. Le dérivé stanneux effectue ensuite une étape de transmétallation au cours de laquelle le groupement R' est échangé avec l'atome d'halogène X. Puis, deux étapes successives d'isomérisation et d'élimination réductrice conduisent au composé souhaité (R-R').

²⁵⁰ J.-Y. Legros, *et al.*, *Tetrahedron* **2001**, 57 (13), 2507-2514.

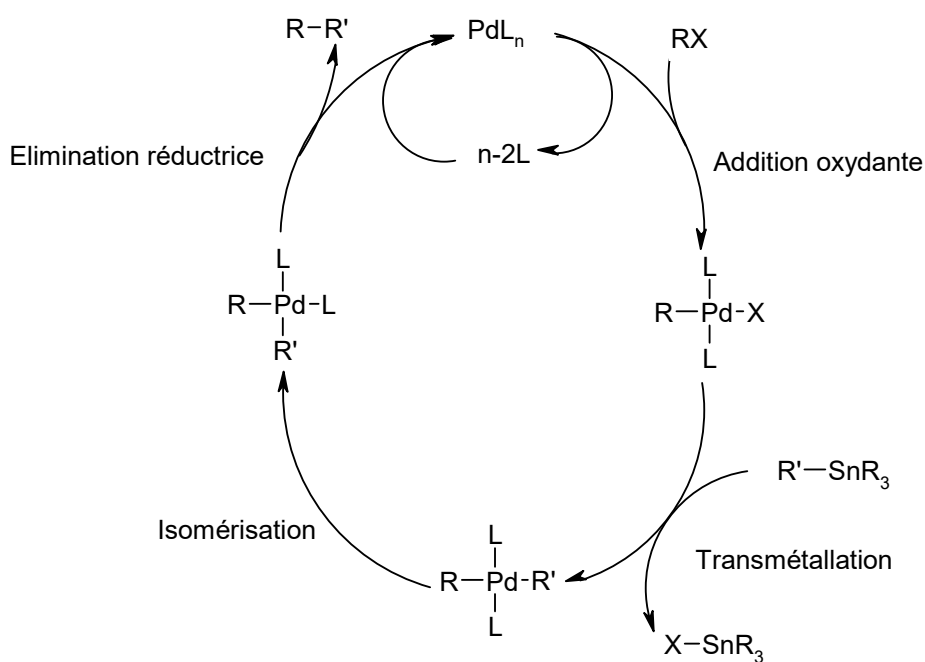


Figure 139 : Mécanisme de la réaction de Stille.²⁵¹

L'analogie **71** possédant le cycle thiazole en position 2 sur la pyridine a également été synthétisé en quatre étapes suivant une stratégie similaire (Figure 140). L'acide 6-chloronicotinique a tout d'abord été couplé avec la 3,3,3-trifluoropropylamine pour donner l'amide **68** avec un rendement de 92% (Figure 140).

²⁵¹ J. K. Stille, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, 25 (6), 508-524.

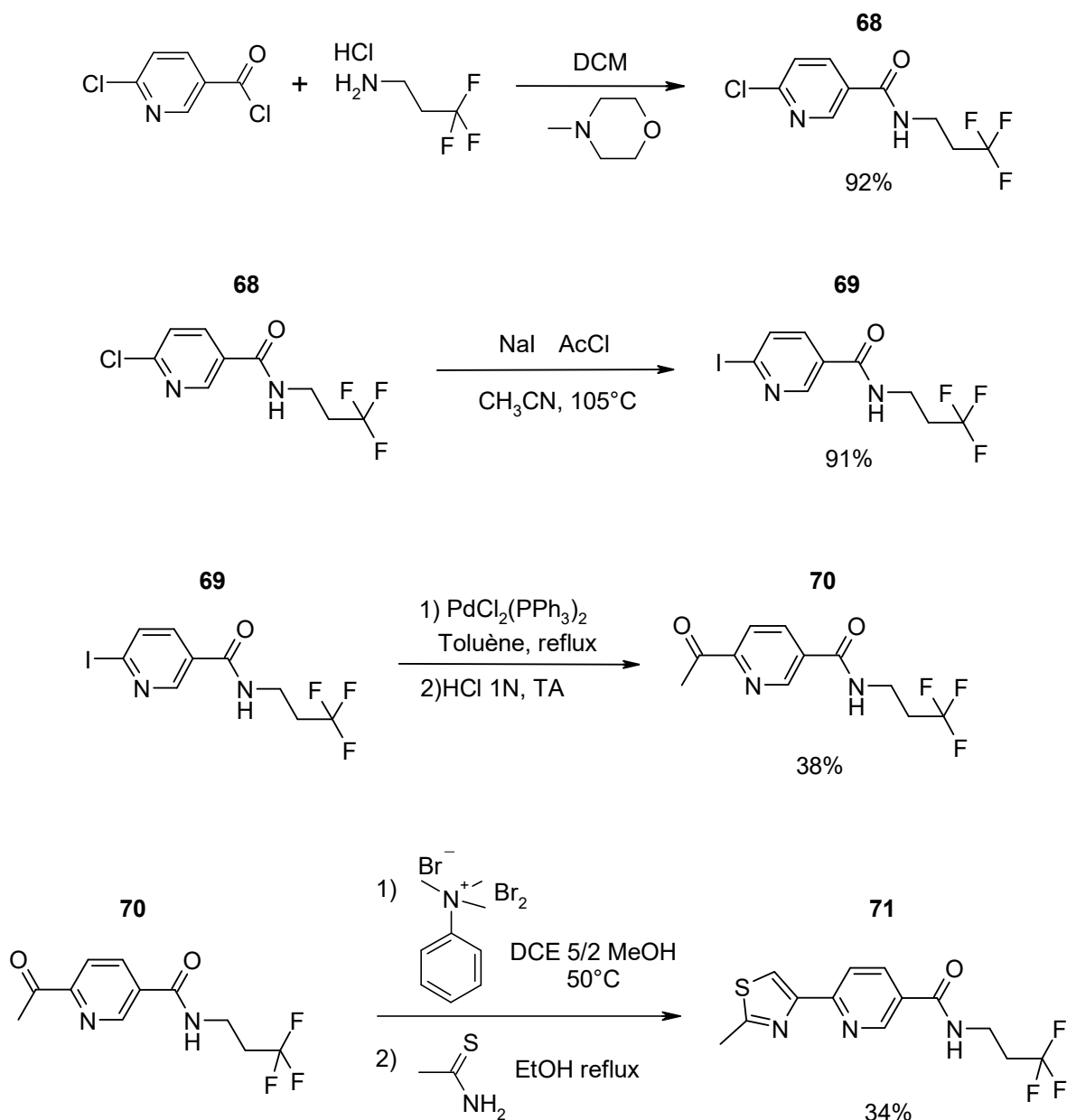


Figure 140 : Schéma de synthèse du composé 71.

Le composé **68** ne réagit pas dans les conditions de la réaction de Stille décrites précédemment.

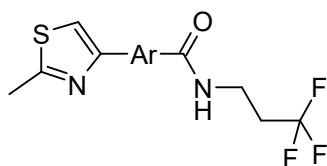
Afin d'augmenter la réactivité, l'atome de chlore a été substitué par un atome d'iode par action de l'iodure de sodium en présence de chlorure d'acide acétique et d'acétonitrile (Figure 140).²⁵² Le dérivé iodé **69** a été obtenu avec un rendement de 91%. Ce composé a ensuite été engagé dans un couplage de Stille pour former la méthylcétone **70** avec un rendement de 38% après hydrolyse par une solution aqueuse d'HCl 1N.

²⁵²H.-Z. Zhang, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48 (16), 5215-5223.

La cétone est ensuite bromée puis cyclisée avec le thioacétamide dans les conditions décrites précédemment. Le thiazole **71** est obtenu avec un rendement de 34% sur les deux étapes. Ici encore le faible rendement s'explique par la faible réactivité du composé **70** lors de l'étape de bromation.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 32.

IV.2.3 Résultats et discussion



Composé	Ar	EC ₅₀ (μM) bact	HA	LE
43 , Réf		0.058	21	0.48
67		0.120	21	0.46
71		1.7	21	0.38

Tableau 32 : Résultats obtenus pour les analogues pyridiniques. LE=1,4* p EC₅₀/HA.

Deux analogues du composé **43** ont été synthétisés en remplaçant le cycle phényle par un cycle pyridine. L'analogue **67** possédant l'atome d'azote en ortho de la fonction amide s'avère deux fois moins actif ($EC_{50}=0.120\mu M$) que le composé de référence **43** ($EC_{50}=0.058\mu M$) et possède donc un coefficient d'efficacité plus faible (0.46 contre 0.48). L'analogue **71** possédant l'atome d'azote en position ortho du cycle thiazole se montre 30 fois moins actif ($EC_{50}=1.7\mu M$) que le composé de référence.

IV.3 Modification de l'hétérocycle thiazole

IV.3.1 Stratégie

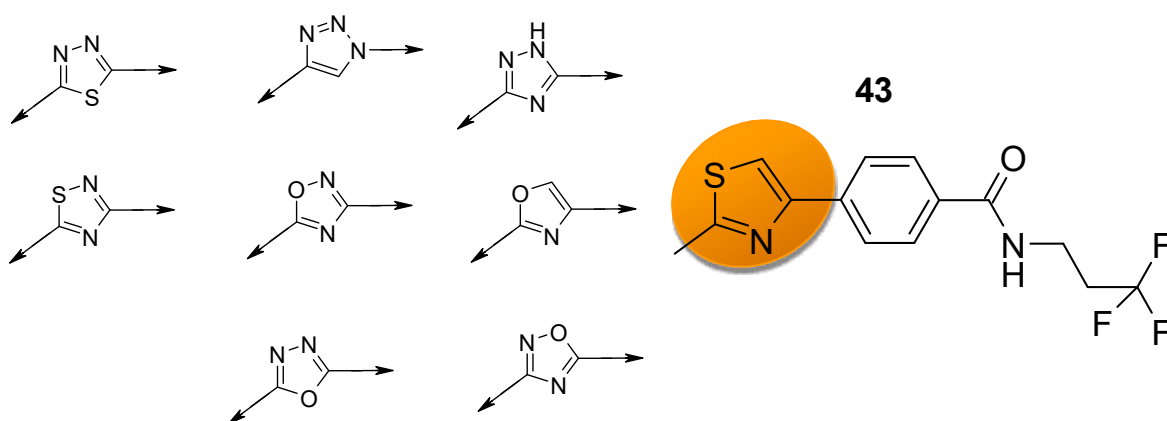


Figure 141 : Modifications du cycle thiazole : analogues du composé 43.

A ce stade de l'optimisation, le seul changement envisagé au niveau du cycle thiazole a été la modification de la position de l'atome de soufre. Nous avons voulu élargir les relations structure-activité au niveau du cycle thiazole en le remplaçant par d'autres hétérocycles à cinq sommets. Des cycles 1,2,3-triazole, 1,2,4-triazole, 1,3-oxazole, 1,2,4-oxadiazole, 1,3,4-oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole, 1,2,4-thiadiazole ont ainsi été synthétisés.

IV.3.2 Synthèses

IV.3.2.1 Synthèse de l'oxazole

La synthèse de l'analogue oxazole **72** a tout d'abord été réalisée dans les conditions de Lee *et al.*²⁵³, sans solvant en réacteur micro-ondes (Figure 143). La première étape de cette synthèse est l'activation de la méthylcétone à l'aide d'un réactif possédant un atome d'iode hypervalent (HTIB ou HDNIB, Figure 142). La seconde étape consiste en la formation du cycle oxazole par condensation de l'intermédiaire précédent avec un carboxamide.

²⁵³ J. C. Lee, *et al.*, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44* (1), 123-125.

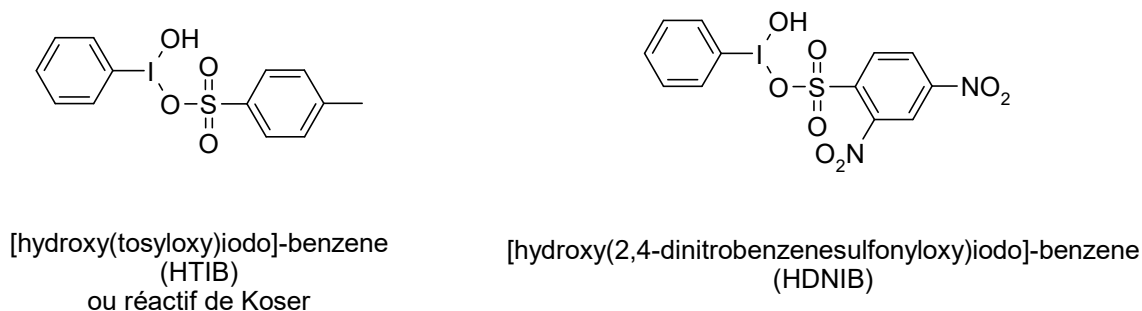
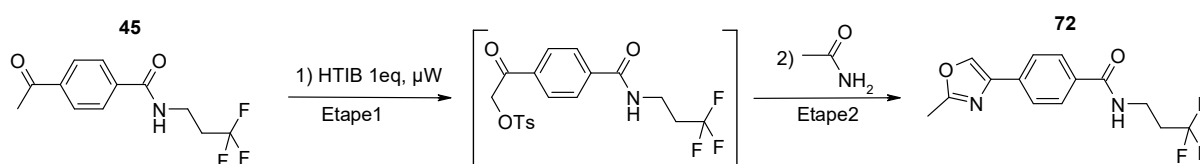


Figure 142 : Structure des réactifs HTIB et HDNIB.

Ainsi, la méthylcétone **45** est mise à réagir avec l'HTIB dans un réacteur à micro-ondes (Figure 143). L'acétamide est ensuite ajouté immédiatement et le milieu réactionnel est remis en réaction. Cependant, les conditions décrites dans cette publication sont appliquées dans un four à micro-ondes domestique et sont donc difficilement reproductibles à l'aide de notre réacteur micro-ondes.

Figure 143 : Schéma de synthèse du composé **72** dans les conditions de Lee *et al.*²⁵³

Lors des différents essais réalisés (Tableau 33), la formation du produit désiré a pu être observée, mais dans chaque cas, le milieu réactionnel s'est avéré très complexe avec la présence de nombreux produits secondaires.

Entrée	Etape	Conditions
1	Etape 1	300W, 150°C, 3min
	Etape 2	150W, 150°C, 1min
2	Etape 1	300W, 100°C, 3min
	Etape 2	150W, 150°C, 1min
3	Etape 1	300W, 100°C, 1min
	Etape 2	150W, 150°C, 1min

Tableau 33 : Conditions essayées pour la formation du cycle oxazole au réacteur micro-ondes.

Nous avons donc envisagé une synthèse du cycle oxazole similaire à celle utilisée pour la synthèse des cycles thiazole précédents, c'est-à-dire par condensation d'une bromocétone et d'un carboxamide. La cyclisation de la bromocétone **46** et de l'acétamide effectuée en réacteur micro-ondes

à 120°C dans le toluène a permis d'obtenir le composé **72** avec un rendement de 77% (Figure 144). La purification a été réalisée à l'aide d'une résine tosyl-hydrazine permettant une élimination facile de toutes les impuretés possédant une fonction cétone.

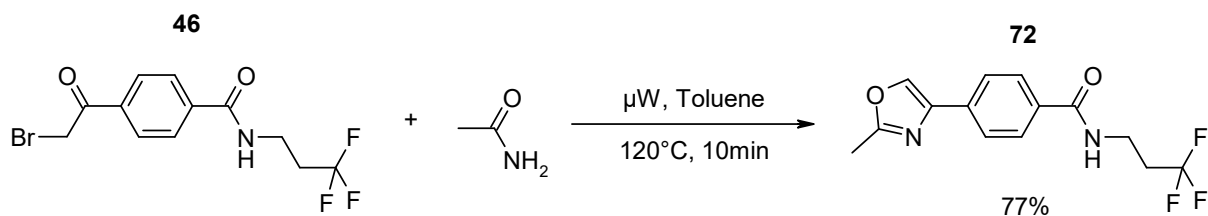


Figure 144 : Schéma de synthèse du composé 72 par condensation d'une bromocétone et d'un carboxamide.

IV.3.2.2 Synthèse des deux analogues 1,2,4-oxadiazole

Les analogues 1,2,4-oxadiazoles **75** et **78** ont été préparés de façon similaire par condensation d'un acide carboxylique et d'un amidoxime.²⁴⁰

La synthèse du composé **75** s'est faite en trois étapes à partir du chlorure d'acide 4-cyanobenzoïque (Figure 145).

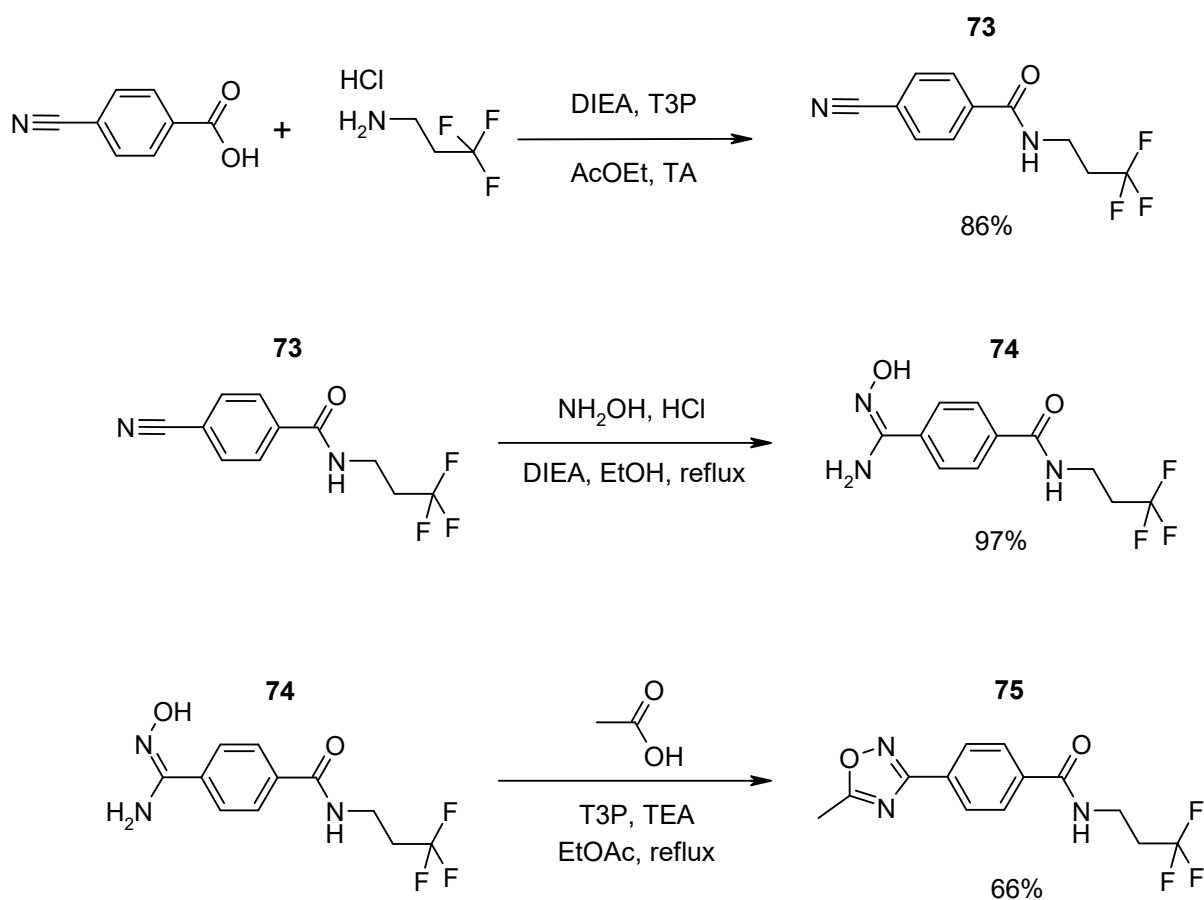


Figure 145 : Schéma de synthèse de l'analogue 1,2,4-oxadiazole **75**.

Le chlorure d'acide 4-cyanobenzoïque a été mis en réaction avec le chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropyamine dans le dichlorométhane en présence de N-méthylmorpholine afin de donner l'intermédiaire **73** avec un rendement de 72%. L'amidoxime **74** a ensuite été formé avec un rendement de 97% par réaction de l'hydroxylamine sur le groupement nitrile. Cette amidoxime a finalement été condensée sur l'acide acétique en présence de T3P et de triéthylamine pour donner l'oxadiazole **75** désiré avec un rendement de 66% (Figure 145).

La synthèse de l'analogue **78** a également été réalisée en trois étapes. La 3,3,3-trifluoropropylamine a tout d'abord été couplée à l'acide 4-(méthoxycarbonyl)benzoïque pour donner le composé **76** avec un rendement de 82%. La fonction ester a ensuite été hydrolysée en acide (**77**) avec un rendement de 89% puis cyclisée avec l'acétamide oxime en présence de T3P et de triéthylamine pour donner l'oxadiazole **78** désiré avec un rendement de 77 % (Figure 146).

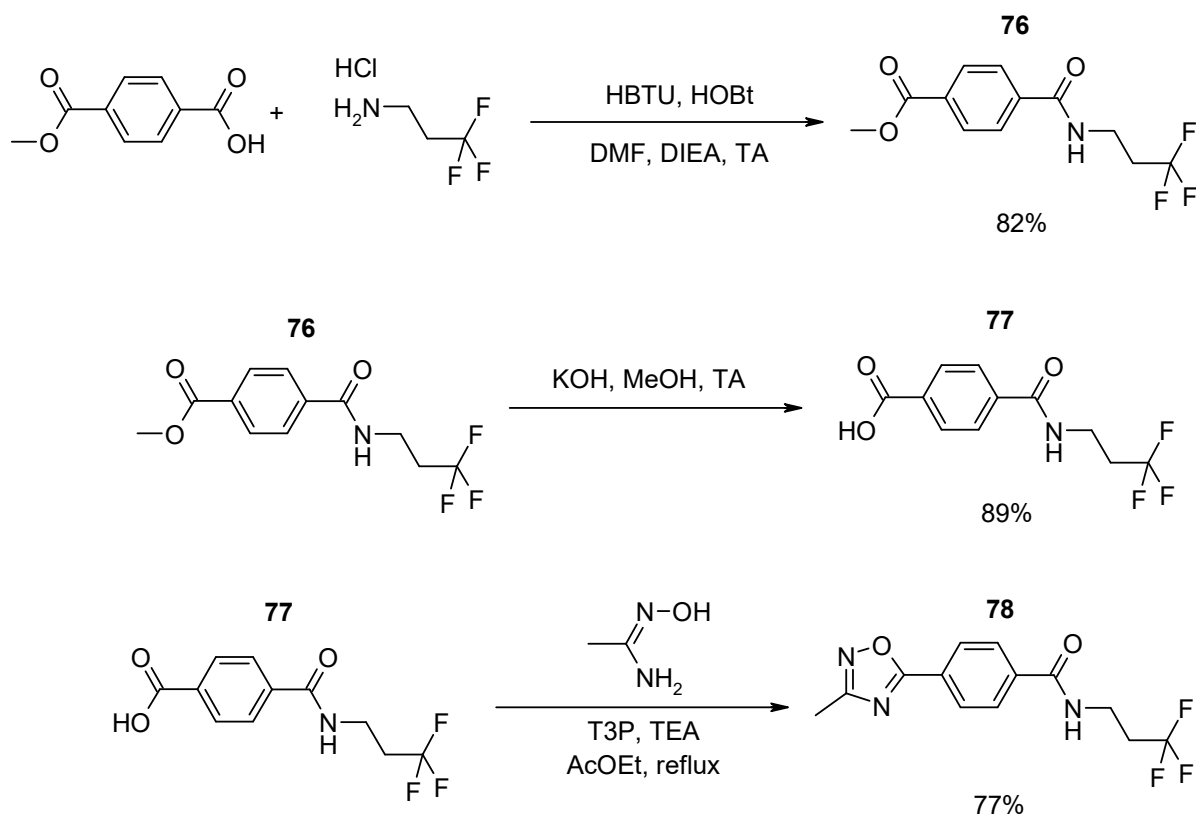


Figure 146 : Schéma de synthèse de l'analogue 1,2,4-oxadiazole **78**.

IV.3.2.3 Synthèse de l'analogue 1,3,4-oxadiazole

La synthèse de l'analogue 1,3,4-oxadiazole **80** a été réalisée par condensation entre un hydrazide et un acide carboxylique. Dans un premier temps, la fonction hydrazide a été introduite sur le cycle phényle par hydrazinolyse du composé **76** dans le méthanol (Figure 157) pour donner le composé **79** avec un rendement de 93%. L'hydrazide a ensuite été mis en réaction avec l'acide acétique en présence de T3P et de triéthylamine. Lors de cette réaction, une forte dégradation du produit de départ a été observée, sans conduire au produit désiré.

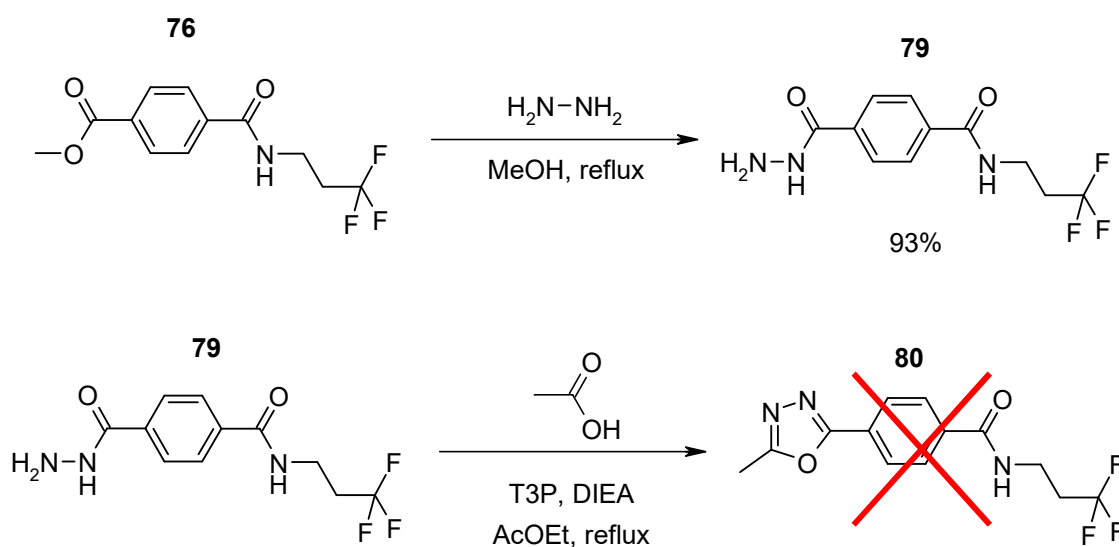


Figure 147 : Schéma de synthèse de l'analogue 1,3,4-oxadiazole **80**.

L'oxadiazole a alors été synthétisé en inversant la position des fonctions hydrazide et acide carboxylique (Figure 148). Dans ces conditions, le composé **80** a pu être obtenu avec un rendement de 90%.

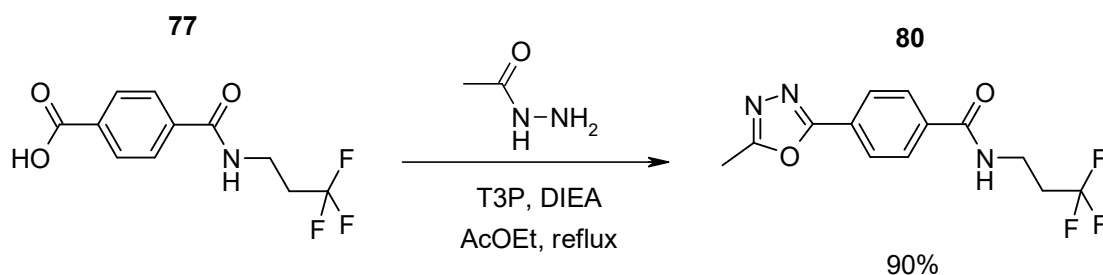
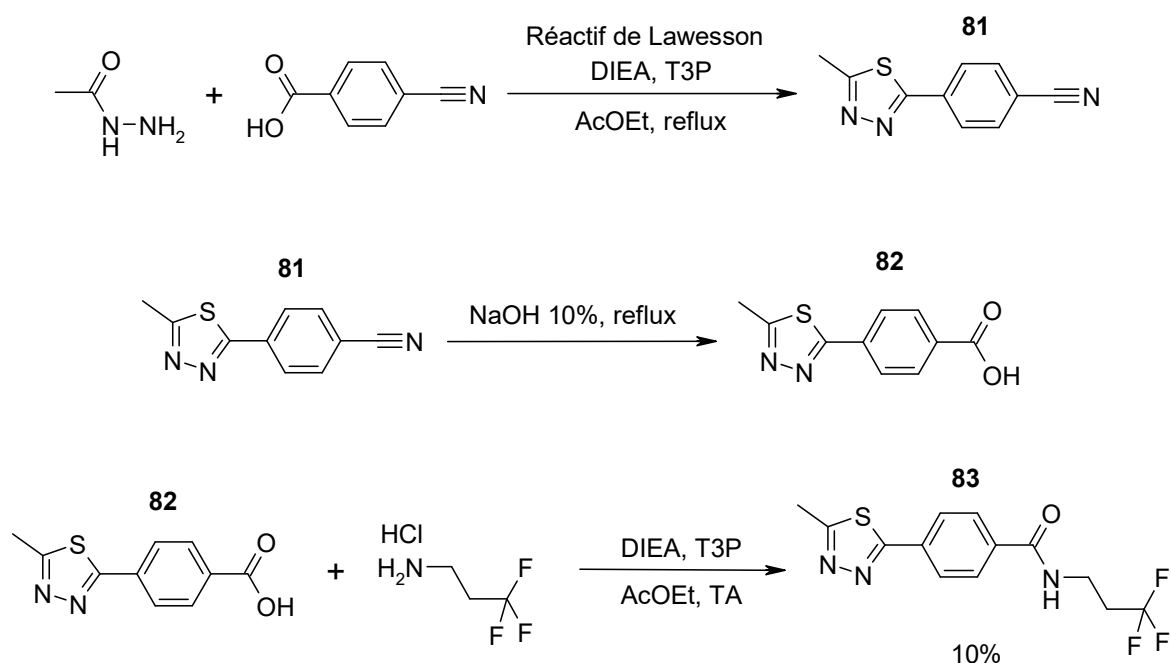


Figure 148 : Schéma de synthèse de l'analogue 1,3,4-oxadiazole **80**.

IV.3.2.4 Synthèse de l'analogue 1,3,4-thiadiazole

Le cycle 1,3,4-thiadiazole peut également être obtenu par condensation d'un hydrazide et d'un acide carboxylique dans les conditions utilisées précédemment pour la synthèse du 1,3,4-oxadiazole, par ajout de réactif de Lawesson au milieu réactionnel.²⁴⁰

Afin d'éviter une éventuelle réaction secondaire de thionation de la fonction amide du composé **77**, la synthèse de l'analogue 1,3,4-thiadiazole a été initiée à partir de l'acide 4-cyanobenzoïque (Figure 149) qui a été condensé avec l'acétohydrazide afin de former le cycle thiadiazole. Le composé **81** ainsi obtenu n'a pas été isolé. Afin d'introduire la chaîne trifluoropropyle, la fonction nitrile a été hydrolysée par une solution de soude à 10% afin de fournir l'acide carboxylique **82** qui a enfin été couplé à la 3,3,3-trifluoropropylamine. Le composé **83** désiré a ainsi pu être obtenu avec un rendement global de 10% sur les trois étapes.



IV.3.2.5 Synthèse des analogues 1,2,4-thiadiazole

La synthèse des cycles 1,2,4-thiadiazole est beaucoup moins décrite dans la littérature que celle des cycles 1,3,4-thiadiazole et repose essentiellement sur l'utilisation du cycle 1,3,4-oxathiazol-2-one (Figure 150). Ce synthon peut être obtenu par condensation du chlorure de chlorothioformyl avec un carboxamide²⁵⁴, lui-même obtenu à partir de l'ester méthylique correspondant.

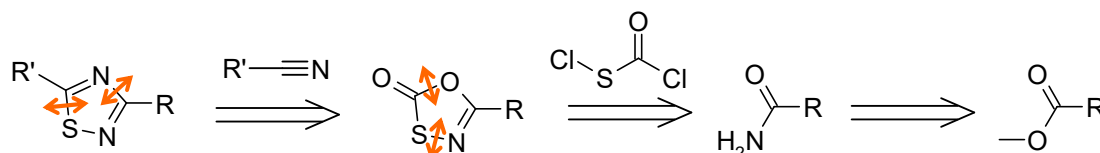


Figure 150 : Schéma de rétrosynthèse envisagé pour la formation du cycle 1,2,4-thiadiazole.

L'étape de formation du cycle 1,2,4-thiadiazole se déroule comme indiquée en Figure 151. Sous l'effet de l'énergie thermique, un processus de décarboxylation s'opère, générant ainsi un dérivé soufré d'oxyde de nitrile et libérant du CO₂. Deux cas de figure se présentent alors :

- en présence d'un dipolarophile, tel qu'un groupement nitrile, cet intermédiaire va se cycliser en 1,2,4-thiadiazole.
- En absence de dipolarophile suffisamment réactif, la perte de soufre va entraîner la formation d'une espèce nitrile, pouvant potentiellement réagir avec l'intermédiaire.

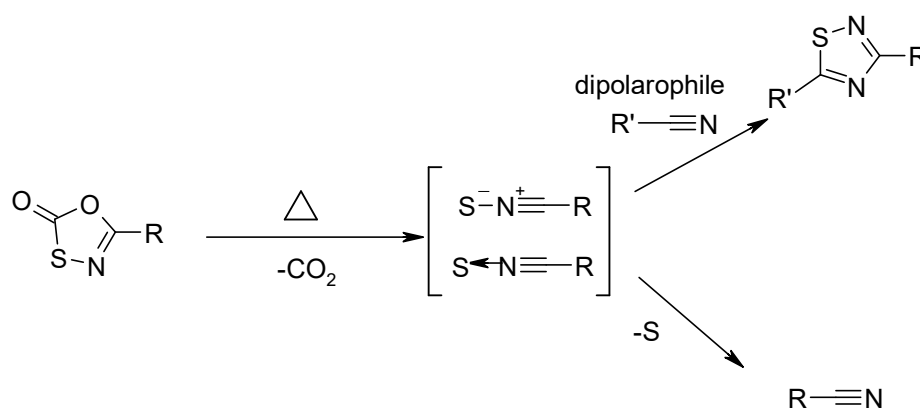


Figure 151 : Réaction du cycle 1,3,4-oxathiazol-2-one en présence d'un réactif possédant une fonction nitrile.

Comme nous venons de le voir dans l'analyse rétrosynthétique (Figure 150), le point de départ pour l'obtention des cycles 1,2,4-thiadiazole est la synthèse du carboxamide à partir de l'ester

²⁵⁴ W. Porcal, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51 (19), 6150-6159.

méthylique. Cependant, aucune conversion de l'esther **76** n'a été observée en présence d'une solution d'ammoniaque dans le méthanol à reflux (Figure 152).

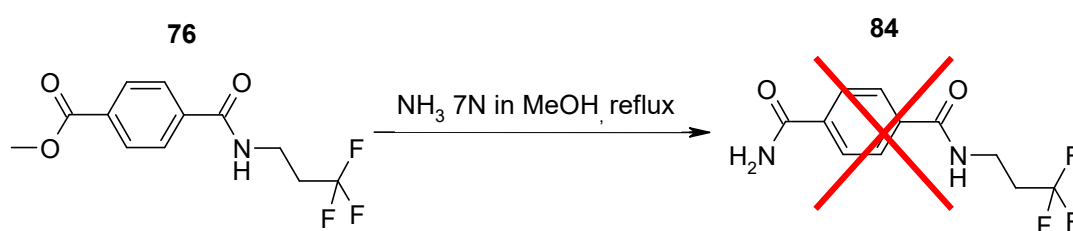


Figure 152 : Schéma de synthèse du composé **84** par aminolyse.

Le composé **84** a alors été synthétisé à partir de l'esther **76** en trois étapes. La fonction ester a tout d'abord été hydrolysée en acide carboxylique en présence de potasse dans un mélange eau/méthanol. Le chlorure d'acide formé ensuite par action du chlorure de thionyle est enfin mis à réagir dans un mélange d'acétonitrile et d'une solution aqueuse d'hydroxide d'ammonium à 28% pour donner le carboxamide **84** avec un rendement global de 61% sur les trois étapes (Figure 153).

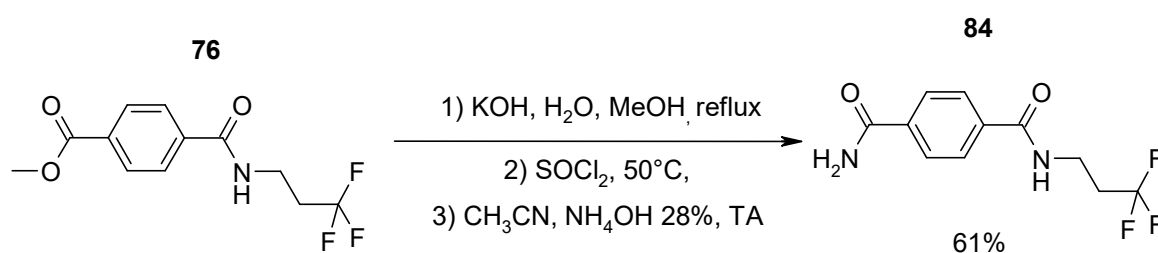


Figure 153 : Schéma de synthèse du composé **84**.

Le carboxamide **84** a ensuite été cyclisé avec le chlorure de (chlorothio)formyl²⁵⁵ pour conduire à la formation du cycle 1,3,4-oxathiazol-2-one (composé **85**) avec un rendement de 68% (Figure 154).

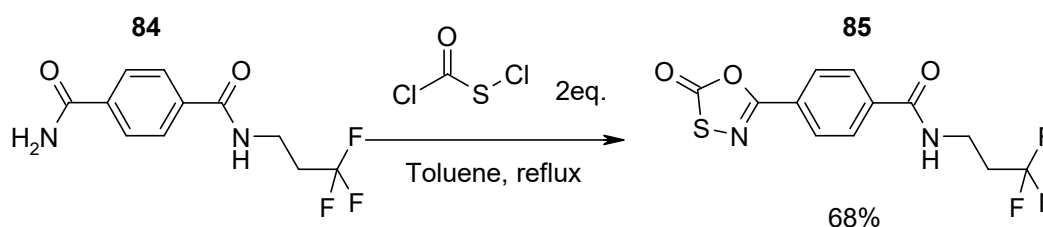


Figure 154 : Schéma de synthèse du composé **85**.

²⁵⁵ E. A. F. Fordyce, *et al.*, *Tetrahedron* **2010**, *66* (35), 7192-7197.

Cet intermédiaire a ensuite été mis à réagir en présence d'acétonitrile afin de former le thiadiazole **86**. Différentes températures de réaction entre 100°C et 170°C ont été essayées, en chauffage en bain d'huile ou en réacteur à micro-ondes. La seule réaction observée est la réaction de décomposition du cycle 1,3,4-oxathiazol-2-one pour donner le nitrile **73** correspondant.

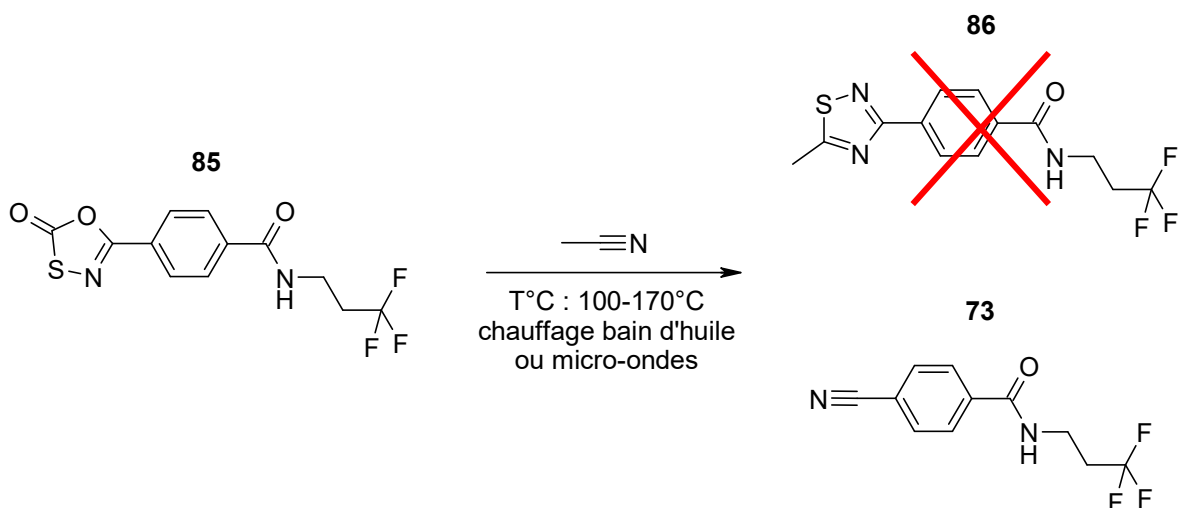


Figure 155 : Schéma de synthèse du composé **86**.

Il est décrit que la réaction de cycloaddition entre un sulfure de nitrile et un dipolarophile est favorisée par la présence de groupements électroattracteurs sur le dipolarophile.²⁵⁵ Nous avons donc envisagé d'accéder au thiadiazole **86** à partir du composé **89** obtenu par condensation du composé **85** avec le cyanoacétate d'éthyle (Figure 156). L'accès au composé **86** se fait ensuite par réductions successives des composés **89** et **90**.

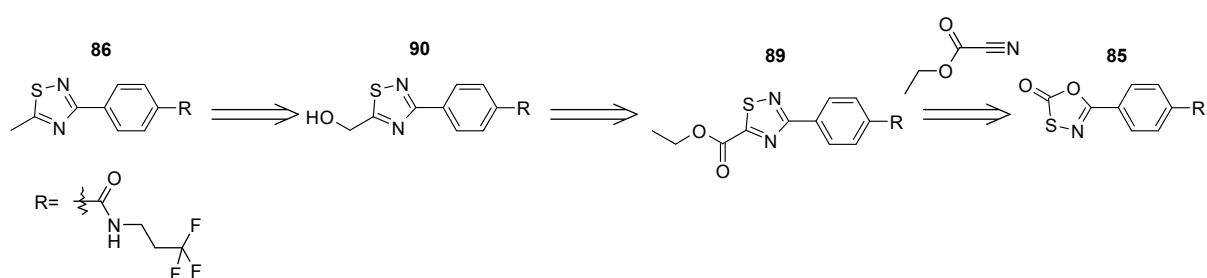


Figure 156 : Nouvelle rétrosynthèse envisagée pour l'obtention du cycle 1,2,4-thiadiazole substitué par un méthyle en position 2.

Le cycle thiadiazole a été formé à partir de l'intermédiaire **85** portant le cycle 1,3,4-oxathiazol-2-one et du cyanoacétate d'éthyle (Figure 157). La réaction a été réalisée en chauffage micro-ondes dans l'ortho-dichlorobenzène, à 160°C pour donner l'ester **89** avec un rendement de 67%. La fonction ester a ensuite été réduite en présence de LiBH₄ dans le THF afin d'accéder à l'alcool **90** avec un rendement de 44%. La réaction de réduction est quantitative. Néanmoins, le rendement obtenu

est faible à cause de problèmes rencontrés lors de la purification du produit, ce dernier restant fortement accroché sur la colonne de silice.

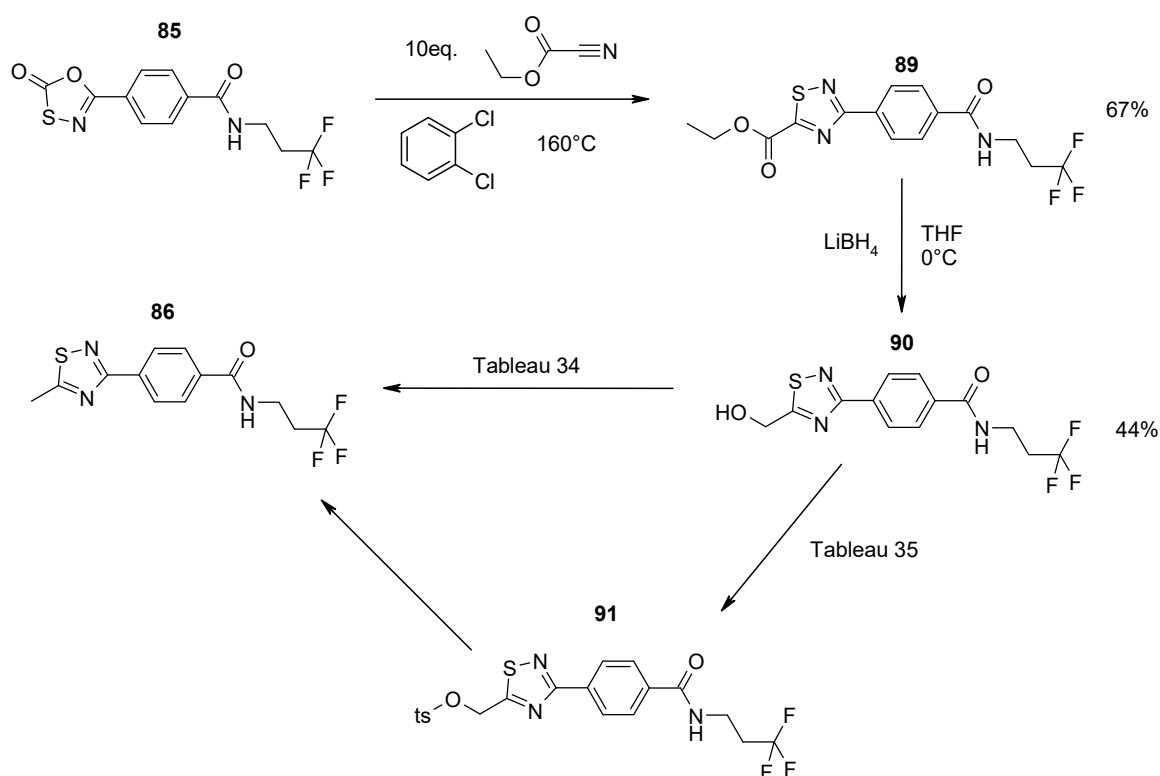


Figure 157 : Schéma de la seconde voie de synthèse envisagée pour la synthèse de l'analogue 1,2,4-thiadiazole 86.

La dernière étape a ensuite consisté à réduire la fonction alcool primaire en méthyle. Plusieurs conditions de réaction ont d'abord été envisagées afin de réduire directement le groupement hydroxyle.

La réaction a tout d'abord été réalisée en présence de triéthylsilane (TES) comme donneur d'hydrure et d'un acide de Brønsted (TFA, entrée 1, Tableau 34)²⁵⁶ ou d'un acide de Lewis (BF₃ étherate, entrée 2, Tableau 34)²⁵⁷. Dans ces deux conditions, aucune conversion de l'alcool de départ n'a été observée. Une réaction d'hydrogénation en milieu acide a alors été envisagée (entrée 3, Tableau 34)²⁵⁸ avec différentes conditions de température (de 20 à 60°C) et de pression (de 1bar à 80bar). Là encore, aucune conversion du produit de départ n'a été observée.

Entrée	Conditions	Résultat
--------	------------	----------

²⁵⁶ F. Roelens, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (25), 7357-7365.

²⁵⁷ W. Zhang, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124 (35), 10443-10450.

²⁵⁸ T. T. Le, *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, 76 (2), 601-608.

1	TES (2eq.), TFA (6eq.), DCM, TA, 1 nuit	Pas de conversion
2	TES (10eq.), BF ₃ étherate (5eq.), DCE, TA, 1 nuit	Pas de conversion
3	H ₂ , Pd10%/C, EtOH 10/1 HCl 1N TA-60°C, PA-80bar	Pas de conversion

Tableau 34 : Conditions utilisées pour la réduction du composé 90.

La fonction alcool a alors été tosylée afin d'être réduite par la suite (composé **91**, Figure 157). Différentes conditions décrites dans la littérature ont été utilisées pour la réaction de tosylation (Tableau 35). Aucune conversion de l'alcool **90** n'a été observée en utilisant une base telle que K₂CO₃ dans le DCM (entrée 1)²⁵⁹ ou de la pyridine pure (entrée 2). En présence de triéthylamine et de diméthylaminopyridine dans le DCM, le produit de départ a été dégradé sans formation de composé tosylé **91** (entrée 3)²⁶⁰. Enfin, en présence de TEA dans le DCM à TA pendant 5 jours, une conversion totale de l'alcool de départ a été observée. Des essais de réduction de la fonction tosylo afin d'aboutir au composé **86** désiré sont en cours.

Entrée	Conditions	Résultat
1	K ₂ CO ₃ , DCM, TA, 1nuit	Pas de conversion
2	Pyridine, TA, 1nuit	Pas de conversion
3	TEA, DMAP, DCM, TA, 1nuit	Dégradation
4	TEA, DCM, TA, 5j	Conversion complète

Tableau 35 : Conditions utilisées pour la réaction de tosylation du composé 91.

Nous avons également essayé de synthétiser l'isomère **88** du composé **86** (Figure 158). Pour cela, le cycle 1,3,4-oxathiazol-2-one a été branché sur le groupement méthyle. La réaction entre l'acétamide et le chlorure de (chlorothio)formyl dans le DCE au reflux a permis d'obtenir l'intermédiaire **87** avec un rendement de 43%.²⁶¹ Le composé n'étant pas détectable en spectrométrie de masse et n'absorbant pas dans l'UV, l'identité de ce composé a été confirmée par RMN ¹³C par comparaison avec les déplacements chimiques décrits dans la littérature.²⁶²

²⁵⁹ D. L. Boger, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (13), 5619-5630.

²⁶⁰ T. Ladduwahetty, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39* (15), 2907-2914.

²⁶¹ R. K. Howe, *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43* (19), 3736-3742.

²⁶² A. M. Damas, *et al.*, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1981**, 2991-2995.

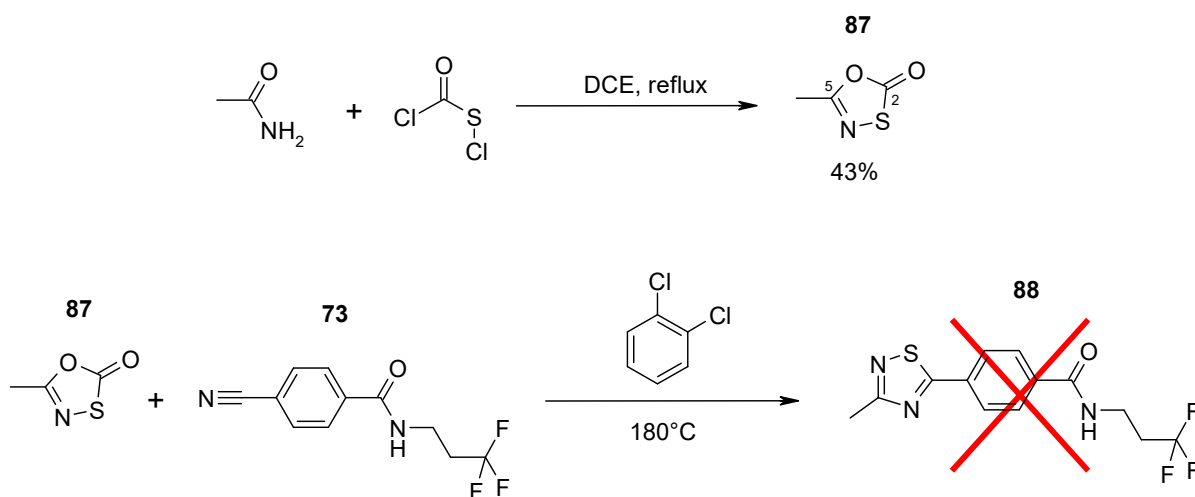


Figure 158 : Schéma de synthèse du composé **88**.

L'intermédiaire **87** a été mis en réaction avec le composé **73** dans le dichlorobenzène à 180°C afin d'obtenir le thiadiazole **88**. Aucune conversion du composé **73** n'a été observée dans ces conditions.

Les analogues 1,2,4-thiadiazole **86** et **88** n'ont donc pas pu être obtenus.

IV.3.2.6 Synthèse des analogues 1,2,3-triazole

La synthèse des analogues possédant le motif 1,2,3-triazole a été réalisée à partir du précurseur azoture **92**, obtenu par couplage de l'acide 4-azidobenzoïque et de la 3,3,3-trifluoropropylamine, avec un rendement de 98%. (Figure 159)

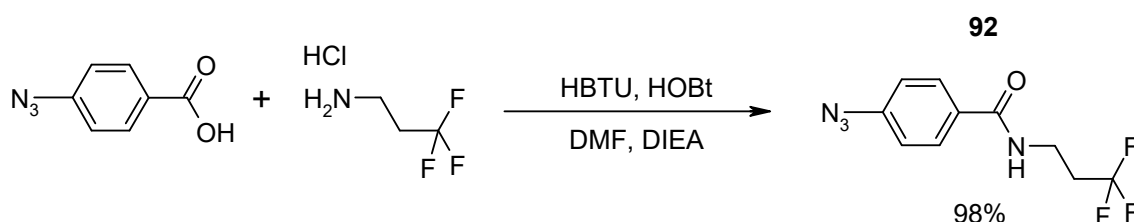


Figure 159 : Schéma de synthèse du précurseur azoture **92**.

La formation du cycle triazole a ensuite été réalisée par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de type Huisgen où la fonction azoture du composé **92** réagit avec un alcyne. Selon les conditions opératoires deux isomères peuvent être obtenus. Si la réaction est réalisée en absence de catalyseur, un mélange des régioisomères 1,4 et 1,5 est obtenu (Figure 160). Cependant, l'ajout de Cu^I (Cu au degré d'oxydation 1) permet la formation sélective du régioisomère 1,4.

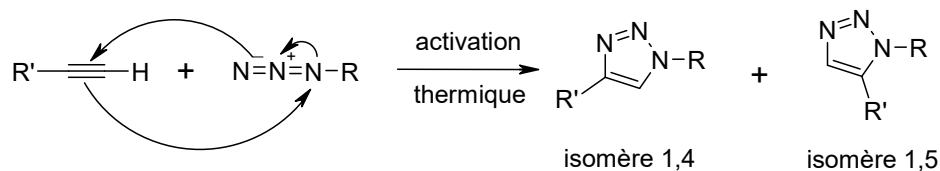


Figure 160 : La réaction de cycloaddition entre un alcyne et un azoture peut conduire à deux régioisomères.

Aucune conversion n'a été observée lors de la réaction entre le composé azoture **92** et le 5-méthylhexyne catalysée par du CuI . Un mélange de $CuSO_4$ et d'ascorbate de sodium a alors été utilisé comme source de Cu^I . En effet, le Cu^{II} est réduit par l'ascorbate pour générer du Cu^I *in situ* (Figure 161). Dans ces conditions de réaction, un seul isomère est formé de manière quantitative. Le produit de la réaction précipite dans les conditions utilisées, il est récupéré pur après filtration du milieu réactionnel.

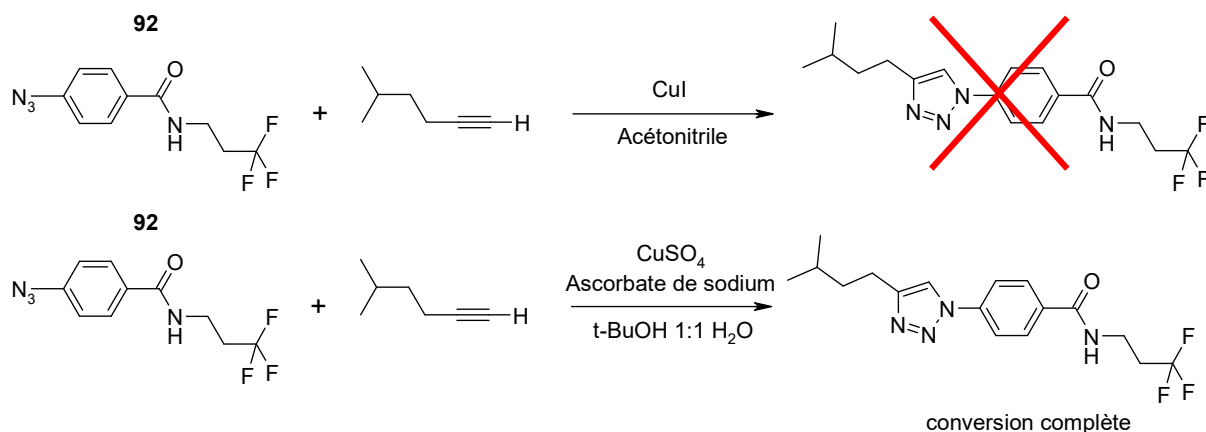
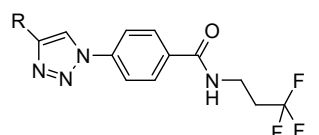


Figure 161 : Mise au point des conditions de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre le 5-méthylhexyne et l'azoture 92.

Ces conditions de réaction ont ensuite été utilisées pour préparer les composés **93** à **99** avec des rendements compris entre 33 et 91% (Tableau 36). Le substituant méthyle présent dans le composé de référence n'a pas pu être introduit grâce à cette voie de synthèse. Nous avons observé précédemment que les substituants hydrophobes (chaînes aliphatiques, cycles aromatiques) étaient bien tolérés dans cette position d'un point de vue de l'activité mais entraînaient une forte dégradation de la solubilité notamment. Ainsi, des groupements aliphatiques plus petits, ramifiés ou cycliques, ont été introduits (**93**, **94**, **95**). L'introduction de groupements hydroxy pouvant augmenter la solubilité et/ou interagir avec la Tyr148 a également été envisagée (**96**, **97**, **98**).



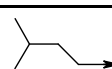
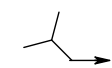
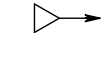
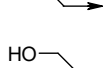
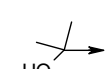
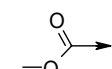
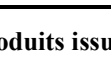
Composé	R	Rendement
93		53%
94		75%
95		45%
96		33%
97		82%
98		53%
99		91%

Tableau 36 : Rendements obtenus pour les produits issus de la réaction de click chemistry catalysée par le cuivre au degré d'oxydation I.

IV.3.2.7 Synthèse de l'analogue 1,2,4-triazole

La synthèse de l'analogue 1,2,4-triazole a été réalisée à partir de l'intermédiaire **73**. Ce dernier est mis à réagir avec du méthanol dans une solution d'acide chlorhydrique dans le dioxane, permettant d'obtenir le chlorhydrate d'imidate **100** avec un rendement de 93% après filtration.²⁶³ Le passage par la forme imidate permet d'activer la fonction nitrile peu réactive.

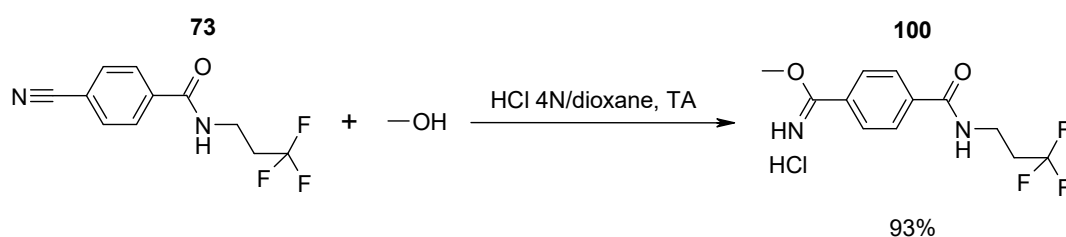


Figure 162 : Schéma de synthèse de l'imidate **100**.

Le composé **100** est alors cyclisé en triazole avec l'acétylhydrazide en présence d'un excès de DIEA dans l'éthanol à reflux.²⁶³

²⁶³ E. U. Roberts, *et al.*, **2009**, WO/2009/151529 (PCT/US2009/003014).

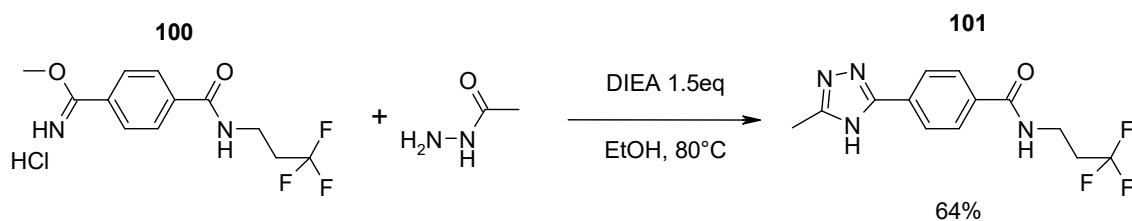


Figure 163 : Schéma de synthèse du composé **101** à partir de l'intermédiaire imidate.

Le triazole **101** est ainsi obtenu avec un rendement de 64%. Si la DIEA est présente en défaut, l'oxadiazole 1,2,4-correspondant est également formé. Cela peut-être expliqué par le mécanisme de la réaction de cyclisation (Figure 164). La première étape correspond à l'attaque nucléophile de l'hydrazide sur le chlorhydrate d'imidate, pour conduire au chlorhydrate d'acyl-hydrazone (i) en libérant une molécule de méthanol. L'intermédiaire (i) alors formé est déprotoné par la DIEA, pour donner le composé (ii). La cyclisation intramoléculaire de l'atome d'azote sur le carbonyl conduit à l'intermédiaire (iii) qui subit une déshydratation pour former le cycle triazole souhaité. Si la DIEA est présente en défaut lors de la réaction, une partie de l'intermédiaire (i) n'est pas déprotoné. Dans ce cas là, l'atome d'azote de la fonction imine n'est alors plus nucléophile, et la cyclisation peut se faire par attaque nucléophile de l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle sur l'atome de carbone de la fonction imine, formant ainsi l'oxadiazole par perte d'une molécule d'ammoniac.

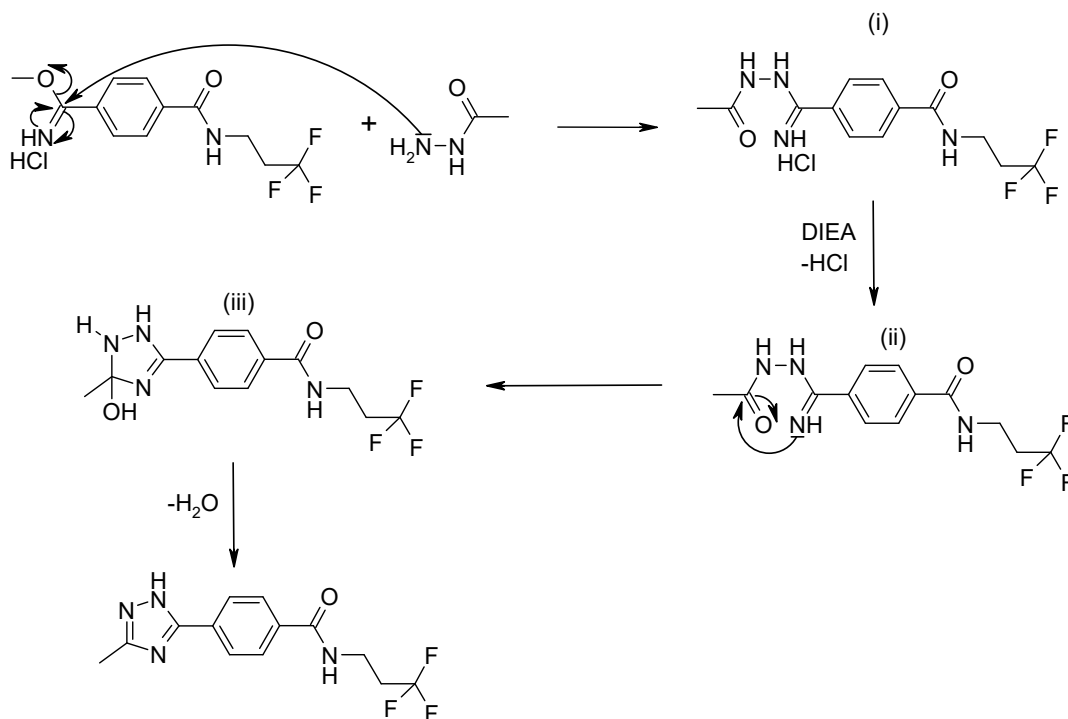
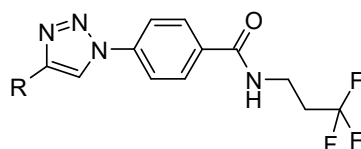


Figure 164 : Mécanisme de formation du cycle 1,2,4-triazole par condensation d'un hydrazide avec un imidate.

IV.3.3 Résultats et discussion

Le Tableau 37 ci-dessous présente les activités obtenues pour les analogues 1,2,3-triazole. Le substituant méthyle présent sur le composé **43** de référence n'a pas pu être introduit sur le cycle 1,2,3-triazole par la voie de synthèse utilisée. Le composé **49** (Tableau 37) possédant une chaîne isobutyle a donc servi de référence.



Composé	Structure / R	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)	HA	LE
92		6.0	1.1	18	0.46
43, Réf		11.3	0.083	21	0.47
49, Réf		12.6	<0.040	24	>0.43
93		3.8	>10	25	-
94		4.1	1.2	24	0.35
95		3.5	1.7	23	0.35
96		0.8	>10	22	-
97		1.2	2.0	23	0.35
98		1.0	>10	24	-
99		0.7	>20	24	-

Tableau 37 : Résultats biologiques obtenus pour les composés possédant le cycle 1,2,3-triazole.

LE=1,4*pEC₅₀/HA. n.d. : non déterminable.

Nous avons tout d'abord évalué l'azoture **92** utilisé comme précurseur pour la synthèse des différents triazoles. Ce dernier possède une affinité ($\Delta T_m=6.0^\circ\text{C}$) et une activité ($EC_{50}=1.1\mu\text{M}$) inférieure aux composés de référence **43** ($\Delta T_m=11.3^\circ\text{C}$, $EC_{50}=0.083\mu\text{M}$) et **49** ($\Delta T_m=12.6^\circ\text{C}$, $EC_{50}<0.04\mu\text{M}$). Néanmoins, sa petite taille ($HA=18$) en fait un composé tout aussi efficace ($LE=0.46$), et donc un point de départ intéressant pour la synthèse d'inhibiteurs plus puissants.

Cependant, tous les triazoles synthétisés (composés **93** à **99**, Tableau 37) se sont révélés moins affins pour la protéine et moins actifs sur test intracellulaire que l'azoture **92** et que les composés de référence **43** et **49**.

On constate notamment en comparant les composés **49** ($\Delta T_m=12.6^\circ\text{C}$, $EC_{50}<0.04\mu\text{M}$) et **94** ($\Delta T_m=4.1^\circ\text{C}$, $EC_{50}=1.2\mu\text{M}$), que le remplacement d'un cycle thiazole par un cycle 1,2,3-triazole entraîne une chute de l'affinité pour la protéine ($\Delta(\Delta T_m)=-8.5^\circ\text{C}$) mais également de l'activité intracellulaire (d'un facteur 30 au moins).

Néanmoins, on observe que les relations structure-activité au niveau du substituant en position 4 du cycle triazole sont cohérentes avec celles obtenues jusqu'à présent avec le cycle thiazole. En effet, les composés **93** ($\Delta T_m=3.8^\circ\text{C}$, $EC_{50}>10\mu\text{M}$), **94** ($\Delta T_m=4.1^\circ\text{C}$, $EC_{50}=1.2\mu\text{M}$) et **95** ($\Delta T_m=3.5^\circ\text{C}$, $EC_{50}=1.7\mu\text{M}$) possédant un groupement aliphatique se montrent beaucoup plus affins mais également plus actifs que les composés avec une fonction ester méthylique (**99**, $\Delta T_m=0,7^\circ\text{C}$, $EC_{50}>20\mu\text{M}$) ou des groupements hydroxyles (**96**, $\Delta T_m=0.8^\circ\text{C}$, $EC_{50}>10\mu\text{M}$ ou **98**, $\Delta T_m=1.0^\circ\text{C}$, $EC_{50}>10\mu\text{M}$). En revanche, le composé **97** portant une chaîne hydroxyéthyle se montre aussi actif sur le test intracellulaire ($EC_{50}=2.0\mu\text{M}$) bien qu'étant moins affiné pour la protéine ($\Delta T_m=1.2^\circ\text{C}$).

Les composés **92** et **94** ont pu être co-cristallisés avec la protéine EthR.

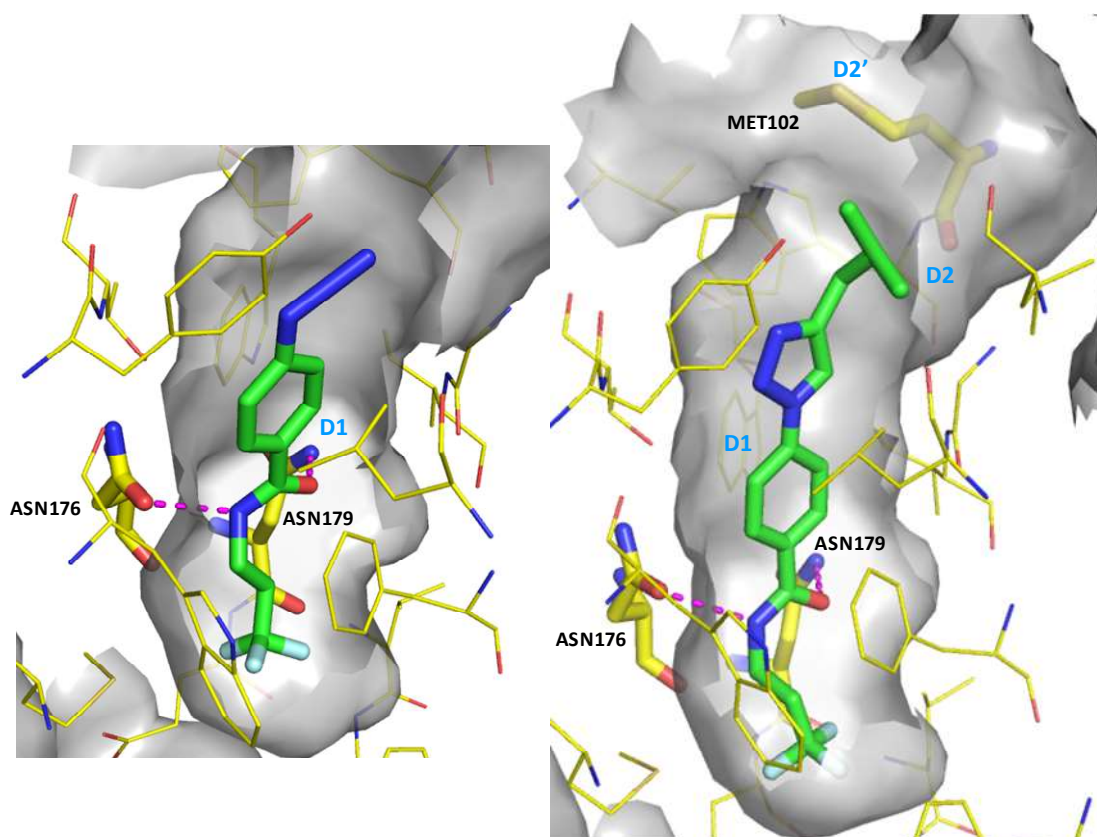


Figure 165 : Mode de liaison des composés 92 et 94 à la protéine EthR obtenus par co-cristallisation (résolution 2.5Å et 1.8Å respectivement).

L'azoture **92** et le triazole **94** forment deux liaisons hydrogène avec les asparagines 176 et 179, tout comme les composés précédents (Figure 165). Néanmoins, en superposant les modes de liaison des deux composés, on observe que l'azoture **92** se lie plus haut dans le domaine de liaison D1 (Figure 166). Cela a pour conséquence de changer la géométrie des liaisons hydrogène formées avec la chaîne latérale des deux asparagines. Il convient néanmoins de remarquer que les variations observées dans le mode de liaison sont largement inférieures à la résolution de la structure radiocristallographique (2.5Å).

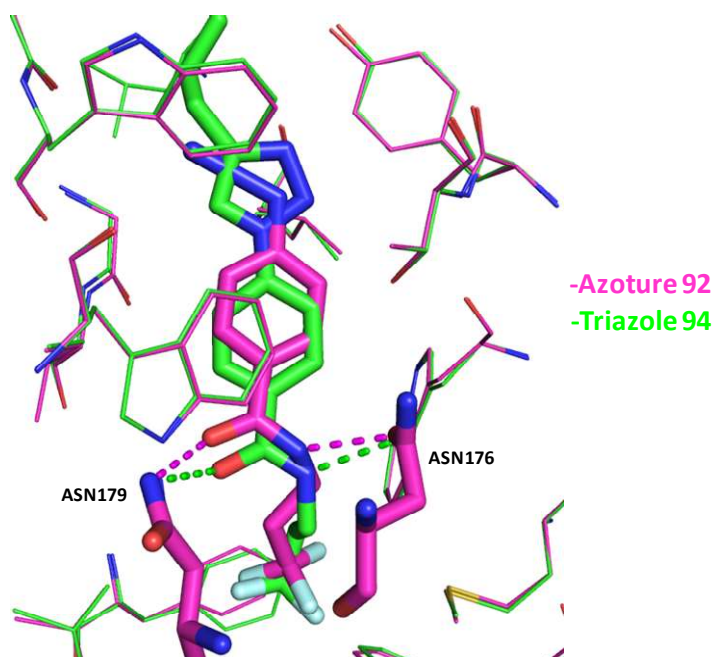


Figure 166 : Superposition des modes de liaisons des composés 92 et 94.

Enfin, nous avons comparé le mode de liaison du composé **94** avec celui du composé **49** afin de comprendre pourquoi le remplacement du cycle thiazole par un cycle 1,2,3-triazole entraînait une chute si importante de l'activité (Figure 167). Dans le cas du composé **49**, le cycle thiazole vient s'insérer entre les cycles aromatiques des résidus Tyr148 et Trp103. L'affinité du composé **49** semble donc posséder une composante entropique importante due aux forces hydrophobes de désolvatation, le cycle thiazole étant à la fois plus hydrophobe et plus volumineux que le cycle triazole du composé **94**.

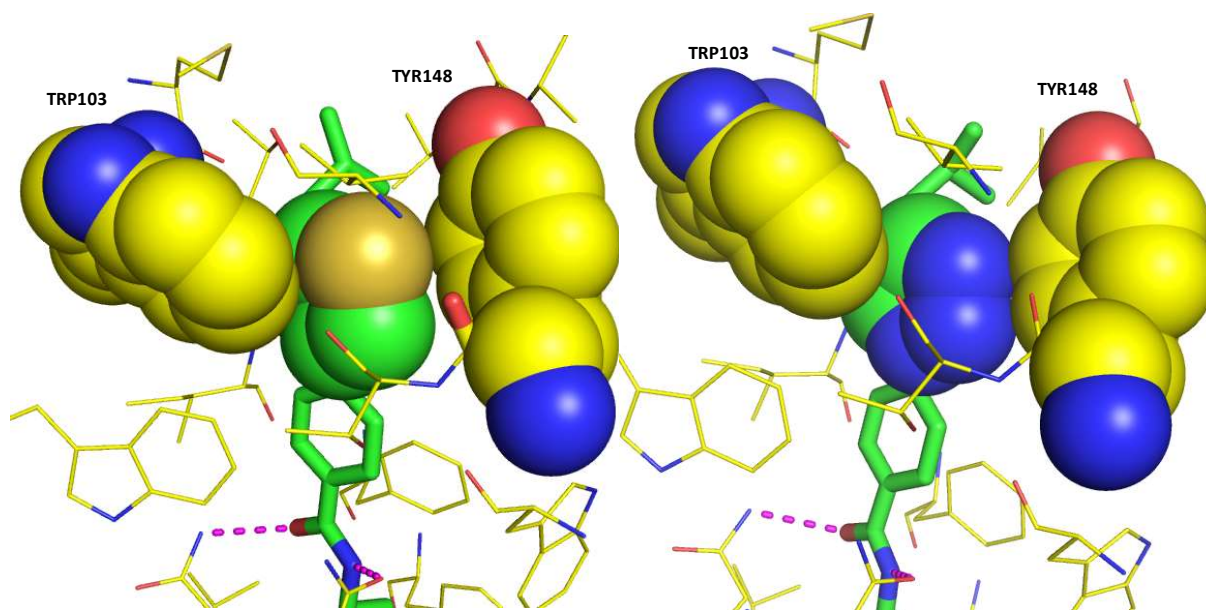


Figure 167 : Comparaison du mode de liaison des composés **49** (à gauche) et **94** (à droite) obtenus par co-cristallisation.

Les résultats obtenus pour les autres hétérocycles sont présentés dans le Tableau 38 ci-dessous.

Composé	R	Het	EC ₅₀ (μM) bact	HA	LE
43, Réf	H ₃ C →		0.058	21	0.48
72	H ₃ C →		0.18	21	0.45
75	H ₃ C →		0.062	21	0.48
78	H ₃ C →		0.21	21	0.45
80	H ₃ C →		0.96	21	0.40
83	H ₃ C →		1.4	21	0.39
101	H ₃ C →		>2.5	21	-
89			>2.5	25	-
54			>2.5	25	-
90			0.13	22	0.44

Tableau 38 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 72, 75, 78, 80, 83, 89, 90, 101.

Le remplacement du cycle thiazole (composé **54**, $EC_{50} > 2.5\mu\text{M}$) par un cycle 1,2,4-thiadiazole (composé **89**, $EC_{50} > 2.5\mu\text{M}$) ne permet pas d'augmenter l'activité des produits. Néanmoins, le composé **90** ($EC_{50} = 0.12\mu\text{M}$) possédant le cycle 1,2,4-thiadiazole et un groupement hydroxyméthyle comme substituant de l'hétérocycle s'avère seulement deux fois moins actif que le composé **43** de référence. Il semble donc intéressant de poursuivre les efforts dans la synthèse du composé **86**, qui est l'analogue direct du composé **43** possédant un cycle 1,2,4-thiadiazole.

L'introduction d'un cycle 1,3,4-oxadiazole (composé **80**) entraîne une diminution de l'activité d'un facteur 16 ($EC_{50} = 0.96\mu\text{M}$). Les analogues 1,3,4-thiadiazole (composé **83**) et 1,3,4-triazole (composé **101**) sont également moins actifs ($EC_{50} = 1.4\mu\text{M}$ et $EC_{50} > 2.5\mu\text{M}$ respectivement) que le composé de référence.

Le remplacement du cycle thiazole du composé **43** par un cycle oxazole (composé **72**) ou 1,2,4-oxadiazole (composé **78**) entraîne une chute de l'activité d'un facteur trois. Néanmoins, le second analogue 1,2,4-oxadiazole **75** ($EC_{50} = 0.062\mu\text{M}$) possède une activité équivalente au thiazole de référence ($EC_{50} = 0.058\mu\text{M}$). Ce composé représente donc la meilleure alternative au composé **43** et ses paramètres physico-chimiques et ADME sont en cours d'évaluation.

V Bilan de la stratégie growing

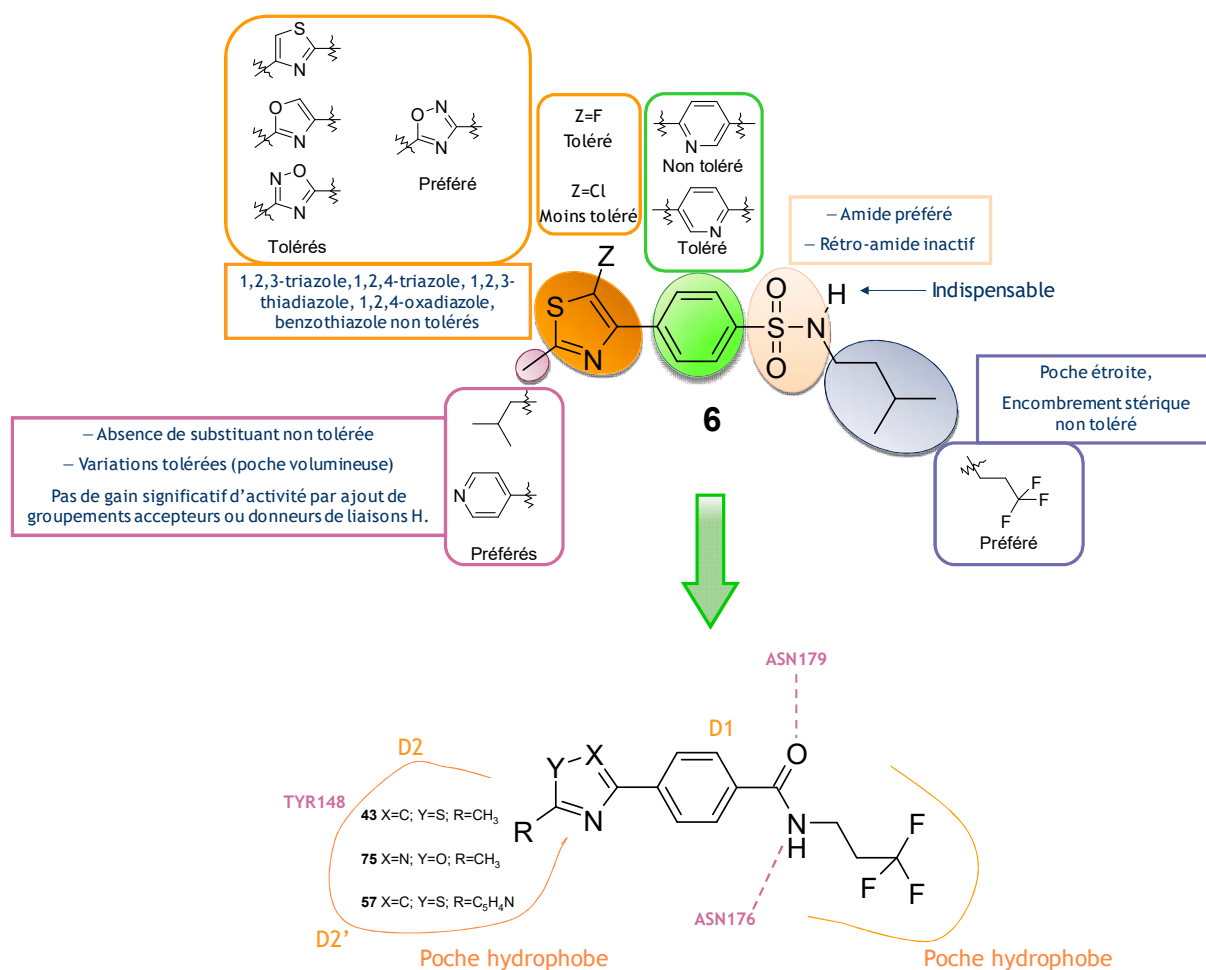


Figure 168 : Résumé des Relations Structure-Activité obtenues pour la série growing.

L'introduction d'une fonction amide à la place de la fonction sulfonamide ainsi que le remplacement de la chaîne isopentyle par une chaîne 3,3,3-trifluoropropyle, ont permis d'augmenter très significativement l'activité des molécules par rapport au composé de référence **6**, mais également leurs coefficients d'efficacité LE et LLE_{AT} . Ces modifications ont aussi permis une augmentation significative de la solubilité et une diminution du logD. Les relations structure-activité à ce niveau ont révélé l'importance de l'encombrement stérique dans le bas du domaine D1.

A l'inverse, les nombreuses modifications effectuées au niveau du cycle phényle, du cycle thiazole et de son substituant (position R, Figure 168) ont souvent été tolérées mais ne permettent pas un gain d'activité significatif. De plus, aucune interaction avec la Tyr148 n'a pu être observée avec les substituants possédant des groupements donneurs ou accepteurs de liaison hydrogène. Au niveau du substituant R, les groupements protonables ou très polaires sont non tolérés. Seule l'introduction d'un cycle pyridine (composé **57**) en position 2 du cycle thiazole permet l'amélioration de l'activité, tout en

conservant des propriétés physico-chimiques (solubilité, logD) et une efficacité (LE et LLE_{AT}) équivalente au composé possédant le substituant méthyle (composé **43**). Cependant ces deux composés **43** et **57** présentent une faible stabilité microsomale ($t_{1/2} < 10\text{min}$ et $t_{1/2} = 17\text{min}$ respectivement).

Au niveau du cycle thiazole, l'introduction en position 5 d'un atome de fluor ne modifie pas l'activité mais ne permet pas d'augmenter la stabilité métabolique. En revanche, l'introduction d'un atome de chlore entraîne une perte d'activité.

Enfin, il a été observé que le cycle thiazole peut être remplacé par un cycle 1,2,4-oxadiazole sans modifier l'activité (composé **75**). Les propriétés physico-chimiques (solubilité, logD) et pharmacocinétiques (stabilités microsomale et plasmatique) de ce composé vont donc être mesurées afin de vérifier s'il peut répondre au profil fixé en début d'optimisation.

VI Bibliographie

187. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Dirié, B.; Carette, X.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Demirkaya, F.; Lens, Z.; Rucktooa, P.; Villeret, V.; Christophe, T.; Jeon, H. K.; Loch, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N., Ethionamide Boosters: Synthesis, Biological Activity, and Structure–Activity Relationships of a Series of 1,2,4-Oxadiazole EthR Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (8), 2994-3010.
230. Michiharu, S.; Yumi, S.; Nobuhito, K.; Yuko, S.; Hiroshi, N.; Jie, O.; Kazu, K., Synthesis of thiazole, oxazole and heterocyclic ring-substituted 1,2-dioxanes. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2000**, *37* (2), 269-274.
231. Dunn, D.; Husten, J.; Ator, M. A.; Chatterjee, S., Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17* (2), 542-545.
232. Irako, N.; Hamada, Y.; Shioiri, T., A New Asymmetric Synthesis of (S)-Dolaphenine and Its Heteroaromatic Congeners Utilizing (+)-2-Hydroxy-3-pinane and (-)-3-Hydroxy-2-caranone as Chiral Auxiliaries. *Tetrahedron* **1995**, *51* (46), 12731-12744.
233. Bernhart, C. A.; Perreaut, P. M.; Ferrari, B. P.; Muneaux, Y. A.; Assens, J. L. A.; Clement, J.; Haudricourt, F.; Muneaux, C. F.; Taillades, J. E., A new series of imidazolones: highly specific and potent nonpeptide AT1 angiotensin II receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, *36* (22), 3371-3380.
234. Smyth, L. A.; Matthews, T. P.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Collins, I., Divergent cyclisations of 2-(5-amino-4-carbamoyl-1H-pyrazol-3-yl)acetic acids with formyl and acetyl electrophiles. *Tetrahedron* **2007**, *63* (39), 9627-9634.
235. Hagmann, W. K., The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (15), 4359-4369.
236. Domagala, J. M.; Hanna, L. D.; Heifetz, C. L.; Hutt, M. P.; Mich, T. F.; Sanchez, J. P.; Solomon, M., New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**, *29* (3), 394-404.
237. Müller, K.; Faeh, C.; Diederich, F., Fluorine in Pharmaceuticals: Looking Beyond Intuition. *Science* **2007**, *317* (5846), 1881-1886.
238. Luo, F.-T.; Jeevanandam, A., Simple transformation of nitrile into ester by the use of chlorotrimethylsilane. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (51), 9455-9456.
239. Bellina, F.; Cauteruccio, S.; Rossi, R., Palladium- and Copper-Mediated Direct C-2 Arylation of Azoles - Including Free (NH)-Imidazole, - Benzimidazole and -Indole - Under Base-Free and Ligandless Conditions. *ChemInform* **2006**, *37* (26).
240. Augustine, J. K.; Vairaperumal, V.; Narasimhan, S.; Alagarsamy, P.; Radhakrishnan, A., Propylphosphonic anhydride (T3P®): an efficient reagent for the one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles, 1,3,4-oxadiazoles, and 1,3,4-thiadiazoles. *Tetrahedron* **2009**, *65* (48), 9989-9996.
241. Wissmann, H.; Kleiner, H.-J., New Peptide Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1980**, *19* (2), 133-134.
242. Kajigaeshi, S.; Kakinami, T.; Moriwaki, M.; Fujisaki, S.; Maeno, K.; Okamoto, T., Alpha-chlorination of aromatic acetyl derivatives with Benzyltrimethylammonium Dichloroiodate. *Synthesis* **1988**, 545-546.
243. Dalvie, D. K.; Kalgutkar, A. S.; Khojasteh-Bakht, S. C.; Obach, R. S.; O'Donnell, J. P., Biotransformation Reactions of Five-Membered Aromatic Heterocyclic Rings. *Chemical Research in Toxicology* **2002**, *15* (3), 269-299.

244. Mizutani, T.; Yoshida, K.; Kawazoe, S., Formation of toxic metabolites from thiabendazole and other thiazoles in mice. Identification of thioamides as ring cleavage products. *Drug Metabolism and Disposition* **1994**, *22* (5), 750-755.
245. Mizutani, T.; Suzuki, K., Relative hepatotoxicity of 2-(substituted phenyl)thiazoles and substituted thiobenzamides in mice: evidence for the involvement of thiobenzamides as ring cleavage metabolites in the hepatotoxicity of 2-phenylthiazoles. *Toxicology Letters* **1996**, *85* (2), 101-105.
246. Stevens, G. J.; Hitchcock, K.; Wang, Y. K.; Coppola, G. M.; Versace, R. W.; Chin, J. A.; Shapiro, M.; Suwanrumpha, S.; Mangold, B. L. K., In Vitro Metabolism of N-(5-Chloro-2-methylphenyl)-N'-(2-methylpropyl)thiourea: Species Comparison and Identification of a Novel Thiocarbamide-Glutathione Adduct. *Chemical Research in Toxicology* **1997**, *10* (7), 733-741.
247. Bolea, C. Novel thiazoles derivatives and their use as positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptors. WO/2010/079239, 2010.
248. Fuglseth, E.; Thvedt, T. H. K.; Møll, M. F.; Hoff, B. H., Electrophilic and nucleophilic side chain fluorination of para-substituted acetophenones. *Tetrahedron* **2008**, *64* (30-31), 7318-7323.
249. Paul T., N.; Sergio Gonzalez, D.; Michael D., B.; Stéphane P., V.; Chi-Huey, W., Selectfluor: Mechanistic Insight and Applications. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 192-212.
250. Legros, J.-Y.; Primault, G.; Fiaud, J.-C., Syntheses of acetylquinolines and acetylisquinolines via palladium-catalyzed coupling reactions. *Tetrahedron* **2001**, *57* (13), 2507-2514.
251. Stille, J. K., The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organotin Reagents with Organic Electrophiles [New Synthetic Methods (58)]. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25* (6), 508-524.
252. Zhang, H.-Z.; Kasibhatla, S.; Kuemmerle, J.; Kemnitzer, W.; Ollis-Mason, K.; Qiu, L.; Crogan-Grundy, C.; Tseng, B.; Drewe, J.; Cai, S. X., Discovery and Structure–Activity Relationship of 3-Aryl-5-aryl-1,2,4-oxadiazoles as a New Series of Apoptosis Inducers and Potential Anticancer Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48* (16), 5215-5223.
253. Lee, J. C.; Choi, H. J.; Lee, Y. C., Efficient synthesis of multi-substituted oxazoles under solvent-free microwave irradiation. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44* (1), 123-125.
254. Porcal, W.; Hernández, P.; González, M.; Ferreira, A.; Olea-Azar, C.; Cerecetto, H.; Castro, A., Heteroarylnitrones as Drugs for Neurodegenerative Diseases: Synthesis, Neuroprotective Properties, and Free Radical Scavenger Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (19), 6150-6159.
255. Fordyce, E. A. F.; Morrison, A. J.; Sharp, R. D.; Paton, R. M., Microwave-induced generation and reactions of nitrile sulfides: an improved method for the synthesis of isothiazoles and 1,2,4-thiadiazoles. *Tetrahedron* **2010**, *66* (35), 7192-7197.
256. Roelens, F.; Heldring, N.; Dhooge, W.; Bengtsson, M.; Comhaire, F.; Gustafsson, J.-Å.; Treuter, E.; De Keukeleire, D., Subtle Side-Chain Modifications of the Hop Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin Result in Distinct Agonist/Antagonist Activity Profiles for Estrogen Receptors α and β . *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49* (25), 7357-7365.
257. Zhang, W.; Luo, Z.; Chen, C. H.-T.; Curran, D. P., Solution-Phase Preparation of a 560-Compound Library of Individual Pure Mappicine Analogues by Fluorous Mixture Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (35), 10443-10450.
258. Le, T. T.; Chau, N. T. T.; Nguyen, T. T.; Brien, J.; Thai, T. T.; Nourry, A.; Castanet, A.-S.; Nguyen, K. P. P.; Mortier, J., Evidence for a Trianion Intermediate in the Metalation of 4-Hydroxy-6,7-dimethoxy-8-methyl-2-naphthoic Acid. Methodology and Application to

Racemic 5,5'-Didesisopropyl-5,5'-dialkylapogossypol Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, 76 (2), 601-608.

259. Boger, D. L.; Honda, T.; Dang, Q., Total Synthesis of Bleomycin A2 and Related Agents. 2. Synthesis of (-)-Pyrimidoblamic Acid, epi-(+)-Pyrimidoblamic Acid, (+)-Desacetamidopyrimidoblamic Acid, and (-)-Descarboxamidopyrimidoblamic Acid. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116 (13), 5619-5630.

260. Ladduwahetty, T.; Baker, R.; Cascieri, M. A.; Chambers, M. S.; Haworth, K.; Keown, L. E.; MacIntyre, D. E.; Metzger, J. M.; Owen, S.; Rycroft, W.; Sadowski, S.; Seward, E. M.; Shephard, S. L.; Swain, C. J.; Tattersall, F. D.; Watt, A. P.; Williamson, D. W.; Hargreaves, R. J., N-Heteroaryl-2-phenyl-3-(benzyloxy)piperidines: A Novel Class of Potent Orally Active Human NK1 Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39 (15), 2907-2914.

261. Howe, R. K.; Gruner, T. A.; Carter, L. G.; Black, L. L.; Franz, J. E., Cycloaddition reactions of nitrile sulfides with acetylenic esters. Synthesis of isothiazolecarboxylates. *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, 43 (19), 3736-3742.

262. Damas, A. M.; Gould, R. O.; Harding, M. M.; Paton, R. M.; Ross, J. F.; Crosby, J., Nitrile sulphides. Part 1. 1,3-Dipolar cycloaddition to carbonyl groups activated by trihaloalkyl substituents; synthesis and crystal structure of 1,3,4-oxathiazoles. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1981**, 2991-2995.

263. Roberts, E. U.; Rosen, H. U.; Brown, S. U.; Guerrero, M. A. U.; Peng, X. U.; (US), P. R. Novel modulators of sphingosine phosphate receptors. WO/2009/151529 2009.

Chapitre 5. Stratégies de « fragment merging » et « fragment linking »

I Introduction

La stratégie de « fragment growing » précédente est basée sur l'optimisation du fragment lié au domaine D1 (Figure 169).

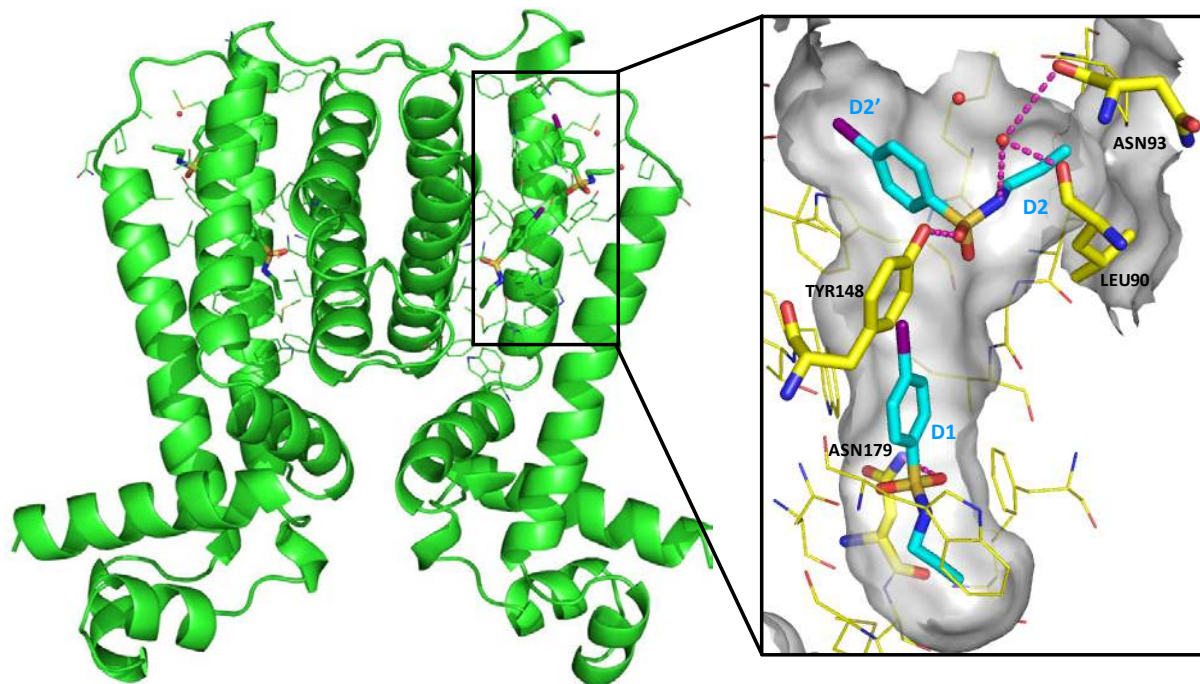


Figure 169 : Occupation du domaine de régulation par deux molécules de composé 1.

La présence d'un deuxième fragment dans la poche de liaison occupant les domaines D2 et D2' nous a permis d'envisager deux stratégies d'optimisation supplémentaires : une stratégie dite de « fragment merging » et une stratégie dite de « fragment linking ».

I.1 Stratégie de « fragment merging »

I.1.1 Stratégie

Comme nous l'avons vu précédemment (p.124), la stratégie de « fragment merging » consiste à fusionner un fragment avec un ligand connu ayant un mode de liaison déjà optimisé. Dans notre cas, nous avons utilisé comme point de départ le composé **43** identifié lors de la stratégie de fragment growing. Ce composé a été sélectionné car son mode de liaison à la protéine EthR a pu être déterminé par co-cristallisation et il présente de plus le meilleur coefficient d'efficacité LE. L'idée a consisté à relier le composé **43** au fragment lié dans les poches D2 et D2'. Ce fragment interagit essentiellement

avec la protéine grâce à une liaison hydrogène entre l'oxygène de sa fonction sulfonamide et la chaîne latérale de la tyrosine 148 (Figure 170).

L'objectif a donc été de venir introduire sur la structure du composé **43** une fonction sulfonamide, capable d'effectuer une liaison hydrogène supplémentaire avec la Tyr148. Pour cela, les modes de liaison des composés **1** et **43** ont été superposés. Une distance de 2.3Å a été mesurée entre l'atome de carbone du groupement méthyle en position 2 du cycle thiazole et l'atome de soufre de la fonction sulfonamide que l'on souhaite introduire (Figure 170). Nous avons émis l'hypothèse qu'un composé tel que **103** (Figure 170) permettrait à la fois aux atomes provenant du composé **43** ainsi qu'à la fonction sulfonamide de conserver leurs modes de liaison d'origine. La chaîne propyle a été choisie pour mimer la chaîne propargyle du fragment **1** occupant le domaine de liaison D2.

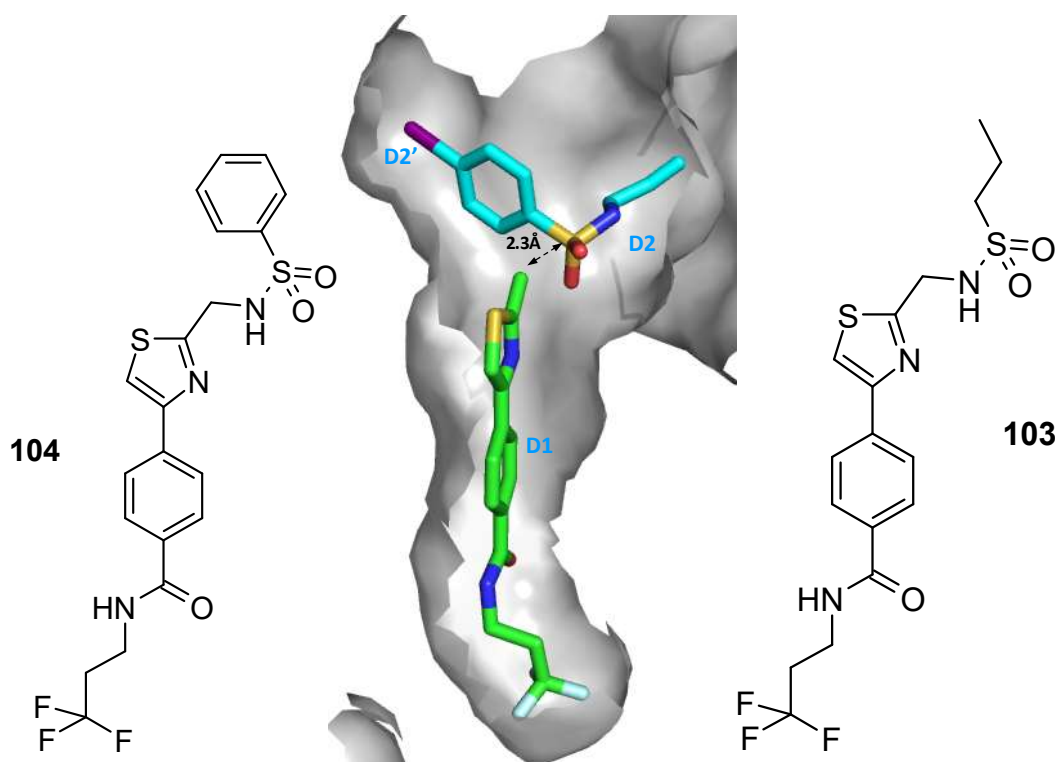


Figure 170 : Superposition du mode de liaison des composés **1** et **43**, stratégie merging.

Afin de vérifier cette hypothèse, le mode de liaison du composé **103** a été modélisé au sein de la structure de la protéine obtenue avec le ligand **1**, à l'aide du logiciel MOE (Figure 171).

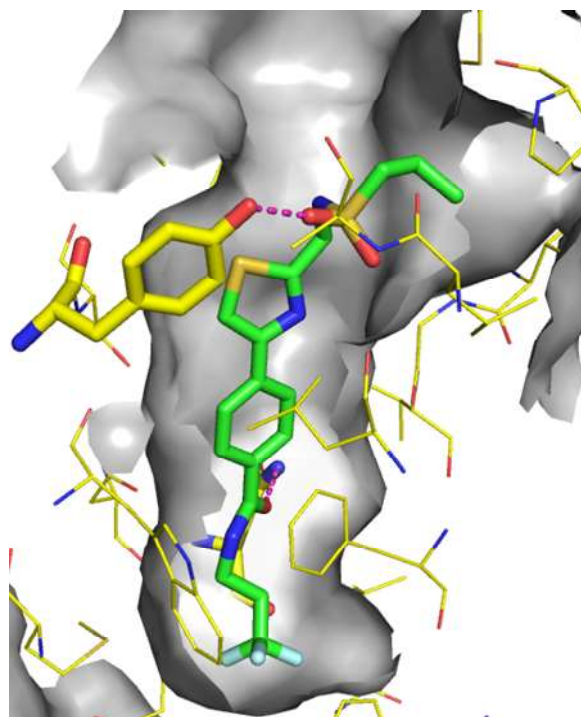


Figure 171 : Modélisation du mode de liaison du composé **103** réalisée avec le logiciel MOE.

Ce mode de liaison supposé, confirme la capacité du composé **103** à effectuer des liaisons hydrogène avec l'Asn179 et la Tyr148. Le groupement N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide occupe parfaitement le domaine de liaison D1 comme observé sur les composés de la série growing. La chaîne propyle pointe en direction de la poche D2. Cette chaîne propyle a également été remplacée par un cycle phényle dans l'analogue **104** (Figure 170) afin d'interagir cette fois avec la poche D2'.

1.1.2 Synthèses

La première étape vers la synthèse des composés **103** et **104** est l'obtention de l'intermédiaire **102** par condensation de la bromocétone **46** et du benzyl 2-amino-2-thioxoéthylcarbamate puis par déprotection du carbamate à l'aide d'une solution d'HBr à 25% dans l'acide acétique (Figure 172).

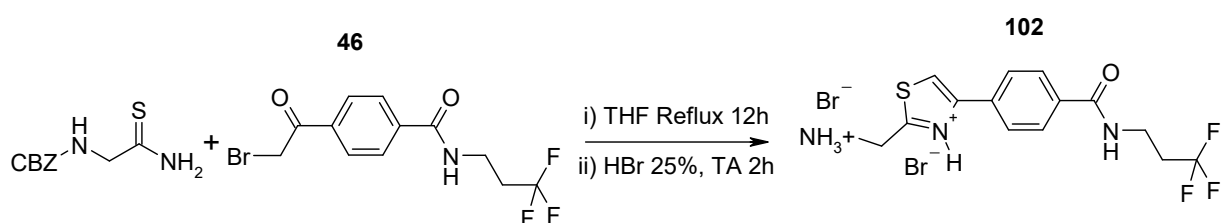


Figure 172 : Schéma de synthèse du composé **102**.

L'intermédiaire **102** n'est pas isolé et mis directement en réaction avec le chlorure d'acide sulfonique correspondant pour donner les composés **103** et **104** avec des rendements sur trois étapes de 67% et 76% respectivement (Figure 173).

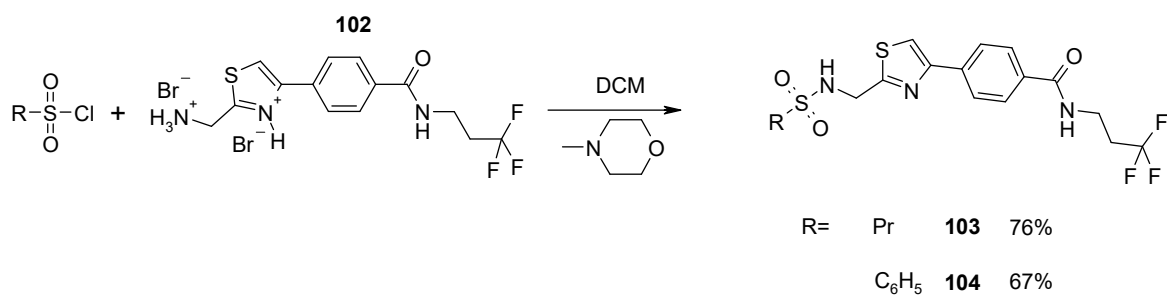


Figure 173 : Schéma de synthèse des composés **103** et **104**.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 39.

I.1.3 Résultats et discussion

Les composés **103** et **104** ont été évalués en TSA, en RPS et sur le test de potentialisation de l'éthionamide en présence de macrophages infectés.

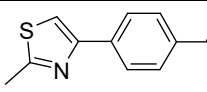
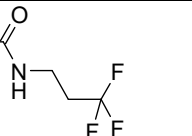
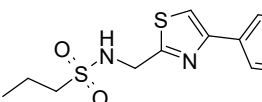
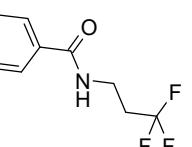
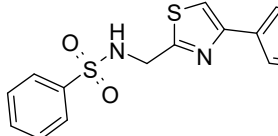
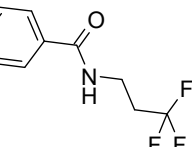
Composé	R1	R2	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)	HA	LE	IC ₅₀ (μM)
43			11.3	0.083	21	0.47	0.48±0.02
103			6.6	0.32	28	0.32	0.55±0.01
104			n.d.	0.15	31	0.31	0.51±0.07

Tableau 39 : Résultats biologiques obtenus pour les composés de la stratégie merging. n.d. : non déterminable

Le composé **103** est beaucoup moins actif sur le test d'affinité à la protéine ($\Delta(\Delta T_m) = -4.7^\circ\text{C}$) et 4 fois moins actif sur le test de potentialisation de l'éthionamide par rapport au composé **43** de référence. Cependant, il a montré une activité similaire ($IC_{50} = 0.56\mu\text{M}$) sur le test de RPS par rapport à ce composé ($IC_{50} = 0.48\mu\text{M}$).

Le composé **104** s'est montré peu soluble dans les conditions du test TSA, aucune valeur de ΔT_m n'a donc pu être mesurée pour ce composé. Il s'est révélé deux fois moins actif ($EC_{50} = 0.15\mu\text{M}$) sur le test intracellulaire et aussi actif ($IC_{50} = 0.51\mu\text{M}$) sur le test de RPS par rapport au composé de référence.

Le composé **103** a pu être co-cristallisé avec la protéine EthR (Figure 174). Comme nous l'avions supposé, la fonction sulfonamide forme bien une liaison hydrogène avec la Tyr148. La fonction amide se lie avec les asparagines 176 et 179 de manière identique au composé **43** utilisé pour la conception de ce composé. Néanmoins, la chaîne propyle n'occupe pas le domaine D2 à l'inverse de ce que supposait l'étude de modélisation. Il est difficile d'expliquer à la vue de ce mode de liaison pourquoi le composé **103** qui effectue une liaison hydrogène supplémentaire avec la Tyr148 par rapport au composé **43** de référence se montre moins affiné pour la protéine que ce dernier.

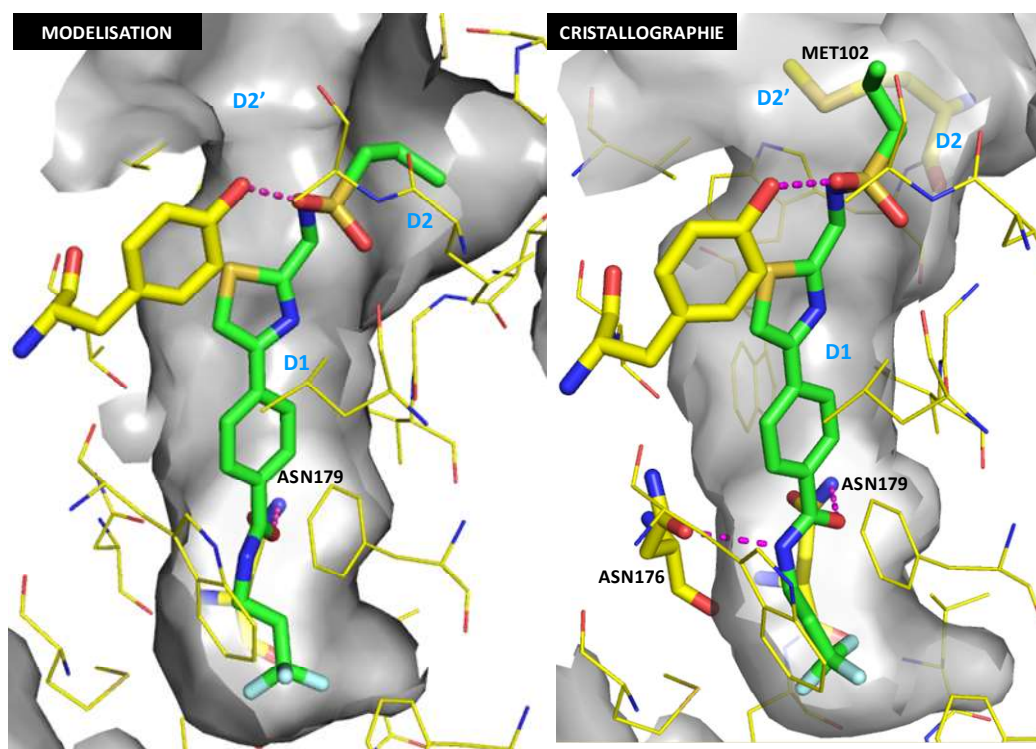


Figure 174 : Comparaison des modes de liaison du composé 103 modélisé par le logiciel MOE (à gauche) et obtenu par cristallisation (résolution 2.1Å) avec la protéine EthR (à droite).

Bien que la stratégie merging ait pu être validée par l'obtention d'un mode de liaison en accord avec les hypothèses formulées au départ, les analogues développés n'ont pas permis l'amélioration de l'activité du composé lead **43**. En effet, si les composés **103** et **104** restent actifs avec des EC_{50} de l'ordre de la centaine de nanomolaire, ils s'avèrent être beaucoup moins efficaces (LE de 0.32 et 0.31 respectivement) que le composé de référence (LE = 0.47). Nous avons donc envisagé une seconde stratégie afin de tirer profit de la molécule de fragment **1** se liant aux domaines D2 et D2'.

I.2 Stratégie de «fragment linking »

I.2.1 Stratégie

Nous avons recherché un second moyen de connecter le sulfonamide du fragment **1** occupant les domaines D2 et D2' aux ligands du domaine D1. Il a alors été envisagé de s'affranchir du cycle thiazole et de connecter ainsi le cycle phényle se liant dans le domaine D1 à la fonction sulfonamide du fragment **1** *via* un linker. Comme nous l'avons vu précédemment (p.122), la stratégie de fragment-linking a pour but de relier deux molécules se fixant dans deux poches de liaisons voisines avec pour objectif de générer un composé plus actif. La molécule finale doit en général conserver le mode de fixation des groupements fonctionnels contenus dans les fragments initiaux, pour pouvoir conserver l'activité spécifique due à chacun de ces groupements. L'additivité des activités est rarement observée et l'on constate plutôt un effet positif (positive binding) ou négatif (negative binding) lors de l'assemblage de deux fragments.

Dans ce genre de stratégie, l'étape la plus cruciale est le choix du linker. Ce dernier doit posséder la bonne longueur afin de permettre la fixation optimale des groupements des fragments initiaux participant à l'interaction avec la protéine. De plus, ce linker peut également apporter lui-même sa propre contribution à l'activité, mais il doit surtout ne pas créer d'interactions négatives avec la cible ni entraîner de gêne stérique.

Afin de s'affranchir du cycle thiazole et de connecter ainsi le cycle phényle se liant dans le domaine D1 à la fonction sulfonamide du fragment **1** les modes de liaison des composés **1** et **43** ont été superposés et ont permis de déterminer que le linker utilisé devait posséder une longueur d'environ 5.1Å (Figure 175).

La longueur entre l'atome de soufre du fragment **1** et l'atome de carbone terminal de la fonction alcyne est dans cette structure cristallographique de 4.8Å, nous avons donc émis l'hypothèse que la chaîne propargyle était en mesure de servir de linker.

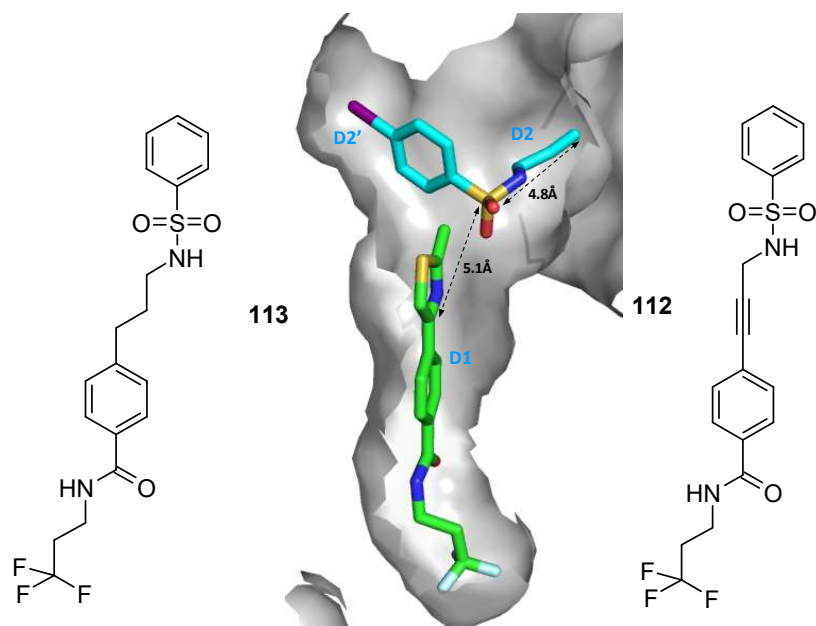


Figure 175 : Superposition du mode de liaison des composés 112 et 113, stratégie linking.

Le composé **112** (Figure 175) a alors été modélisé sur la structure de la protéine EthR (Figure 176), ce qui a confirmé sa capacité de ce composé à effectuer des liaisons hydrogène avec l'Asn179 et la Tyr148. Le groupement N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide occupe parfaitement le domaine de liaison D1 comme observé sur les composés de la série growing. Le cycle phényle de la partie supérieure n'occupe lui aucune des deux poches de liaison D2 ou D2'. On observe néanmoins une certaine torsion au niveau de la triple liaison de la fonction alcyne, ce qui nous a incité à concevoir également l'analogue alcane **113** (Figure 175) afin d'apporter d'avantage de flexibilité et donc de capacité d'adaptation du composé dans la poche de liaison. Cet analogue alcane a également été modélisé au sein de la poche de liaison (Figure 176). Il présente un mode de liaison similaire à l'alcyne **112** et peut également interagir avec les résidus Asn179 et Tyr148 grâce à des liaisons hydrogène.

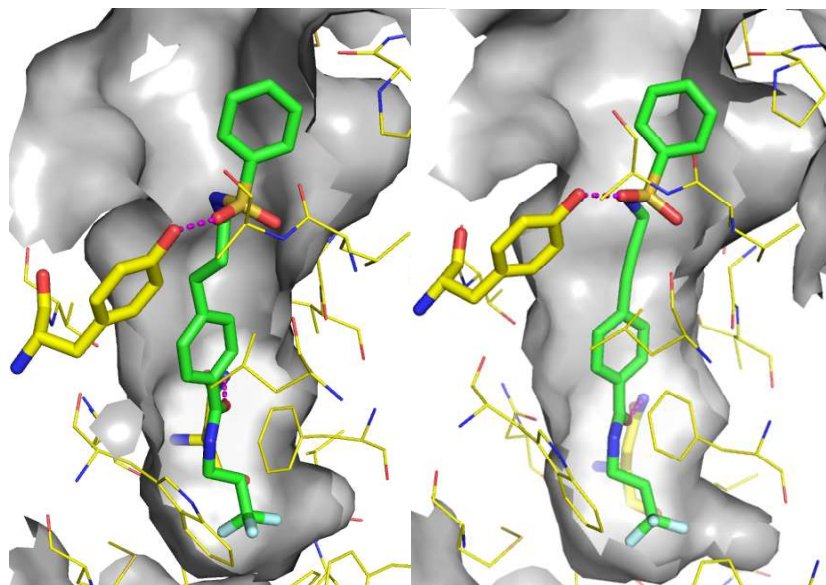


Figure 176 : Modélisation du mode de liaison de l'alcyne 112 (droite) et de l'alcane 113 (gauche) réalisée avec le logiciel MOE.

Aucune relation structure-activité n'étant connue pour les composés issus de cette famille, d'autres analogues ont également été envisagés (Figure 177). La fonction amide a notamment été remplacé par une fonction sulfonamide (composé **106**). Les composés envisagés dans cette famille possèdent une taille beaucoup plus importante ($384 < MW < 446$) que ceux issus des autres familles ($MW < 380$). Nous avons vu précédemment, avec les composés issus de la click-chemistry *in situ* (p.92) notamment, qu'une taille trop importante pouvait conduire à des produits inactifs sur test cellulaire, ceux-ci étant peu solubles et pouvant rencontrer des problèmes de passages membranaires. Ainsi nous avons envisagé de synthétiser des analogues plus courts du composé **106** (**108** et **110**, Figure 177) en conservant les fonctions sulfonamides qui interviennent dans les liaisons hydrogène avec la protéine.

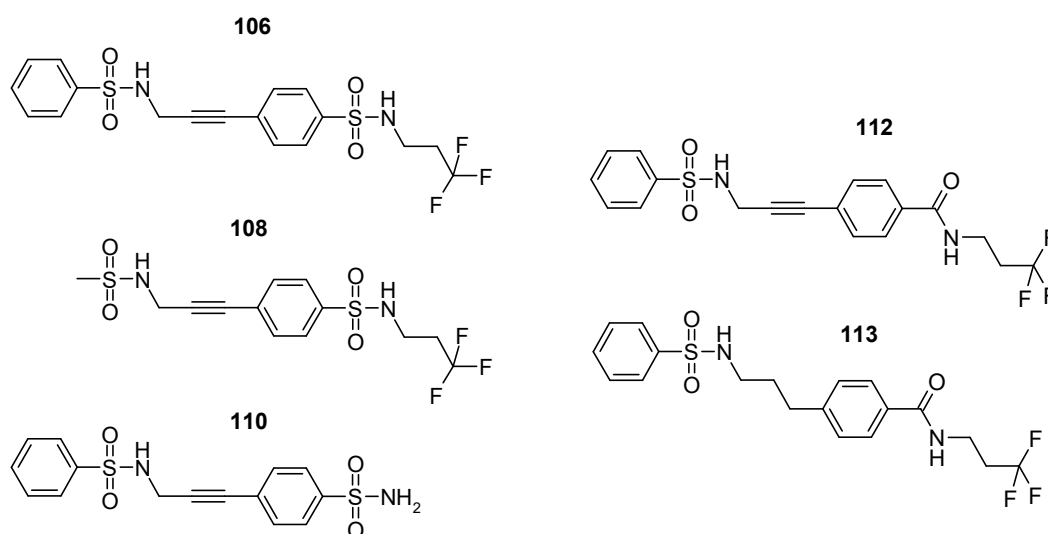
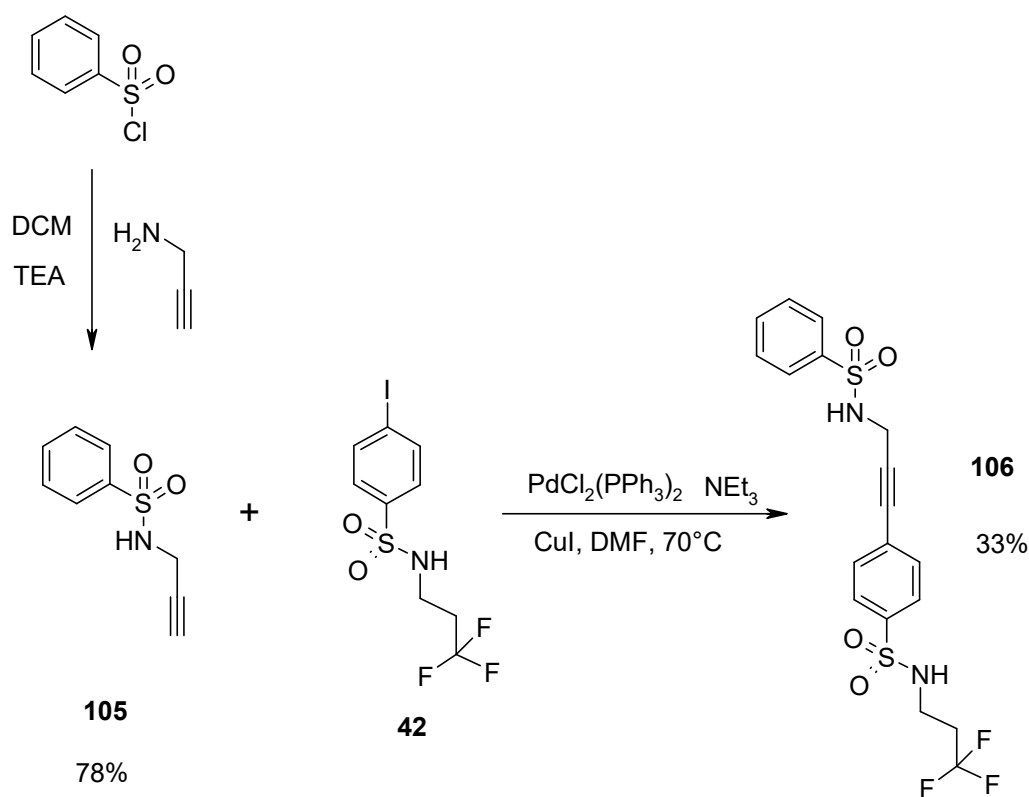


Figure 177 : Produits envisagés pour la stratégie de « fragment linking ».

I.2.2 Synthèses

La synthèse du composé **106** (Figure 178) a été réalisée de manière convergente. Tout d'abord, l'alcyne **105** a été obtenu avec un rendement de 78% par couplage entre le chlorure d'acide benzènesulfonique et la propargylamine dans le DCM en présence de triéthylamine. Le dérivé iodé **42** a été préparé dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 105, p.179). Enfin, un couplage de type Sonogashira²⁶⁴ a permis d'assembler les deux synthons pour former le composé souhaité avec un rendement de 33% (Figure 178).

Figure 178 : Schéma de synthèse du composé **106**.

Le cycle catalytique de la réaction de Sonogashira est présenté dans la Figure 179 ci-dessous.

²⁶⁴ K. Sonogashira, *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, 653 (1-2), 46-49.

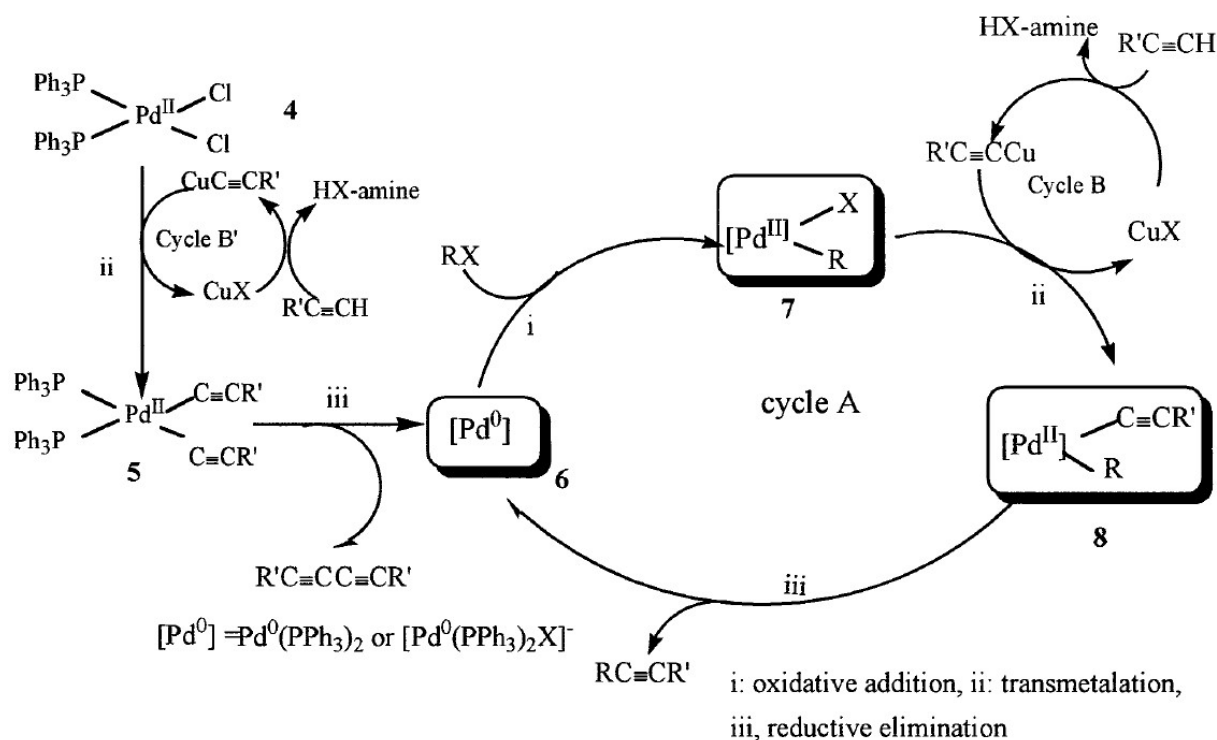


Figure 179 : Cycle catalytique de la réaction de Sonogashira.²⁶⁴

Cette réaction fait intervenir trois cycles catalytiques A, B et B'. Il est supposé que cette réaction suit, comme beaucoup de réactions de formation de liaisons C-C pallado-catalysées, un processus initié par une étape d'addition oxydante et suivie d'une étape d'élimination réductrice (cycle A). Le Pd⁰ mis en jeu est généré à partir du composé 4 par une double transmétallation suivie d'une élimination réductrice. Le Pd⁰ donne ensuite l'intermédiaire 7 par addition oxydante du dérivé halogéné RX. Le composé 7 subit ensuite une réaction de transmétallation (étape cinétiquement limitante) par l'acétylure de cuivre formé lors du cycle B pour former l'intermédiaire 8 qui se décompose par élimination réductrice pour former le produit souhaité et régénérer le Pd⁰.

Afin d'augmenter le rendement de la réaction assez faible (33%) de la réaction de Sonogashira, des essais ont été réalisés avec du palladium encapsulé sur une matrice de polyurée.

Le précurseur **107** a été obtenu avec un rendement de 37% par couplage entre la propargylamine et le chlorure d'acide méthanesulfonique. Cet intermédiaire a ensuite été engagé avec le dérivé iodé **42** dans un couplage de type Sonogashira en présence de palladium encapsulé (Figure 180) afin de fournir le composé **108** avec un rendement de 27%.

Dans ce cas la, l'utilisation de palladium encapsulé n'a pas permis d'augmenter le rendement de la réaction. Néanmoins, les catalyseurs encapsulés de la sorte peuvent présenter trois avantages majeurs :

- Ils sont plus stable lors du stockage et ne nécessite souvent pas l'utilisation d'être utilisés sous atmosphère inerte.
- Ils peuvent être filtrés en fin de réaction, lavés et réutilisés.
- On observe une contamination moindre des produits en catalyseur.

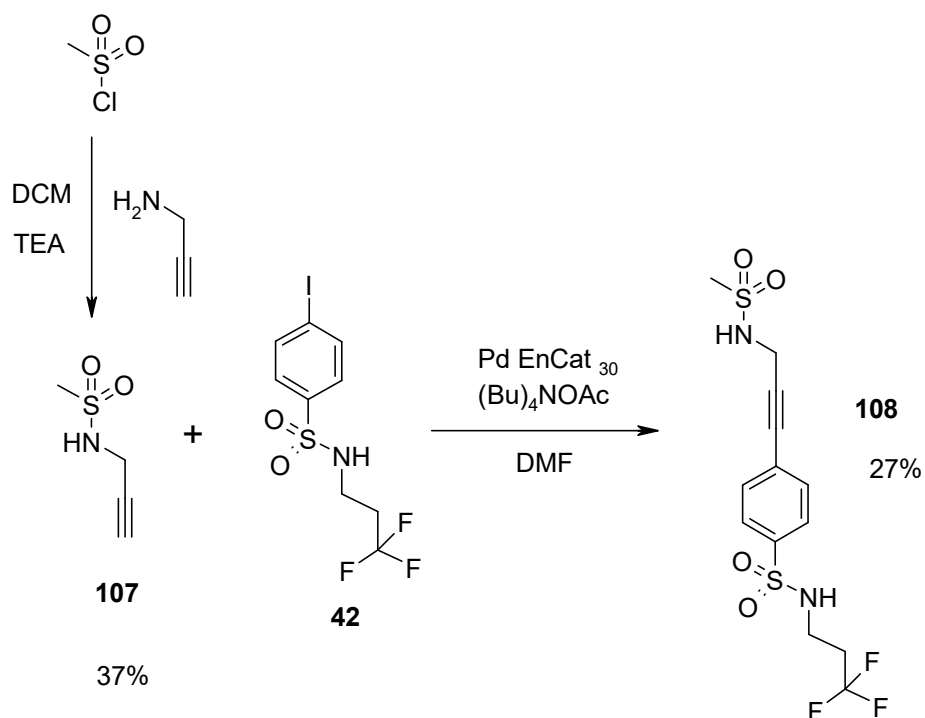
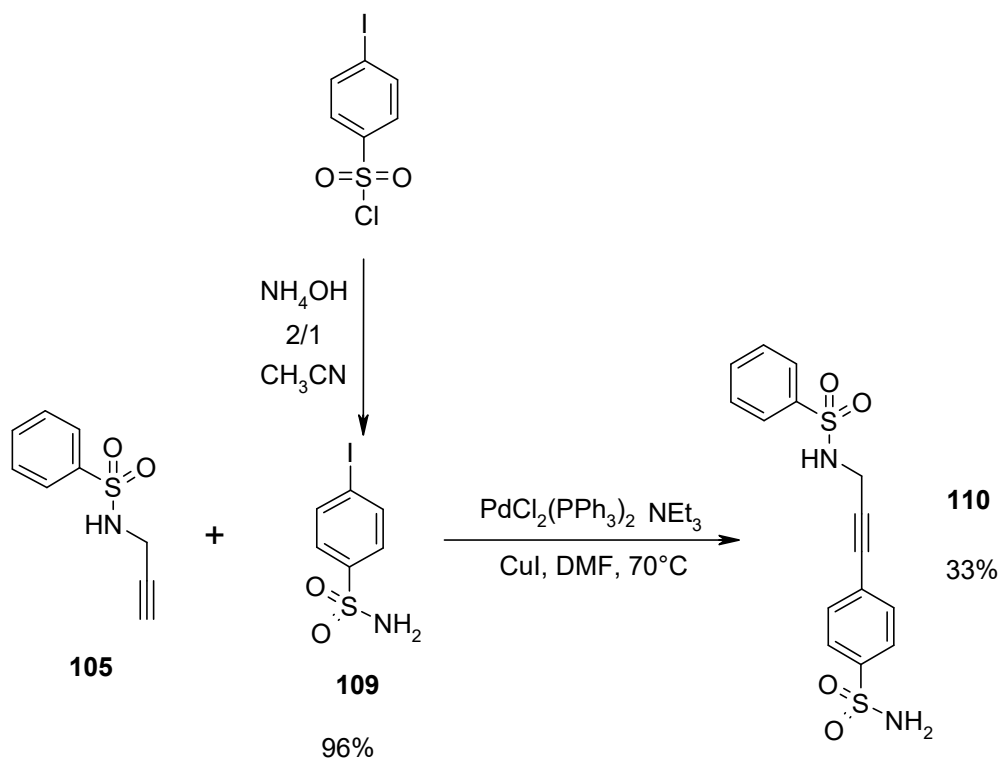


Figure 180 : Schéma de synthèse du composé 108.

L'utilisation de palladium encapsulé n'ayant pas permis d'augmenter le rendement de la réaction de Sonogashira, les réactions suivantes ont été effectuées avec du palladium classique.

Figure 181 : Schéma de synthèse du composé **110**.

La synthèse de l'analogue **110** s'effectue également de manière convergente. Tout d'abord, l'alkyne **105** est synthétisé comme précédemment (Figure 178) et le dérivé iodé **109** (Figure 181) est obtenu avec un rendement de 96% par réaction du chlorure d'acide 4-iodobenzènesulfonique en présence d'hydroxyde d'ammonium dans l'acétonitrile. Les deux précurseurs sont ensuite assemblés grâce à un couplage de Sonogashira pour fournir le composé **110** souhaité avec un rendement de 33%.

L'analogue amide **112** a été synthétisé avec un rendement de 29% grâce à un couplage de Sonogashira (Figure 182) entre le dérivé iodé **111**, obtenu avec un rendement de 77% par couplage entre la trifluoropropylamine et l'acide 4-iodobenzoïque en présence d'HBTU et de quantité catalytique d'HOBt, et l'alkyne **105**.

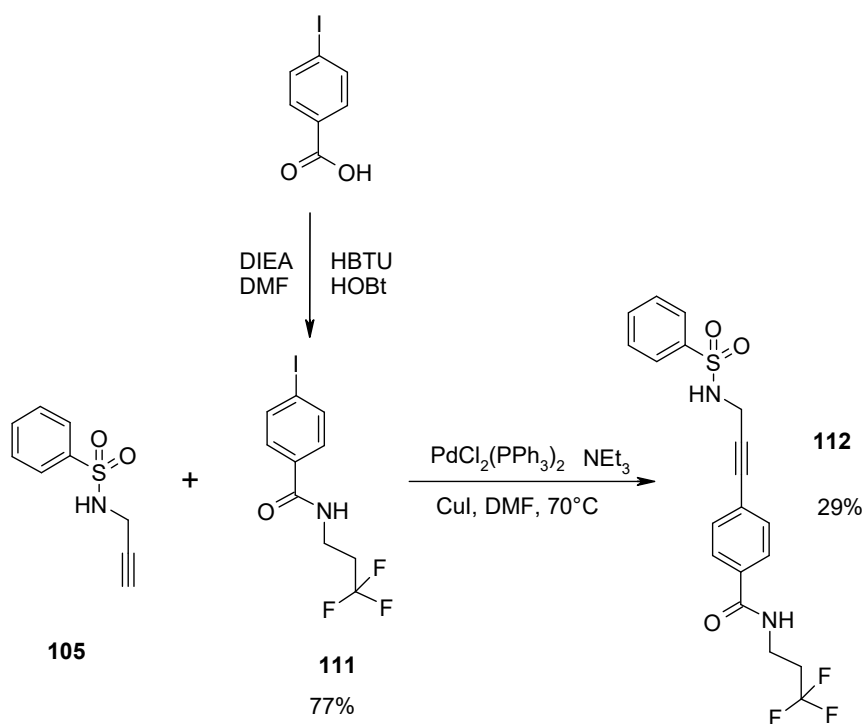


Figure 182 : Schéma de synthèse du composé 112.

La fonction alcyne du composé **112** a par la suite été hydrogénée à l'aide d'un réacteur à flux continu H-cube, en présence de Pd 10%/C à température ambiante. L'alcane **113** a été obtenu avec un rendement de 97%.

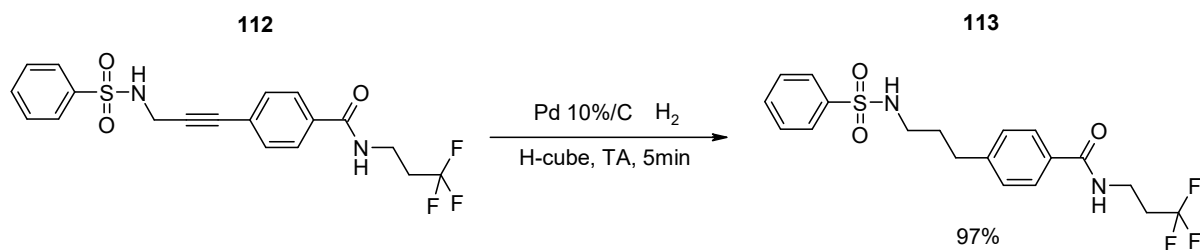
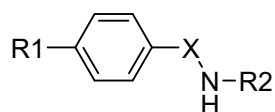


Figure 183 : Schéma de synthèse du composé 113.

Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le Tableau 40.

I.2.3 Résultats et discussion



Composé	R1	R2	X	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM) macrophages	EC ₅₀ (μM) bactéries	HA	LE
1	I		SO ₂	0.1	>20	n.t.	14	-
106			SO ₂	3.3	1.8	n.t.	29	0.28
108			SO ₂	1.4	>10	n.t.	24	-
110		H	SO ₂	0.1	>10	n.t.	23	-
112			CO	4.2	0.23	0.59	28	0.33
113			CO	n.t.	n.t.	>2.5	28	-

Tableau 40 : Résultats biologiques obtenus pour les composés de la série linking.

Le composé **106** ($\Delta T_m=3.3^\circ\text{C}$ $EC_{50}=1.8\mu\text{M}$) et son analogue amide **112** ($\Delta T_m=4.2^\circ\text{C}$ $EC_{50}=0.23\mu\text{M}$) se sont montrés les plus actifs sur le test d'affinité à la protéine mais également sur le test de potentialisation de l'éthionamide. Comme nous l'avons remarqué dans la stratégie growing, le remplacement de la fonction sulfonamide par une fonction amide permet d'augmenter fortement l'activité. Un gain de 0.9°C sur le test TSA et une amélioration de l'activité sur test intracellulaire d'un facteur 9 ont pu être observés entre les composés **106** et **112**. Ce gain d'activité entraîne également une augmentation de l'efficacité (LE=0.33 pour le composé **112** contre 0.28 pour le composé **106**).

La réduction de la taille des composés provoque une diminution de l'activité. En effet, les composés **108** ($\Delta T_m=1.4^\circ\text{C}$ $EC_{50}>10\mu\text{M}$) et **110** ($\Delta T_m=0.1^\circ\text{C}$ $EC_{50}>10\mu\text{M}$) sont beaucoup moins actifs que l'analogue complet **106**.

Enfin, le composé **113**, issu de la réduction de la chaîne propargyle du composé **112** a seulement été testé sur le test de potentialisation de l'éthionamide sur *M. tuberculosis*. Il s'est révélé inactif ($EC_{50} > 2.5 \mu M$) par rapport à l'analogue **112** ($EC_{50} = 0.59 \mu M$). Ce résultat n'est pas en accord avec les valeurs d' IC_{50} obtenues sur le test de RPS. Le composé **113** présente sur ce test une activité ($IC_{50} = 1.6 \mu M$) meilleure que le composé **112** ($IC_{50} = 3.9 \mu M$). Le composé **113** possède dix liaisons à libre rotation et atteint donc la valeur maximale fixée par les règles de Veber. Les propriétés physico-chimiques de ce composé limitent peut-être son passage membranaire et donc son activité.

Le composé **106** a pu être co-cristallisé avec la protéine EthR (Figure 184). Comme nous l'avions supposé, la chaîne trifluoropropyle occupe le bas du domaine de liaison D1, la fonction sulfonamide formant une liaison hydrogène avec l'asparagine 179. La chaîne propargyle utilisée comme linker vient positionner la seconde fonction sulfonamide de manière idéale pour former une seconde liaison hydrogène avec la chaîne latérale de la tyrosine 148. Le cycle phényle supérieur se loge au sein de la poche D2' de manière similaire au mode de liaison du fragment **1**.

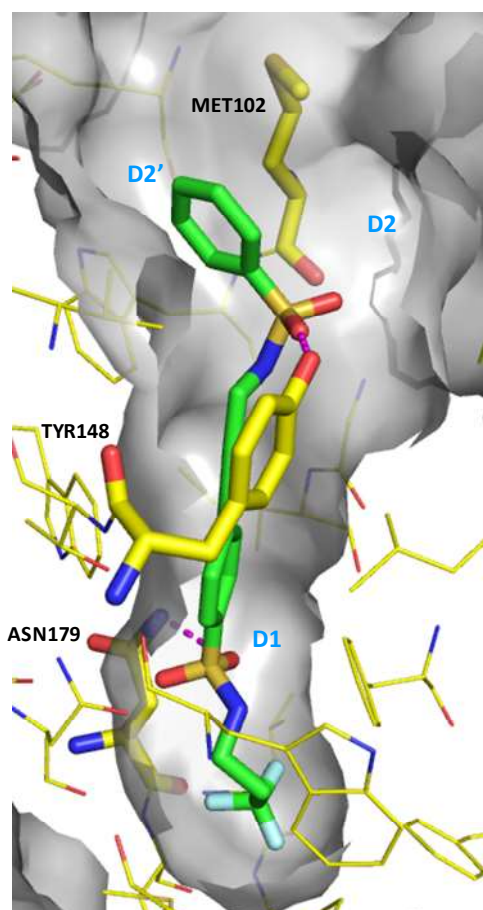


Figure 184 : Mode de liaison du composé **106** obtenu par co-cristallisation avec la protéine EthR (résolution 2.4Å).

Les analogues plus courts **108** et **110** sont moins actifs que le composé **106** mais néanmoins, le dérivé **108** a montré une légère activité ($\Delta T_m=1.4^\circ\text{C}$) dans le test d'affinité à la protéine et a également pu être cocrystallisé avec la protéine EthR (Figure 185).

Le composé **108** se lie de manière similaire au composé **106**. La différence d'activité observée peut donc être attribuée à la perte du cycle phényle et aux interactions hydrophobes qu'il forme au sein du domaine D2'.

De même, la chaîne trifluoropropyle s'avère être également indispensable à l'activité, en effet, le composé **110** perd toute activité.

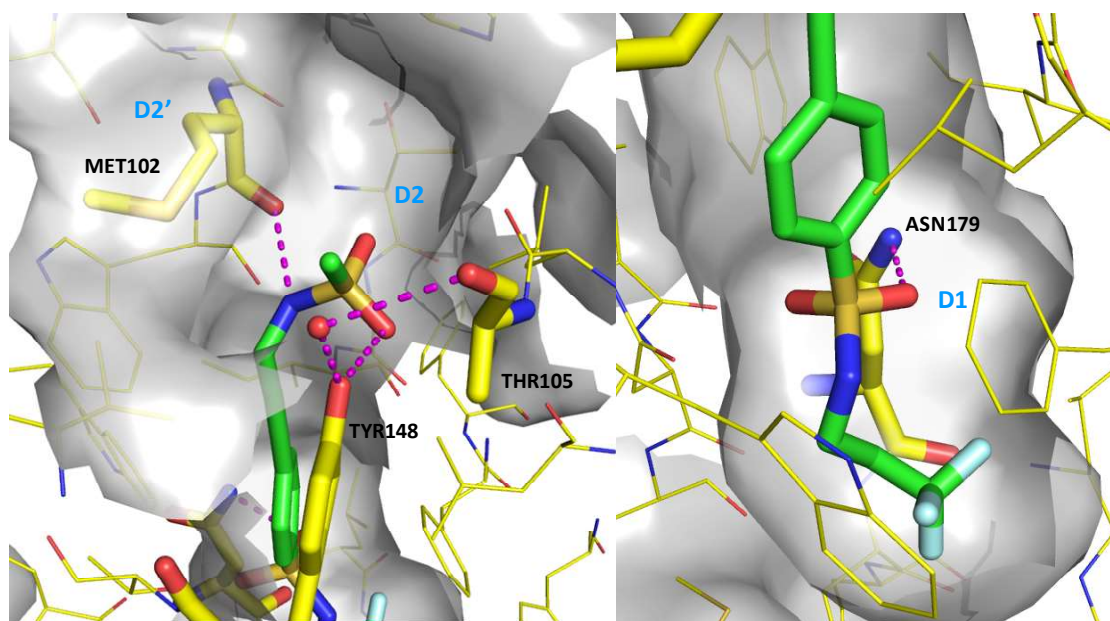


Figure 185 : Mode de liaison du composé **108** obtenu par co-cristallisation (résolution 1.9Å).

Enfin, l'analogue amide **112** a également pu être co-cristallisé avec la protéine EthR (Figure 186). L'analyse de la structure révèle que de manière similaire à ce qui a été observé dans la série growing, l'introduction d'une fonction amide au niveau de la chaîne trifluoropropyle permet la création d'une liaison hydrogène supplémentaire avec l'asparagine 176. La fonction sulfonamide de la partie supérieure de la molécule forme cette fois une liaison hydrogène avec la tyrosine 148 par l'intermédiaire de son atome d'azote et non plus par un atome d'oxygène, par opposition au composé **106**. Le cycle phényle occupe toujours le domaine D2' comme dans le mode de liaison du fragment **1**.

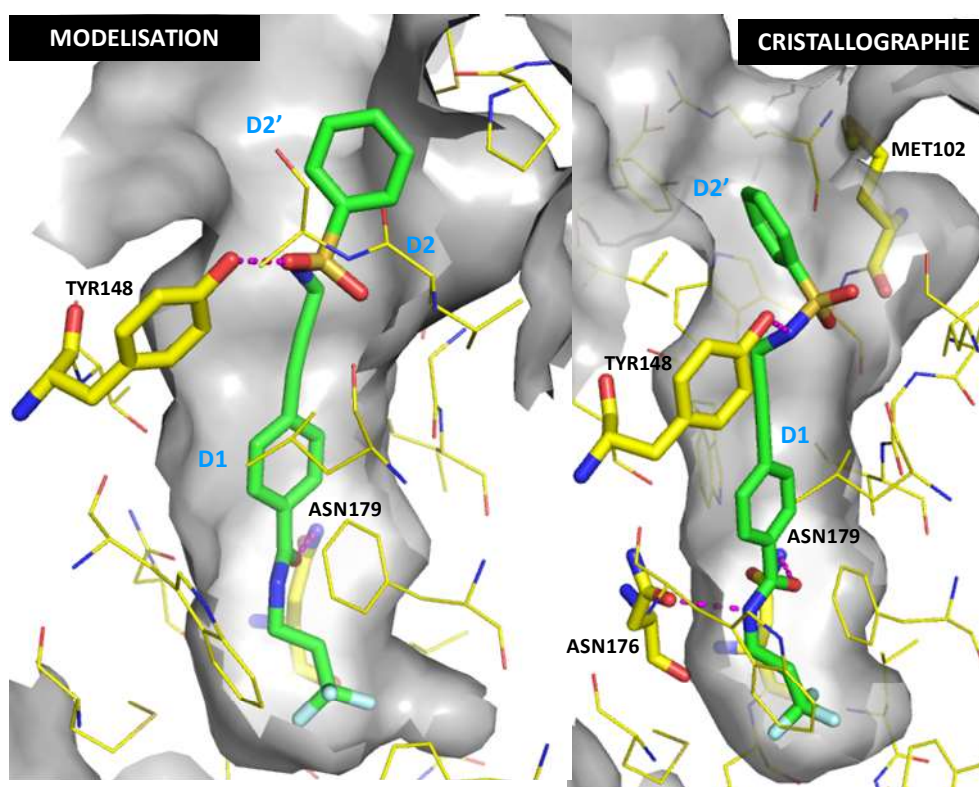


Figure 186 : Comparaison du mode de liaison du composé **112** obtenu par modélisation (à gauche) et par co-cristallisation (à droite, résolution 1.9Å).

1.3 Conclusion

La stratégie de fragment linking a été validée notamment par l'obtention de modes de liaison en accord avec les hypothèses de départ. Néanmoins, les composés synthétisés se sont montrés moins actifs, malgré leur capacité à interagir à la fois avec l'asparagine 179, l'asparagine 176 et la tyrosine 148. Seul le composé **112** a montré une activité inférieure au micromolaire sur le test de potentialisation de l'éthionamide ($EC_{50}=0.23\mu\text{M}$). Ce composé possède un coefficient d'efficacité ($LE=0.33$) supérieur à la limite usuellement admise ($LE=0.30$) mais de loin inférieur aux composés issus de la série growing ($LE>0.4$). L'une des hypothèses qui peut être avancée pour expliquer ces différences d'activité est la taille trop importante de ces dérivés qui peut être un frein au passage des parois de la bactérie et du macrophage. Ce phénomène a déjà été observé dans d'autres familles de composés.

II Bibliographie

264. Sonogashira, K., Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, 653 (1-2), 46-49.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de développer une nouvelle famille d'inhibiteurs de la protéine EthR possédant un profil de risque différent de la famille Lead1 de référence qui est actuellement en phase d'évaluation préclinique. Pour cela, une approche par fragment a été initiée à partir du composé **1**, préalablement identifié.

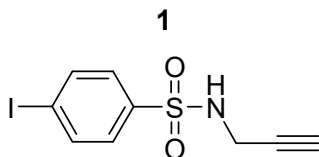


Figure 187 : Structure du fragment 1, point de départ de l'approche par fragment.

Nous avons constaté par co-cristallisation que deux molécules du composé **1** étaient capables de se lier simultanément au sein du domaine de régulation du répresseur EthR (Figure 188). Cela nous a permis de mettre en évidence un nouveau mode de liaison à la protéine. En effet, l'un des fragments se lie à l'asparagine 179 en occupant le domaine de liaison D1 comme les composés de la famille Lead1. Le second fragment occupe lui les poches D2 et D2' en se liant à la tyrosine 148. L'existence de cette poche D2' n'avait jamais été observée jusqu'alors car elle était usuellement occupée par une méthionine.

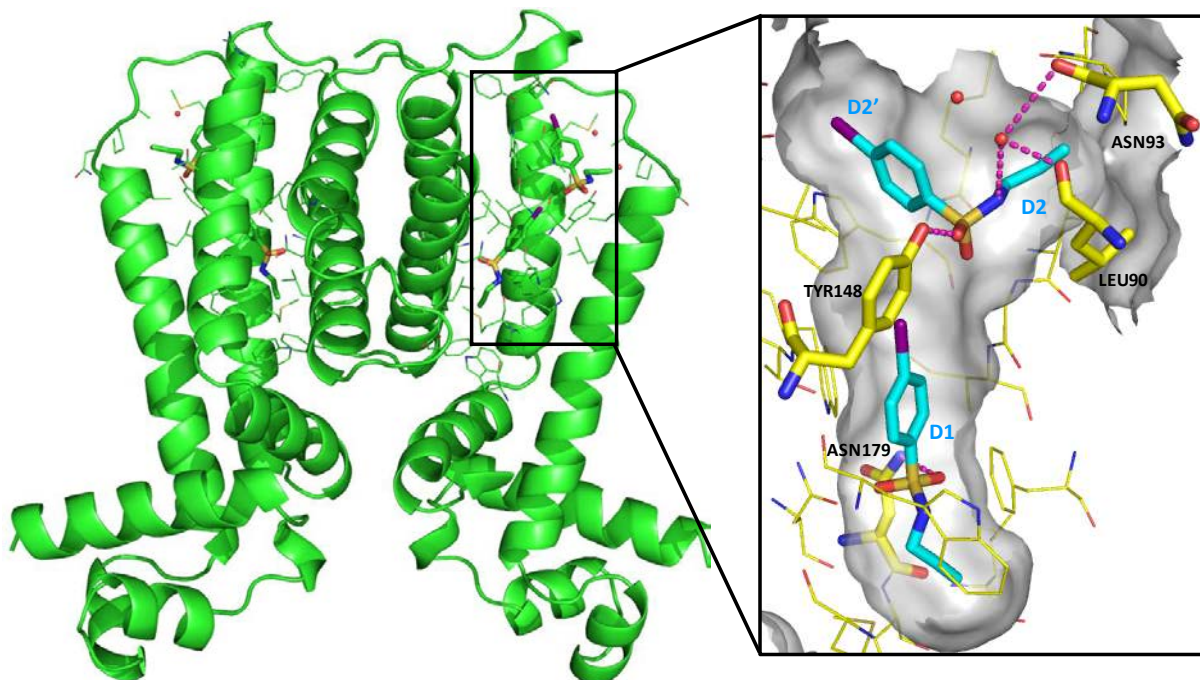


Figure 188 : Occupation du domaine de régulation d'EthR par deux molécules de fragment 1.

A partir du composé se liant dans le domaine D1, une chimiothèque virtuelle de 976 composés (Figure 189) a été conçue et criblée sur la structure radiocristallographique de la protéine, et a permis d'identifier le composé **6** (Figure 190).

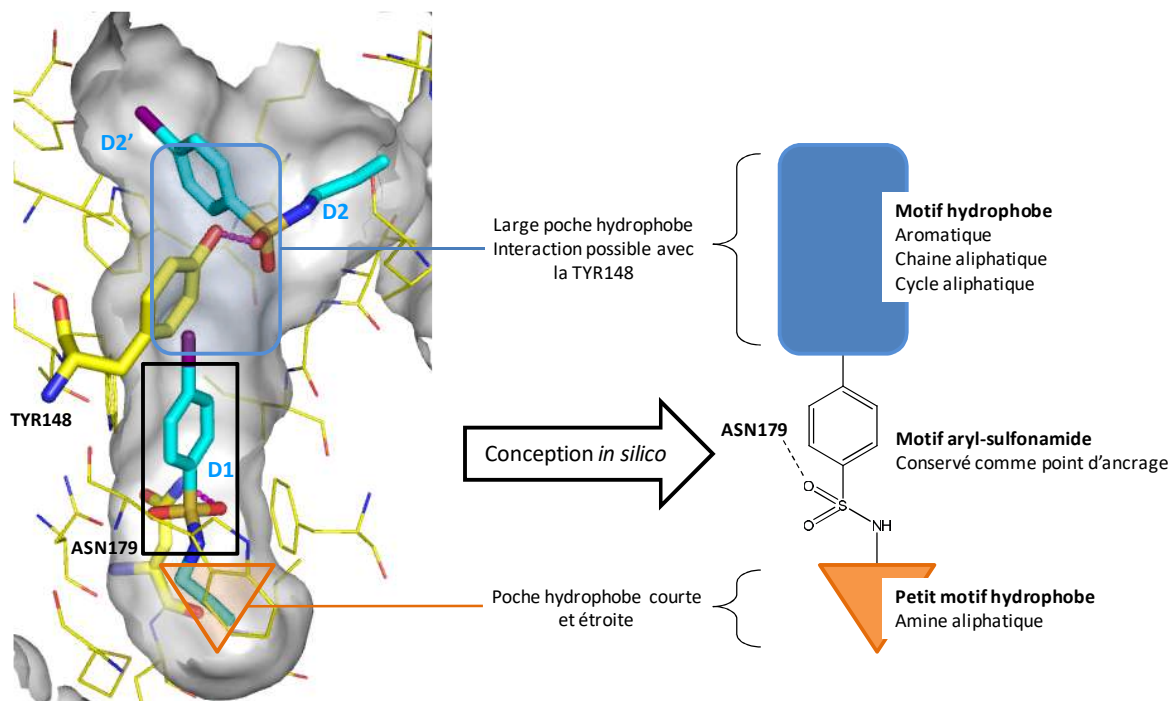


Figure 189 : Conception de la chimiothèque virtuelle autour de la structure du composé **1**.

L'optimisation des différents éléments structuraux du composé **6** a permis d'augmenter fortement son activité pour aboutir au composé **43**, qui s'est révélé plus actif que le composé **6** sur tous les tests. Il a notamment montré une activité 60 fois supérieure sur le test de potentialisation de l'éthionamide (EC_{50} de $0,083\mu\text{M}$ contre $4,9\mu\text{M}$ pour le composé **6**). La création d'une seconde liaison hydrogène avec l'asparagine 176 a pu être observée en co-cristallisant le composé **43** avec EthR.

Le composé **43** a répondu à tous les critères pharmacodynamiques, physico-chimiques et pharmacocinétiques du profil fixé en début d'optimisation. Néanmoins, la stabilité microsomale du composé reste à améliorer ($t_{1/2} = 10\text{min}$).

Certains analogues du composé **43** ont montré une activité identique, notamment le composé **65** possédant un cycle 1,2,4-oxadiazole (Figure 190).

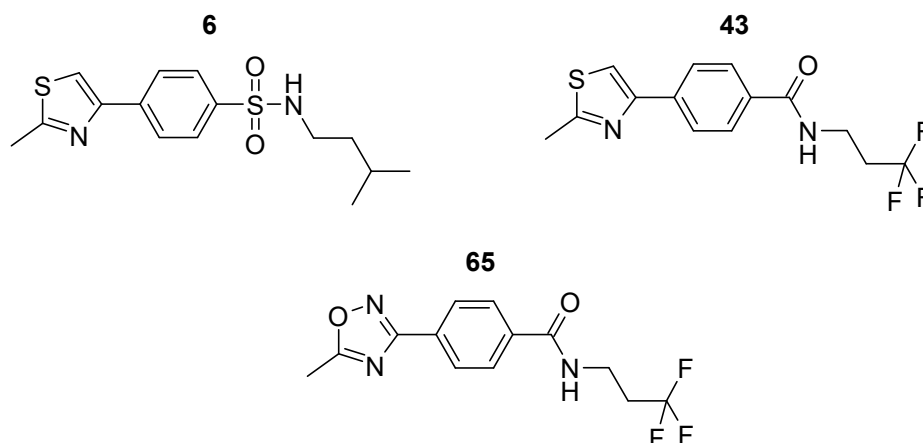


Figure 190 : Structure des composés 6, 43 et 65.

Afin de tirer profit du mode de liaison original du second fragment occupant les domaines D2 et D2' et se liant à la tyrosine 148, deux nouvelles approches dites de « fragment merging » et de « fragment linking » ont été mises en œuvre. Ces approches se sont également appuyées sur le mode de liaison du composé 43 afin d'utiliser les deux liaisons hydrogène formées avec les asparagines 176 et 179.

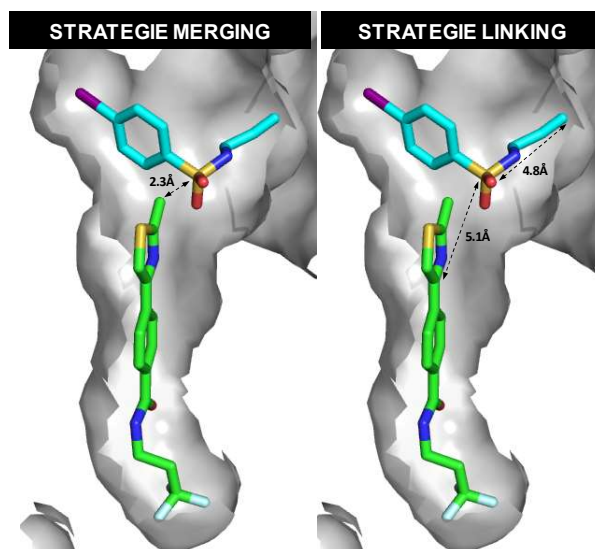


Figure 191 : Les stratégies de « fragment merging » (à gauche) et de « fragment linking » (à droite) développées à partir du composé 43 et du composé 1.

Les modes de liaison supposés des composés de cette famille ont pu être vérifiés par co-cristallisation avec la protéine EthR. Nous avons ainsi réussi dans ces approches à combiner les modes de liaison obtenus pour les composés 1 et 43.

Pour comparer les meilleurs composés issus des trois stratégies growing, merging et linking, plusieurs paramètres ont été confrontés :

- L'activité des composés (pEC₅₀ sur macrophages infectés par *M. tuberculosis*).
- L'efficacité LE.
- Les paramètres classiquement utilisés pour définir les propriétés drug-like d'une molécule (paramètres de Lipinski et Veber : la masse molaire (MW), cLogP, la Surface Polaire (PSA), le nombre d'accepteurs de liaisons Hydrogène (H_Acc), de donneurs de liaisons Hydrogène (H_Don), de liaisons à libre rotation (Nrot)). Ces paramètres ont été calculés à l'aide du logiciel Pipeline Pilot.

Dans chaque série, les composés les plus efficaces (**43**, **103** et **112**) ont été sélectionnés (Figure 192). Les données sont présentées dans le Tableau 41.

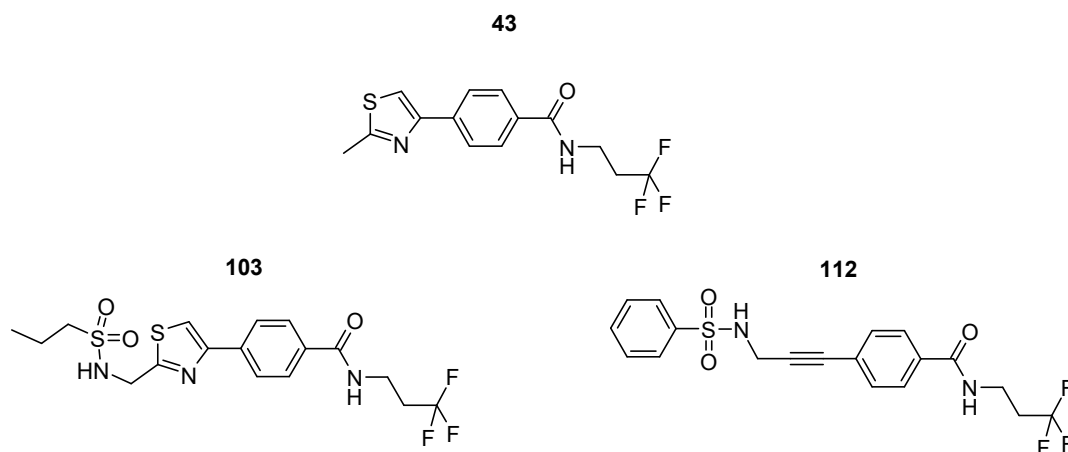


Figure 192 : Composés utilisés pour la comparaison des trois stratégies growing, linking et merging.

Composé	MW	cLogP	PSA (Å ²)	H_Acc	H_Don	Nrot	HA	pEC ₅₀ ^a	LE
43	314.33	2.42	70.22	2	1	5	21	7.08	0.47
103	435.39	2.14	124.78	4	2	10	28	6.64	0.33
112	410.42	2.84	83.65	3	2	9	28	6.82	0.34

Tableau 41 : Comparaison des composés issus des stratégies growing et linking.^aEC₅₀ mesurée sur des macrophages infectés par *M. tuberculosis* en présence de 0.1µg/mL d'ETH (CMI/10).

On note tout d'abord que le composé **43** issu de la série growing présente une meilleure capacité à potentialiser l'activité de l'éthionamide d'un facteur dix sur macrophages infectés (pEC₅₀ = 7.08) que les composés **103** et **112** issus des stratégies merging et linking (pEC₅₀ = 6.64 et 6.82 respectivement). De plus, ce composé présente un nombre d'atomes lourds (HA) plus faible ce qui le rend plus efficace (LE = 0.47) que les composés des stratégies linking ou merging (LE < 0.34).

En termes de propriétés physico-chimiques, ces molécules issues des stratégies linking ou merging se rapprochent des limites définies par Veber, notamment le composé **103** qui présente un nombre de liaisons à libre rotation égal à dix et une surface polaire de 124,78Å² (contre 10 et 140Å² autorisés dans les règles définies par Veber). La marge de manœuvre disponible pour l'optimisation de ces composés est donc plus restreinte que pour les molécules issues de la stratégie growing.

Bien que les stratégies de « fragment linking » et « fragment merging » aient conduit à des composés présentant des activités inférieures au micromolaire, la forte augmentation en masse moléculaire inhérente à ces stratégies entraîne une détérioration des propriétés physico-chimiques des composés. De plus, ces stratégies sont limitées d'un point de vue de l'introduction de la diversité. En effet, le nombre de linkers possédant la géométrie nécessaire et facilement accessibles chimiquement est réduit. De nombreux exemples de la littérature rapportent également le fait que la stratégie de « fragment-growing » se révèle souvent plus efficace dans le développement de candidats médicament.

La stratégie de fragment-growing a donc permis d'aboutir rapidement à des molécules possédant des activités de l'ordre du nanomolaire et répondant au profil fixé en début d'optimisation. La stabilité microsomale reste le seul paramètre à améliorer. La mesure des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques des derniers analogues issus de la stratégie growing, et notamment du composé oxadiazole **65** qui a montré la meilleure activité, est actuellement en cours. Si l'un de ces

composés répond au profil désiré, une étude sur un modèle de souris infectées par *M. tuberculosis* sera alors envisagée.

Partie expérimentale

I Analyses et Purifications

I.1 Synthèse micro-ondes

La synthèse micro-ondes a été réalisée sur un four micro-ondes CEM Discover™.

I.2 Analyse par chromatographie sur couche mince

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'une couche de 0,25mm d'épaisseur de gel de silice 60 F₂₅₄ Merck.

I.3 Analyses LC-MS

Les analyses par LC-MS ont été réalisées sur deux appareils :

-Un appareil Varian 1200ws triple quadrupole. La détection UV se fait aux longueurs d'ondes 215 et 254nm.

-Un appareil Waters Alliance Micromass ZQ 2000. La détection se fait à l'aide d'un système Waters 2996 diode array.

Ces appareils sont équipés d'une colonne C18 TSK-gel Super ODS 2 μ m (50 x 4.6mm) ou d'une colonne XBridge C18 (Waters) 5 μ m (50x4.6mm). Les volumes d'injection sont de 20 μ L.

Deux gradients ont été utilisés :

-10min : 100% H₂O / 0.1% HCOOH jusqu'à 95% ACN / 0.1% HCOOH en 7 minutes avec un débit de 1 mL.min⁻¹.

-5min : 100% H₂O / 0.1% HCOOH jusqu'à 95% ACN / 0.1% HCOOH en 3 minutes avec un débit de 2mL.min⁻¹.

Méthode a : Varian, gradient 10min, colonne SODS

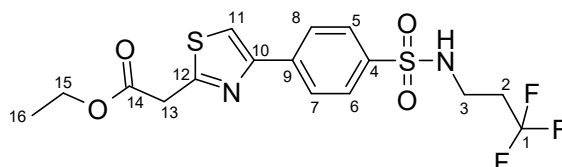
Méthode b : Waters, gradient 10min, colonne SODS

Méthode c : Waters, gradient 5min, colonne XBridge

Méthode d : Waters, gradient 10min, colonne XBridge

I.4 Analyses RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été effectués sur un spectromètre Brücker DRX 300MHz. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au TMS et les constantes de couplage J en Hz (Hertz). Les pics sont décrits selon le modèle : δ (nature du massif, nombre de protons par intégration, J, X). X correspond à la numérotation de l'atome en question sur la molécule, exemple :



X=1 correspond aux atomes de fluor portés par le Carbone 1 en RMN du fluor et au carbone 1 lui-même en RMN du carbone.

Les abréviations suivantes ont été utilisées pour la multiplicité des signaux : s=singulet, d=doublet, t=triplet, q=quadruplet, qn=quintuplet, sx=sextuplet, sp=septuplet, n=nonuplet, br=broad (large).

I.5 Purification par chromatographie sur colonne de silice prépaquée

Les chromatographies sur colonne de silice prépaquées ont été réalisées sur des colonnes de marque AIT Chromato de granulométrie 20 à 40 μm ou Grace Reveleris de granulométrie 40 μm , à l'aide d'une pompe Flashmart.

I.6 Purification par Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC)

Les purifications par HPLC préparative ont été réalisées à l'aide d'un appareil Varian ProStar utilisant une colonne Omnisphere 10 C₁₈ 250mm x 41.4mm Dynamax. Le gradient utilisé part d'un mélange (20% d'Acétonitrile/80% d'Eau/0.1% d'Acide formique) jusqu'à un mélange (100% Acétonitrile/0.1% Acide formique). La détection est réalisée aux longueurs d'onde 215 et 254 nm.

I.7 Point de fusion

Les points de fusion des produits recristallisés ont été mesurés par la méthode des capillaires, sur un appareil Büchi B-540.

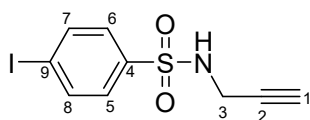
II Synthèses

Dans cette partie sont reportées les synthèses et analyses des différents composés présentés dans ce mémoire.

Les données RMN sont décrites comme expliqué dans le chapitre « Analyses RMN » p.280

Tous les composés finaux possèdent une pureté > 95% en détection UV (215 nm)

▪ **Composé 1 : 4-iodo-N-(prop-2-ynyl)benzènesulfonamide**

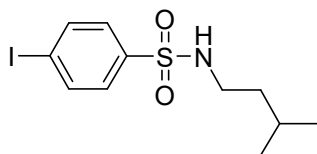


318 μ L (1.5eq.) de propargylamine sont ajoutés à une solution de 1g (1eq.) de chlorure d'acide 4-iodobenzènesulfonique et de 2.30mL (4eq.) de DIEA dans 30mL de DCM. Le mélange est alors agité pendant 1h à TA. Le DCM est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le solide beige obtenu est alors purifié par HPLC préparative pour donner 854mg (80%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.70$ min (méthode c) ; m/z : $[M-H]^- = 320$

RMN 1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 7.94 (d, 2H, $^3J = 8.60$ Hz, 7+8); 7.62 (d, 2H, $^3J = 8.60$ Hz, 6+5); 4.88 (br s, 1H, NH); 3.88 (dd, 2H, $^4J_{3-1} = 2.50$ Hz, $^3J_{3-NH} = 6.10$ Hz, 3); 2.20 (t, 1H, $^4J_{1-3} = 2.50$ Hz, 1)

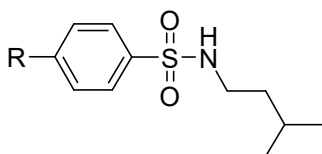
RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75MHz) : δ ppm = 139.5 (4); 138.4 (7+8); 128.7 (6+5); 100.2 (9); 77.8 (2); 72.9 (1); 32.9 (3)

▪ **Composé 2 : 4-iodo-N-isopentylbenzènesulfonamide**

210 μ L (1eq.) de 3-méthylbutanamine sont solubilisés dans dans 14mL de DMF anhydre. 594 μ L (3eq.) de N-méthylmorpholine et 551.29mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-iodobenzènesulfonique sont ajoutés au milieu réactionnel qui agité pendant 24h à TA. 20mL d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ sont ajoutés. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle (3x50mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 448mg (70%) du produit désiré.

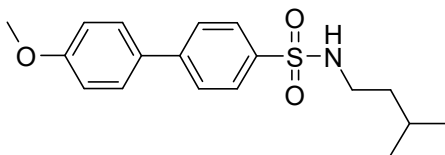
LC-MS : t_R = 6.80min (méthode a) ; m/z : [M+H]⁺ = 354

RMN ¹H (CD₂Cl₂, 300MHz) : δ ppm = 7.92 (d, 2H, ³J = 8.6Hz); 7.59 (d, 2H, ³J = 8.6Hz); 4.72 (t, 1H, ³J = 5.9Hz); 2.93 (q, 2H, ³J = 7.0Hz); 1.57 (n, 1H, ³J = 6.7Hz); 1.33 (q, 2H, ³J = 7.2Hz); 0.83 (d, 6H, ³J = 6.5Hz)

▪ **Procédure xx**

69.7 μ L (1eq.) de 3-méthylbutanamine sont solubilisés dans 4.60mL de DMF anhydre. 197.9 μ L (3eq.) de N-méthylmorpholine et 1eq. de chlorure d'acide sulfonique sont additionnés au milieu réactionnel. La réaction est alors agitée à TA jusqu'à disparition du produit de départ. Une solution d'acide acétique 1M est ensuite ajoutée.

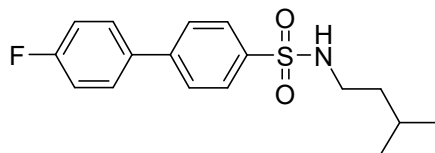
- Si le produit précipite, ce dernier est filtré puis lavé à l'eau. Il est ensuite placé à l'étuve à 50°C.
- Si le produit ne précipite pas, une solution saturée en NaCl est ajoutée. Le produit est alors extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont assemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite.

▪ **Composé 3 : N-isopentyl-4'-méthoxybiphényl-4-sulfonamide**

Procédure xx avec 169.8mg (1eq.) de chlorure d'acide 4'-méthoxybiphényl-4-sulfonique. Agitation 2h30. 143mg (71%) de poudre blanche après filtration.

LCMS : $t_R = 7.10\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 334$

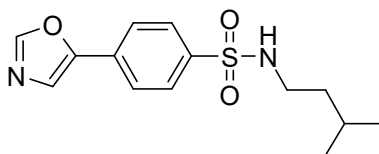
RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 7.89 (d, 2H, $^3J = 9.1\text{Hz}$); 7.74 (d, 2H, $^3J = 8.5\text{Hz}$); 7.62 (d, 2H, $^3J = 8.5\text{Hz}$); 7.04 (d, 2H, $^3J = 9.2\text{Hz}$); 4.41 (br s, 1H); 3.88 (s, 3H); 3.00 (t, 2H, $^3J = 7.3\text{Hz}$); 1.62 (n, 1H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 1.38 (q, 2H, $^3J = 7.4\text{Hz}$); 0.87 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$)

▪ **Composé 4 : 4'-fluoro-N-isopentylbiphényl-4-sulfonamide**

Procédure xx avec 163.7mg (1eq.) de chlorure d'acide 4'-fluorobiphényl-4-sulfonique. Agitation 2h30. 71mg (37%) de poudre blanche après filtration.

LCMS : $t_R = 7.20\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 322$

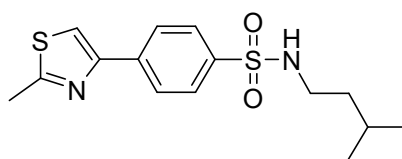
RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 7.92 (d, 2H, $^3J = 8.3\text{Hz}$); 7.74 (d, 2H, $^3J = 8.8\text{Hz}$); 7.65 (dd, 2H, $^3J = 8.9\text{Hz}$, $^4J = 5.3\text{Hz}$); 7.22 (t, 2H, $^3J = 8.8\text{Hz}$); 4.43 (br s, 1H); 3.01 (t, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 1.61 (n, 1H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 1.38 (q, 2H, $^3J = 7.1\text{Hz}$); 0.87 (d, 6H, $^3J = 6.2\text{Hz}$)

▪ **Composé 5 : N-isopentyl-4-(oxazol-5-yl)benzènesulfonamide**

Procédure xx avec 146.7mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-(oxazol-5-yl)benzènesulfonique. Agitation 7j. 78mg (44%) de poudre blanche après filtration.

LCMS : $t_R = 5.50\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 295$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 8.02 (s, 1H); 7.93 (d, 2H, $^3J = 8.6\text{Hz}$); 7.84 (dd, 2H, $^3J = 8.6\text{Hz}$); 7.54 (s, 1H); 4.50 (br s, 1H); 3.00 (t, 2H, $^3J = 7.3\text{Hz}$); 1.59 (n, 1H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 1.37 (q, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 0.86 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$)

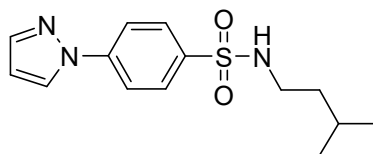
▪ **Composé 6 : N-isopentyl-4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzènesulfonamide**

Procédure xx avec 164.2mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-(2-méthyl-1,3-thiazol-4-yl)benzènesulfonique. Agitation 3h. 67mg (34%) de poudre blanche après lavages.

LCMS : $t_R = 6.40\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 325$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 8.07 (d, 2H, $^3J = 8.5\text{Hz}$); 7.90 (d, 2H, $^3J = 8.5\text{Hz}$); 7.56 (s, 1H); 4.48 (t, 1H, $^3J = 5.7\text{Hz}$); 2.99 (q, 2H, $^3J = 6.9\text{Hz}$); 1.59 (n, 1H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 1.37 (q, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 0.86 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$)

▪ **Composé 7 : N-isopentyl-4-(1H-pyrazol-1-yl)benzènesulfonamide**

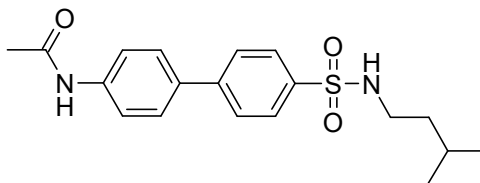


Procédure xx avec 145.0mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-(1H-pyrazol-1-yl)benzènesulfonique. Agitation 7j. 91mg (51%) de poudre blanche après filtration.

LCMS : $t_R = 5.80\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 294$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 8.08 (dd, 1H, $^3J = 2.6\text{Hz}$, $^4J = 0.4\text{Hz}$); 7.96 (d, 2H, $^3J = 9.1\text{Hz}$); 7.91 (d, 2H, $^3J = 9.0\text{Hz}$); 7.78 (d, 1H, $^3J = 1.6\text{Hz}$); 6.57 (dd, 1H, $^3J = 2.6\text{Hz}$, $^3J = 1.8\text{Hz}$); 4.44 (br s, 1H); 3.00 (t, 2H, $^3J = 7.3\text{Hz}$); 1.60 (n, 1H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 1.37 (q, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 0.86 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$)

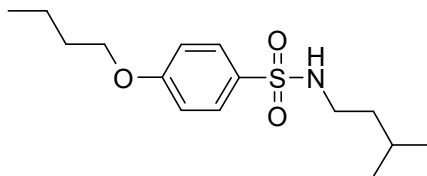
▪ **Composé 8 : N-(4'-(N-isopentylsulfamoyl)biphényl-4-yl)acétamide**



141.1mg (1eq.) de 4-iodo-N-isopentylbenzènesulfonamide (**2**), 109.1mg (1.5eq.) d'acide 4-acétamidophénylboronique, 38mg (0.1eq.) de 1,1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène]dichloropalladium(II), 69mg (1.5eq.) de Na_2CO_3 , 2.3mL de DME et 0.9mL d'eau sont successivement introduits dans un tube à réacteur micro-ondes. Le mélange est alors agité à 115°C pendant 30min dans le four micro-ondes. La solution est filtrée sur célite et évaporée sous pression réduite. Le résidu est alors purifié par HPLC préparative pour donner 108mg (75%) de poudre blanche.

LCMS : $t_R = 5.70\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 347$

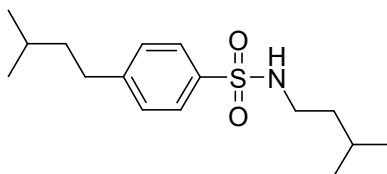
RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ ppm = 7.90 (d, 2H, $^3J = 8.6\text{Hz}$); 7.80 (d, 2H, $^3J = 8.7\text{Hz}$); 7.70 (d, 2H, $^3J = 9.0\text{Hz}$); 7.66 (d, 2H, $^3J = 8.8\text{Hz}$); 2.90 (t, 1H, $^3J = 7.3\text{Hz}$); 2.16 (s, 3H); 1.63 (n, 1H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 1.35 (q, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 0.85 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$)

▪ **Composé 9 : 4-butoxy-N-isopentylbenzènesulfonamide**

Procédure xx avec 148.6mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-butoxybenzènesulfonique. Agitation 1j. 56mg (30%) de poudre blanche après lavage.

LCMS : $t_R = 7.40\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 300$

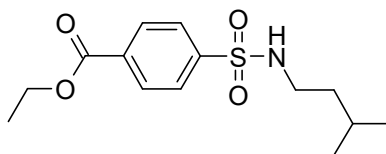
RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 7.77 (d, 2H, $^3J = 9.0\text{Hz}$); 7.01 (d, 2H, $^3J = 9.0\text{Hz}$); 4.06 (t, 2H, $^3J = 6.5\text{Hz}$); 2.93 (t, 2H, $^3J = 7.4\text{Hz}$); 1.86-1.76 (m, 2H); 1.64-1.46 (m, 3H); 1.34 (q, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 1.00 (t, 3H, $^3J = 7.4\text{Hz}$); 0.85 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$)

▪ **Composé 10 : N,4-diisopentylbenzènesulfonamide**

Procédure xx avec 161.2mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-isopentylbenzènesulfonique. Agitation 3h. 123mg (62%) de poudre blanche après lavage.

LCMS : $t_R = 8.20\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 298$

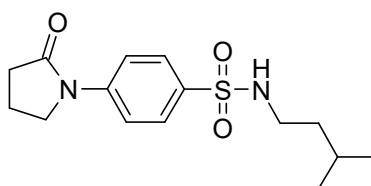
RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 7.75 (d, 2H, $^3J = 8.5\text{Hz}$); 7.37 (d, 2H, $^3J = 8.5\text{Hz}$); 2.96 (t, 2H, $^3J = 7.4\text{Hz}$); 2.74-2.69 (m, 2H); 1.66-1.50 (m, 4H); 1.33 (q, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 0.97 (d, 6H, $^3J = 6.4\text{Hz}$); 0.84 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$)

▪ **Composé 11 : 4-(N-isopentylsulfamoyl)benzoate d'éthyle**

Procédure xx avec 150.2mg (1eq.) de 4-(chlorosulfonyl)benzoate de méthyle. Agitation 6j. 109mg (60%) de poudre blanche après lavage.

LCMS : $t_R = 6.50\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 300$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 8.20 (d, 2H, $^3J = 8.7\text{Hz}$); 7.94 (d, 2H, $^3J = 8.7\text{Hz}$); 4.42 (q, 2H, $^3J = 7.1\text{Hz}$); 2.99 (t, 2H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 1.59 (n, 1H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 1.43 (t, 3H, $^3J = 7.1\text{Hz}$); 1.36 (q, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 0.86 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$)

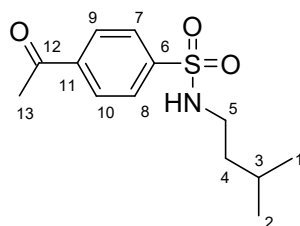
▪ **Composé 12 : N-isopentyl-4-(2-oxopyrrolidin-1-yl)benzènesulfonamide**

Procédure xx avec 156.1mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)benzènesulfonique. Agitation 24h. 84mg (45%) de poudre blanche après lavage.

LCMS : $t_R = 5.20\text{min}$; $m/z : [M+H]^+ = 311$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) : δ ppm = 7.85 (m, 4H,); 4.39 (br s, 1H); 3.93-3.88 (m, 2H); 2.95 (q, 2H, $^3J = 6.7\text{Hz}$); 2.63 (t, 2H, $^3J = 8.1\text{Hz}$); 2.20 (qn, 2H, $^3J = 7.7\text{Hz}$); 1.55 (n, 1H, $^3J = 6.3\text{Hz}$); 1.35 (q, 2H, $^3J = 7.2\text{Hz}$); 0.86 (d, 6H, $^3J = 6.7\text{Hz}$)

▪ **Composé 13 : 4-acétyl-N-isopentylbenzènesulfonamide**



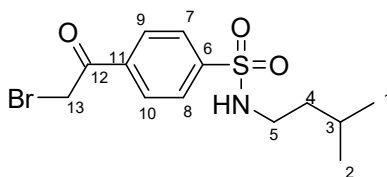
3g (1eq.) de chlorure d'acide 4-acétylbenzènesulfonique sont ajoutés à une solution de 2.39mL (1.5eq.) de 3-méthylbutylamine et 7.54mL (5eq.) de N-méthylmorpholine dans 200mL de DMF sur tamis moléculaire. Le mélange est agité pendant 3h à TA. Le DMF est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'aide d'une solution aqueuse d'HCl 1N (2x) et à la saumure (1x). Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite pour donner 3.34g (90%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 5.61$ min (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 270$

CCM : $R_f = 0.44$ (AcOEt 3:7 Ether de Pétrole)

RMN 1H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 8.16 (d, 2H, $^3J = 8.67$ Hz, 9+10); 7.95 (d, 2H, $^3J = 8.67$ Hz, 7+8); 2.89 (t, 2H, $^3J = 7.16$ Hz, 5); 2.65 (s, 3H, 13); 1.61 (n, 1H, $^3J = 6.72$ Hz, 3); 1.32 (q, 2H, $^3J = 7.08$ Hz, 4); 0.84 (d, 6H, $^3J = 6.62$ Hz, 1+2)

▪ **Composé 14 : 4-(2-bromoacétyl)-N-isopentylbenzènesulfonamide**

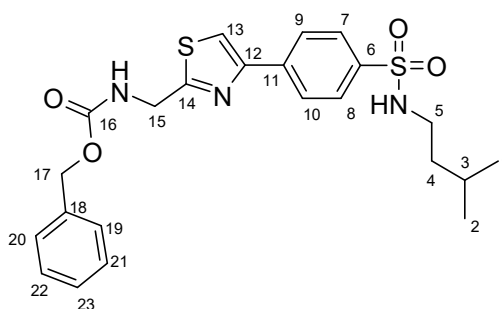


4.466g (1eq.) de tribromure de triméthylphénylammonium sont ajoutés à une solution de 3.2g (1eq.) de 4-acétyl-N-isopentylbenzènesulfonamide (**13**) dans 150mL d'acide acétique glacial. Le mélange réactionnel est agité pendant 3h à TA. L'acide acétique est évaporé sous pression réduite, le solide jaune obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 4.02g (quantitatif) d'une huile jaune.

LC-MS : $t_R = 6.26\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 349$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.18 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 7+8); 7.98 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 9+10); 4.71 (s, 2H, 13); 2.90 (t, 2H, $^3J = 7.10\text{Hz}$, 5); 1.62 (n, 1H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 3); 1.32 (q, 2H, $^3J = 6.90\text{Hz}$, 4); 0.84 (d, 6H, $^3J = 6.60\text{Hz}$, 1+2)

▪ **Composé 15 : benzyl (4-(4-(N-isopentylsulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)méthylcarbamate**



676mg (1eq.) de benzyl 2-amino-2-thioxoéthylcarbamate sont ajoutés à une solution de 1g (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-isopentylbenzènesulfonamide (**14**) dans 80mL de THF sur tamis moléculaire. Le mélange réactionnel est laissé au reflux du THF pendant 3h. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite puis le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit est ensuite recristallisé dans 5mL de méthanol pour donner 700mg (51%) de poudre orange pâle.

$T_f = 117.8^\circ\text{C}$

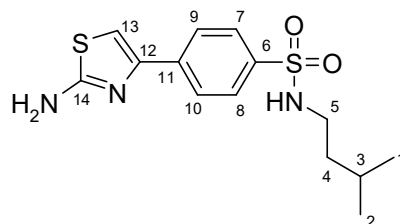
LC-MS : $t_R = 6.86\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 474$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.10 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 9+10); 7.92 (s, 1H, 13); 7.88 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 7+8); 7.22-7.40 (m, 5H, 19+20+21+22+23); 5.15 (s, 3H, 17); 4.65 (s, 2H, 15); 2.90 (t, 2H, $^3J = 7.40\text{Hz}$, 5); 1.54-1.68 (m, 1H, 3); 1.33 (q, 2H, $^3J = 7.10\text{Hz}$, 4); 0.84 (d, 6H, $^3J = 6.60\text{Hz}$, 1+2)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 8.03 (d, 2H, $^3J = 8.50\text{Hz}$, 9+10); 7.87 (d, 2H, $^3J = 8.50\text{Hz}$, 7+8); 7.62 (s, 1H, 13); 7.3-7.4 (m, 5H, 19+20+21+22+23); 5.73 (m, 1H, NH-alpha15); 5.16 (s, 2H, 17); 4.72 (d, 2H, $^3J = 6.20\text{Hz}$, 15); 4.57 (t, 1H, $^3J = 6.10\text{Hz}$, NH-alpha-5); 2.95 (q, 2H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 5); 1.51-1.63 (m, 1H, 3); 1.34 (q, 2H, $^3J = 7.10\text{Hz}$, 4); 0.82 (d, 6H, $^3J = 6.60\text{Hz}$, 1+2)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz, Jmod) : δ ppm = 169.14 (14); 156 (16); 153.34 (12); 139.04 (6); 138.15 (11); 136.5 (18); 127.55/128.14/128.48 (19+20+21+22+23); 127.55 (7+8); 126.7 (9+10); 115.65 (13); 67.07 (17); 42.92 (15); 41.62 (5); 38.34 (4); 25.42 (3); 21.96 (1+2)

▪ **Composé 16 : 4-(2-aminothiazol-4-yl)-N-isopentylbenzènesulfonamide**



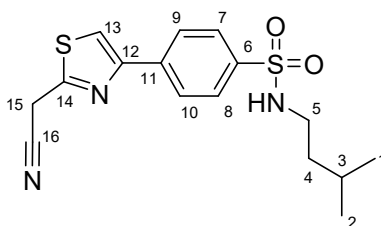
1g (1eq.) de thiourée est ajouté à une solution de 200mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-isopentylbenzènesulfonamide (**14**) dans 25mL de THF sur tamis moléculaire. Le mélange réactionnel est agité au reflux du THF pendant 3h. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite puis le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié sur colonne de silice prépaquée (AcOEt 1:9 Ether de Pétrole \rightarrow AcOEt 3:7 Ether de Pétrole) pour donner 114mg (61%) de poudre beige.

LC-MS : t_R = 5.05min (méthode a) ; m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 326

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 7.95 (d, 2H, 3J = 8.77Hz, 9+10); 7.81 (d, 2H, 3J = 8.77Hz, 7+8); 7.05 (s, 1H, 13); 2.87 (t, 2H, 3J = 7.19Hz, 5); 1.61 (n, 1H, 3J = 6.75Hz, 3); 1.32 (q, 2H, 3J = 7.01Hz, 4); 0.84 (d, 6H, 3J = 6.63Hz, 1+2)

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) : δ ppm = 170.1 (14); 148.8 (12); 138.3 (11 ou 6); 138.9 (11 ou 6); 127.1 (7+8); 126.0 (9+10); 104.3 (13); 40.9 (5); 38.2 (4); 25.0 (3); 21.2 (1/2)

▪ **Composé 17 : 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-isopentylbenzènesulfonamide**



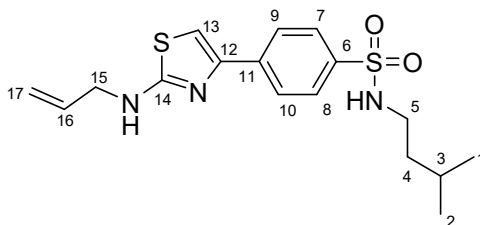
575mg (1eq.) de 2-cyanothioacétamide sont ajoutés à une solution de 2g (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-isopentylbenzènesulfonamide (**14**) dans 200mL de THF sur tamis moléculaire. Le mélange réactionnel est agité au reflux du THF pendant 28h. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite puis le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le solide marron est recristallisé dans 5mL d'éthanol pour donner 946mg (47%) de poudre jaune pâle.

LC-MS : $t_R = 5.67\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 350$

RMN ^1H (CD $_3$ OD, 300MHz) : δ ppm = 8.15 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 9+10); 8.05 (s, 1H, 13); 7.90 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 7+8); 4.43 (s, 1H, 15); 2.90 (t, 2H, $^3J = 7.20\text{Hz}$, 5); 1.52-1.68 (m, 1H, 3); 1.33 (q, 2H, $^3J = 7.10\text{Hz}$, 4); 0.84 (d, 6H, $^3J = 6.65\text{Hz}$, 1+2)

RMN ^{13}C (CD $_3$ OD, 75MHz) : δ ppm = 159.4 (14); 153.7 (12); 139.9 (11); 137.5 (6); 127.2 (7+8); 126.5 (9+10); 117.0 (13); 115.9 (16); 41.0 (5); 38.1 (4); 25 (3); 21.2 (1+2); 20.9 (15)

▪ **Composé 18 : 4-(2-(allylamino)thiazol-4-yl)-N-isopentylbenzènesulfonamide**



66.7mg (1eq.) de 1-allylthiourée sont ajoutés à une solution de 200mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-isopentylbenzènesulfonamide (**14**) dans 25mL de THF sur tamis moléculaire. Le mélange réactionnel est agité au reflux du THF pendant 2h. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite puis le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique

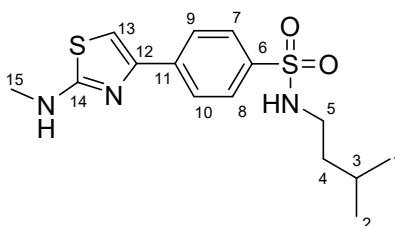
est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (DCM 100% puis Ether de Pétrole 7:3 AcOEt) pour donner 132mg (63%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 6.19\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 366$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 7.91 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 9+10); 7.82 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 7+8); 6.90 (s, 1H, 13); 6.29 (m, 1H, NH-alpha-15); 5.95 (tdd, 1H, $^3J_{\text{trans}} = 17.20\text{Hz}$, $^3J_{\text{cis}} = 10.30\text{Hz}$, $^3J = 5.50\text{Hz}$, 16); 5.37-5.29 (m, 2H, 17cis+NH-alpha-5); 5.21 (dq, 1H, $^3J_{\text{trans}} = 17.20\text{Hz}$, $^2J_{\text{gem}} = ^4J = 1.56\text{Hz}$, 17trans); 3.94-3.95 (m, 2H, 15); 2.90 (q, 2H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 5); 1.47 (n, 1H, $^3J = 6.80\text{Hz}$, 3); 1.29 (q, 2H, $^3J = 7.10\text{Hz}$); 0.79 (d, 6H, $^3J = 6.65\text{Hz}$, 1+2)

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75MHz) : δ ppm : 170.12 (14); 149.16 (12); 138.51/138.60 (11+6); 133.57 (16); 127.39 (7+8); 126.41 (9+10); 116.92 (17); 103.81 (13); 48.24 (15); 41.57 (5); 38.27 (4); 25.41(3); 22.00 (1+2)

▪ **Composé 19 : N-isopentyl-4-(2-(méthylamino)thiazol-4-yl)benzènesulfonamide**

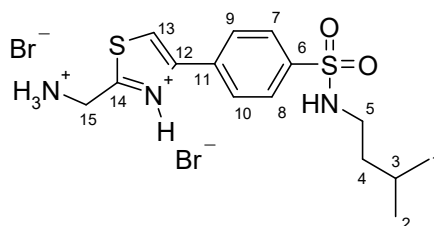


51.9mg (1eq.) de 1-méthylthiourée sont ajoutés à une solution de 200mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-isopentylbenzènesulfonamide (**14**) dans 25mL de THF sur tamis moléculaire. Le mélange réactionnel est agité au reflux du THF pendant 3h. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite puis le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 132mg (68%) de poudre beige.

LCMS : $t_R = 5.28\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 340$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.22 (d, 2H, $^3J = 8.64\text{Hz}$, 9+10); 8.18 (s, 1H, 13); 7.92 (d, 2H, $^3J = 8.64\text{Hz}$, 7+8); 3.09 (s, 3H, 15); 2.90 (t, 2H, $^3J = 7.16\text{Hz}$, 5); 1.61 (n, 1H, $^3J = 6.73\text{Hz}$, 3); 1.34 (q, 2H, $^3J = 7.07\text{Hz}$, 4); 0.84 (d, 6H, $^3J = 6.61\text{Hz}$, 1+2)

- **Composé 20 : di-bromhydrate de 4-(2-(aminométhyl)thiazol-4-yl)-N-isopentylbenzènesulfonamide**

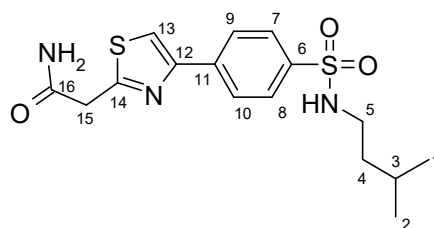


600mg de benzyl(4-(4-(N-isopentylsulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)méthylcarbamate (**15**) sont traités par une solution d'HBr à 25% dans de l'acide acétique pendant 2h à TA. 50mL d'éther diéthylique sont ajoutés à TA. Le mélange est ensuite refroidi 10min à 0°C. Le produit est filtré puis lavé à l'éther diéthylique froid pour donner 608mg (96%) de poudre orange.

LC-MS : $t_R = 4.24\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 340$

RMN ^1H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 8.22 (d, 2H, $^3J = 8.64\text{Hz}$, 9+10); 8.18 (s, 1H, 13); 7.92 (d, 2H, $^3J = 8.64\text{Hz}$, 7+8); 4.60 (s, 2H, 15); 2.90 (t, 2H, $^3J = 7.16\text{Hz}$, 5); 1.61 (n, 1H, $^3J = 6.73\text{Hz}$, 3); 1.34 (q, 2H, $^3J = 7.07\text{Hz}$, 4); 0.84 (d, 6H, $^3J = 6.61\text{Hz}$, 1+2)

- **Composé 21 : 2-(4-(4-(N-isopentylsulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétamide**



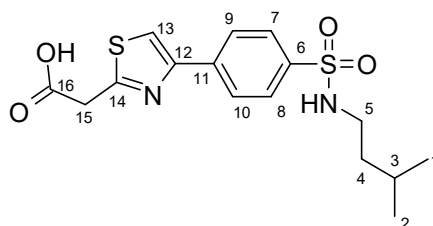
100mg de 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-isopentylbenzènesulfonamide (**17**) sont solubilisés dans 100 μL d'acide sulfurique à 96%. La solution est agitée à TA pendant 12h. Le milieu réactionnel est alors versé dans 100 μL une solution d'ammoniaque à 28% à 0°C. De l'ammoniaque est ensuite ajouté jusqu'à atteindre un pH de 9. La solution est alors filtrée, le pH du filtrat est neutralisé avec de l'HCl 1N puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 64mg (61%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 5.20\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 368$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.12 (d, 2H, ^3J = 8.61Hz, 9+10); 7.97 (s, 1H, 13); 7.89 (d, 2H, ^3J = 8.61Hz, 7+8); 4.05 (s, 1H, 15); 2.90 (t, 2H, ^3J = 7.18Hz, 5); 1.62 (n, 1H, ^3J = 6.40Hz, 3); 1.34 (q, 2H, ^3J = 7.08Hz, 4); 0.84 (d, 6H, ^3J = 6.62Hz, 1+2)

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) : δ ppm = 173.2 (16); 165.9 (14); 154.4 (12); 141.2 (11); 139.6 (6); 128.7 (7+8); 127.9 (9+10); 118.1 (13); 42.5 (5); 39.7 (4); 26.6 (3); 22.8 (1+2)

▪ **Composé 22 : acide 2-(4-(4-(N-isopentylsulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétique**



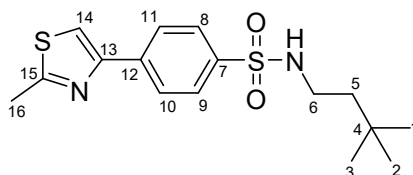
Une solution de 200mg (1eq.) de 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-isopentylbenzènesulfonamide (**17**) dans 2.5mL d'eau et 45.8mg (2eq.) de NaOH est chauffée au reflux pendant 15h. Le pH est alors ajusté à 4-5 à TA à l'aide d'une solution d'acide acétique glacial. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse d'HCl de pH=4, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 122mg (58%) de poudre beige.

LC-MS : t_r = 5.07min (méthode a) ; m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 369$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.11 (d, 2H, ^3J = 8.80Hz, 9+10); 7.97 (s, 1H, 13); 7.89 (d, 2H, ^3J = 8.80Hz, 7+8); 2.90 (t, 2H, ^3J = 7.30Hz, 5); 1.61 (n, 1H, ^3J = 6.70Hz, 3); 1.34 (q, 2H, ^3J = 7.20Hz, 4); 0.84 (d, 6H, ^3J = 6.60Hz, 1+2)

▪ **Procédure générale (i)**

Entre 1 et 1.5 eq. de l'amine correspondante et 99 μ L (5eq.) de N-méthylmorpholine sont successivement ajoutés à une solution de 50mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzènesulfonique dans 4mL de DMF anhydre. Le mélange est agité à TA pendant 2h. Le DMF est évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite.

▪ **Composé 23 : N-(3,3-diméthylbutyl)-4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzènesulfonamide**

Procédure (i) avec 38.7 μ L (1.5 eq.) 3,3-diméthylbutylamine.

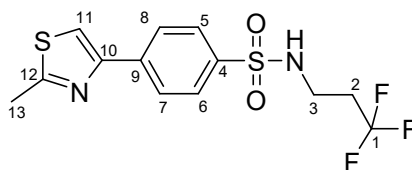
26.5mg (44%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 6.79$ min (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 339$

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.09 (d, 2H, $^3J = 8.70$ Hz, 10+11); 7.89 (d, 2H, $^3J = 8.70$ Hz, 8+9); 7.84 (s, 1H, 14); 2.86-2.92 (m, 2H, 6); 2.77 (s, 3H, 16); 1.35-1.40 (m, 2H, 5); 0.85 (s, 9H, 1+2+3)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz) : δ ppm = 168.7 (15); 154.4 (13); 140.9 (7); 139.5 (12); 128.6 (8+9); 127.8 (10+11); 116.9 (14); 44.3 (5); 40.8 (6); 30.5 (4); 29.7 (1+2+3); 18.9 (16);

▪ **Composé 24 : 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**



Procédure (i) avec 26.9mg (1eq.) de chlorhydrate de 2,2,2-trifluoropropylamine.

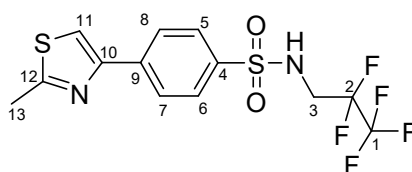
26.6mg (39%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 5.80\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 351$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.10 (d, 2H, $^3J = 8.80\text{Hz}$, 7+8); 7.90 (d, 2H, $^3J = 8.80\text{Hz}$, 5+6); 7.86 (s, 1H, 11); 3.12 (t, 2H, $^3J = 7.30\text{Hz}$, 3); 2.77 (s, 3H, 13); .2.39 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.80\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.30\text{Hz}$, 2)

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) : δ ppm = 168.7 (12); 154.3 (10); 140.5 (4); 139.8 (9); 128.6 (5+6); 127.9 (7+8); 127.6 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 276.1\text{Hz}$, 1); 117.1 (11); 37.39 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 3.10\text{Hz}$, 3); 35.21 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 27.9\text{Hz}$, 2); 18.9 (13)

▪ **Composé 25 : 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)benzènesulfonamide**



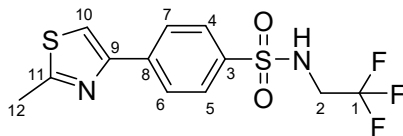
Procédure (i) avec 38.9 μL (1eq.) de 2,2,3,3,3-pentafluoropropylamine, 100mg de chlorure d'acide sulfonique, 8mL de DMF anhydre et 198 μL de N-méthylmorpholine.

40.1mg (29%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 6.22\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 387$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.10 (d, 2H, $^3J = 8.80\text{Hz}$, 7+8); 7.91 (d, 2H, $^3J = 8.80\text{Hz}$, 5+6); 7.86 (s, 1H, 11); 3.70 (td, 2H, $^3J_{3-2} = 15.80\text{Hz}$, $^4J_{3-1} = 0.8\text{Hz}$, 3); 2.77 (s, 3H, 13)

▪ **Composé 26 : 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifluoroéthyl)benzènesulfonamide**



Procédure (i) avec 24.4mg (1eq.) de chlorhydrate de 2,2,2-trifluoroéthylamine.

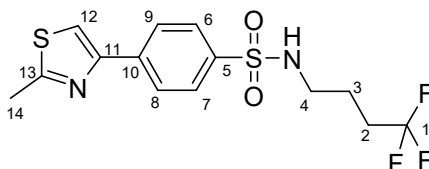
19.8mg (31%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 5.53\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 337$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.09 (d, 2H, $^3J = 8.80\text{Hz}$, 6+7); 7.91 (d, 2H, $^3J = 8.80\text{Hz}$, 4+5); 7.85 (s, 1H, 10); 3.68 (q, 2H, $^3J = 9.00\text{Hz}$, 2); 2.80 (s, 3H, 12)

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) : δ ppm = 168.7 (11); 154.3 (9); 141.2 (8); 139.8 (3); 125.6 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 277\text{Hz}$, 1); 117.1 (10); 45.06 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 35.0\text{Hz}$, 2); 12.9 (12)

▪ **Composé 27 : 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-N-(4,4,4-trifluorobutyl)benzènesulfonamide**



Procédure (i) avec 55.7mg (1.2eq.) de 4,4,4-trifluorobutylamine, 100mg de chlorure d'acide sulfonique, 5mL de DMF anhydre et 198 μL de N-méthylmorpholine.

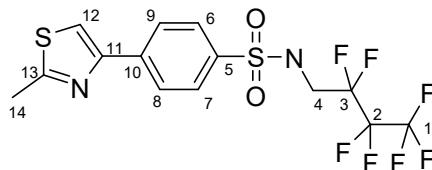
75.1mg (54%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 6.13\text{min}$ (méthode b) ; $m/z : [M+H]^+ = 365$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 8.02 (d, 2H, $^3J = 8.74\text{Hz}$, 8+9); 7.89 (d, 2H, $^3J = 8.74\text{Hz}$, 6+7); 7.46 (s, 1H, 12); 5.10 (t, 1H, $^3J = 6.39\text{Hz}$, NH); 3.03 (q, 2H, $^3J = 6.64\text{Hz}$, 4); 2.22-2.06 (m, 2H, 2); 1.76 (qn, 2H, $^3J = 7.33\text{Hz}$, 3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) : δ ppm = 166.8 (13); 153.2 (11); 138.8 (10); 138.5 (5); 127.6 (6+7); 127.0 (8+9); 126.9 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 276\text{Hz}$, 1); 115.2 (12); 42.0 (4); 30.9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 29.0\text{Hz}$, 2); 22.6 (3); 19.4 (14)

▪ **Composé 28 : N-(2,2,3,3,4,4,4-héptafluorobutyl)-4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzènesulfonamide**



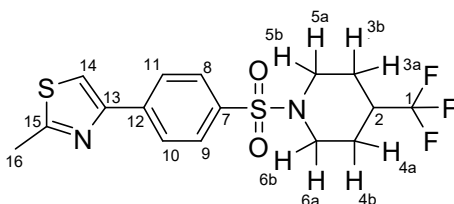
Procédure (i) avec 29.2µL (1.2eq.) de 2,2,3,3,4,4,4-héptafluorobutylamine.
34mg (44%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 6.65\text{min}$ (méthode b) ; $m/z : [M+H]^+ = 437$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 8.02 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 8+9); 7.88 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 6+7); 7.49 (s, 1H, 12); 5.50 (br s, 1H, NH); 3.75 (td, 2H, $^3J_{4,3} = 15.30\text{Hz}$, $^4J_{4,2} = 5.10\text{Hz}$, 4); 2.80 (s, 3H, 14)

RMN ^{19}F découplé ^1H (CDCl_3 , 282MHz) : δ ppm = -127.36/-127.51 (m, 2F, 3); -118.74 (qt, 2F, $^3J_{2,1} = 9.30\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 5.60\text{Hz}$, 2); -80.71 (t, 3F, $^3J = 9.30\text{Hz}$, 1)

▪ **Composé 29 : 2-méthyl-4-(4-(4-(trifluorométhyl)pipéridin-1-ylsulfonyl)phényl)thiazole**



Procédure (i) avec 67.1mg (1.2eq.) de 4-trifluorométhylpipéridine, 100mg de chlorure d'acide sulfonique, 5mL de DMF anhydre et 198µL de N-méthylmorpholine.

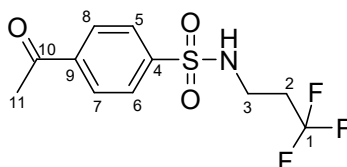
87.4mg (61%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 6.73\text{min}$ (méthode b) ; $m/z : [M+H]^+ = 391$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 8.05 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 10+11); 7.79 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 8+9); 7.49 (s, 1H, 14); 3.90-3.94 (m, 2H, 5b+6b); 2.25-2.34 (m, 2H, 5a+6a); 1.90-1.99 (m, 3H, 3b+4b+2); 1.62-1.76 (m, 2H, 3a+4a)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) : δ ppm = 166.7 (15); 153.1 (13); 138.9 (7); 134.8 (12); 128.2 (8+9); 126.8 (10+11); 126.7 (q, $^1\text{J}_{\text{C-F}}=279\text{Hz}$, 1); 115.1 (14); 45.1 (5+6); 39.8 (q, $^2\text{J}_{\text{C-F}}=27.8\text{Hz}$, 2); 24.1 (3+4); 19.3 (16)

▪ **Composé 30 : 4-acétyl-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**

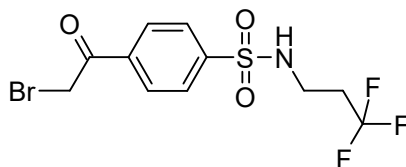


754 μL (5eq.) de N-méthylmorpholine et 300mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-acétylbenzènesulfonique sont successivement ajoutés à une solution de 186mg (1.2eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine dans 10mL de DMF anhydre. Le mélange est agité pendant 2h à TA. Le DMF est évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'aide d'une solution aqueuse d'HCl 1N (2x) puis à la saumure (1x). Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite pour donner 303mg (75%) de poudre jaune clair.

LC-MS: $t_{\text{R}} = 5.33\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [\text{M}+\text{H}]^+ = 296$

RMN ^1H (DMSO-d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.15 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.60\text{Hz}$, 7+8); 8.09 (br s, 1H, NH); 7.93 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.60\text{Hz}$, 5+6); 2.99 (t, 2H, $^3\text{J} = 6.90\text{Hz}$, 3); 2.43 (qt, 2H, $^3\text{J}_{2-1} = 11.22\text{Hz}$, $^3\text{J}_{2-3} = 6.96\text{Hz}$, 2)

▪ **Composé 31 : 4-(2-bromoacétyl)-N-trifluoropropylbenzènesulfonamide**

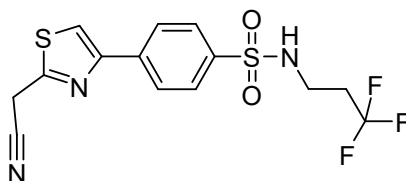


On ajoute goutte à goutte une solution de 303mg (1eq.) de 4-acétyl-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide (**30**) dans 35mL d'acide acétique glacial à une solution de 386mg (1eq.) de tribromure de triméthylphénylammonium dans 30mL d'acide acétique glacial. Le mélange réactionnel est agité pendant 4h à TA. 0.1eq. de réactif de bromation sont ajoutés pour consommer totalement la cétone non bromée résiduelle. L'acide acétique est évaporé sous pression réduite, le

solide jaune obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 358mg (93%) de solide beige.

LC-MS : $t_R = 5.85\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 372$

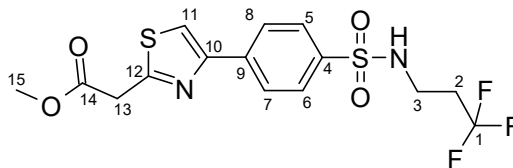
▪ **Composé 32 : 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**



105.4mg (1.1eq.) de 2-cyanothioacétamide sont ajoutés à une solution de 358mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-trifluoropropylbenzènesulfonamide (**31**) dans 25mL de THF sur tamis moléculaire. Le mélange réactionnel est laissé au reflux du THF pendant 24h. 0.1eq supplémentaire de 2-cyanothioacétamide sont ajoutés, le milieu est agité 1h supplémentaire à 70°C. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite puis le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle et lavé à la saumure (2x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. L'huile vert-olive obtenue est agitée 1h à TA dans du méthanol en présence de MgSO_4 et de charbon actif. Le milieu est filtré pour donner un filtrat jaune trouble. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le solide jaune est repris dans l'éthanol puis filtré de nouveau pour donner 270mg (75%) de solide jaune utilisé tel quel dans les étapes suivantes.

LC-MS : $t_R = 5.35\text{min}$ (méthode a) ; $m/z : [M+H]^+ = 376$

- **Composé 33 : 2-(4-(4-(N-(3,3,3-trifluoropropyl)sulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétate de méthyle**



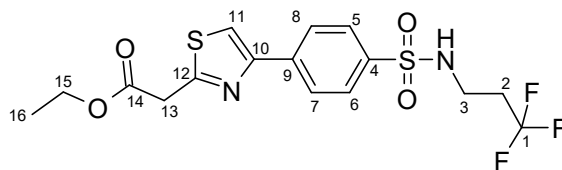
1.05mL (36eq.) de méthanol anhydre, 1.60mL (18eq.) de TMSCl et 270mg (1eq.) de 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide (**32**) sont successivement ajoutés à TA dans un ballon sec et sous argon. Le mélange est ensuite agité à 50°C pendant 15h puis laissé revenir à TA. 1mL d'eau est ensuite ajouté et le pH est neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. Le mélange est agité 10min à TA puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées à la saumure (2x), séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Le solide orange obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (EtOAc 1:9 Ether de pétrole → EtOAc 3:7 Ether de pétrole) pour donner 137mg (47%) de poudre beige pâle.

LC-MS : t_R = 6.22min (méthode b) ; m/z : [M+H]⁺ = 409

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) : δ ppm = 8.06 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 7+8); 7.91 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 5+6); 7.64 (s, 1H); 4.81 (t, 1H, ³J = 6.50Hz, NH); 4.17 (s, 2H, 13); 3.81 (s, 3H, 15); 3.25 (q, 2H, ³J = 6.70Hz, 3); 2.37 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.50Hz, ³J₂₋₃ = 6.80Hz, 2)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75MHz) : δ ppm = 169.4 (14); 162.3 (12); 153.0 (10); 138.7 (4 ou 9); 138.5 (4 ou 9); 127.6 (5+6); 127.0 (7+8); 125.9 (q, ¹J_{C-F} = 276.7Hz, 1); 116.6 (11); 52.7 (15); 38.6 (13); 36.7 (3); 34.5 (q, ²J_{C-F} = 29.0Hz, 2)

▪ **Composé 34 : 2-(4-(4-(N-(3,3,3-trifluoropropyl)sulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétate d'éthyle**



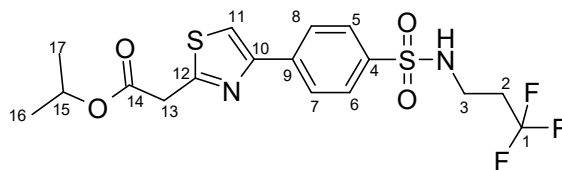
186 μ L (12eq.) d'éthanol absolu, 195 μ L de TMSCl (6eq.) et 100mg (1eq.) de 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide (**32**) sont successivement ajoutés à TA dans un ballon sec et sous argon. Le mélange est ensuite agité à 30°C pendant 48h. On convertit ainsi le nitrile à 67% en ester désiré et 33% en acide carboxylique (analyse HPLC, 215nm). 99 μ L (3eq.) de SOCl₂ sont alors ajoutés dans 466 μ L (30eq.) d'éthanol absolu. Le milieu réactionnel est agité à 40°C pendant 48h puis laissé revenir à TA. 1mL d'eau est ensuite ajouté et le pH est neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. Le mélange est agité 10min à TA puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées à la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Le solide orange obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (AcOEt 1:9 Ether de pétrole → AcOEt 3:7 Ether de pétrole) pour donner 66mg (59%) de poudre beige pâle.

LC-MS : t_R = 6.22min (méthode b) ; m/z : $[M+H]^+$ = 423

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) : δ ppm = 8.04 (d, 2H, ³J = 8.70Hz, 7+8); 7.90 (d, 2H, ³J = 8.70Hz, 5+6); 7.63 (s, 1H, 11); 5.11 (t, 1H, ³J = 6.50Hz, NH); 4.27 (q, 2H, ³J = 7.20Hz, 3); 4.14 (s, 2H, 13); 3.24 (q, 2H, ³J = 6.80Hz, 15); 2.36 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.60Hz, ³J₂₋₃ = 6.90Hz, 2); 1.33 (t, 3H, ³J = 7.10Hz, 16)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75MHz) : δ ppm = 169.0 (14); 162.6 (12); 153.0 (10); 138.8 (4); 128.6 (9); 127.7 (5+6); 127.1 (7+8); 126.0 (q, ¹J_{C-F} = 276Hz, 1); 116.7 (11); 61.9 (15); 39.0 (13); 36.7 (3); 34.6 (q, ²J_{C-F} = 28.3Hz, 2); 14.2 (16)

▪ **Composé 35 : 2-(4-(4-(N-(3,3,3-trifluoropropyl)sulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétate d'isopropyle**



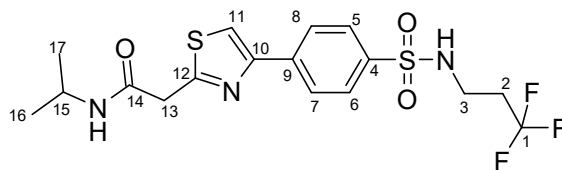
244 μ L (12eq.) d'isopropanol anhydre, 195 μ L (6eq.) de TMSCl et 100mg (1eq.) de 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide (**32**) sont successivement ajoutés à TA dans un ballon sec et sous argon. Le mélange est ensuite agité à 30°C pendant 48h. 197 μ L (6eq.) de SOCl₂ sont alors ajoutés dans 466 μ L (30eq.) d'isopropanol anhydre. Le milieu réactionnel est agité à 40°C pendant 48h puis laissé revenir à TA. 1mL d'eau est ensuite ajouté et le pH est neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. Le mélange est agité 10min à TA puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées à la saumure (2x), séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Le solide orange obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (AcOEt 1:9 Ether de pétrole → AcOEt 3:7 Ether de pétrole). Le produit est purifié une deuxième fois par HPLC préparative pour donner 29mg (25%) de poudre beige pâle.

LC-MS : $t_R = 6.50\text{min}$ (méthode b) ; $m/z : [M+H]^+ = 437$

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) : δ ppm = 8.04 (d, 2H, ³J = 8.70Hz, 7+8); 7.90 (d, 2H, ³J = 8.70Hz, 5+6); 7.63 (s, 1H, 11); 5.06-5.18 (m, 2H, 15+NH); 4.11 (s, 2H, 13); 3.23 (q, 2H, ³J = 6.8Hz, 3); 2.36 (tq, 2H, ³J₂₋₁ = 10.60Hz, ³J₂₋₃ = 6.90Hz, 2); 1.30 (d, 6H, ³J = 6.30Hz, 16+17)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75MHz) : δ ppm = 168.6 (14); 162.8 (12); 152.9 (10); 138.8 (4 ou 9); 138.5 (4 ou 9); 127.7 (5+6); 127.1 (7+8); 125.9 (q, ¹J_{C-F} = 277.5Hz, 1); 116.7 (11); 69.7 (15); 39.4 (13); 36.7 (3); 34.5 (q, ²J_{C-F} = 28.3Hz, 2); 21.8 (16+17)

- **Composé 36 : N-isopropyl-2-(4-(4-(N-(3,3,3-trifluoropropyl)sulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétamide**

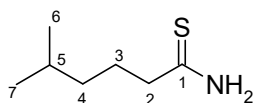


54mg de 2-(4-(4-(N-(3,3,3-trifluoropropyl)sulfamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétate de méthyle (**33**) et 1mL d'isopropylamine sont introduits dans un ballon de 5mL. Le mélange est chauffé au reflux de l'isopropylamine pendant 5h. 0.5mL supplémentaires d'isopropylamine sont ajoutés et le mélange est chauffé au reflux 4h supplémentaires. L'isopropylamine est alors évaporée sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle et lavé à la saumure (2x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le solide orange obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (DCM 98 : 2 MeOH) pour donner 32mg (56%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 5.57\text{min}$ (méthode b) ; $m/z : [M+H]^+ = 436$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.22 (s, 1H, 11); 8.14 (d, 2H, $^3J = 8.51\text{Hz}$, 7+8); 7.89 (d, 2H, $^3J = 8.51\text{Hz}$, 5+6); 4.07 (s, 2H, 13); 3.92-3.79 (m, 1H, 15); 2.99 (t, 2H, $^3J = 6.91\text{Hz}$, 3); 2.43 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 11.21\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.96\text{Hz}$, 2); 1.08 (d, 6H, $^3J = 6.58\text{Hz}$, 16+17)

- **Composé 37 : 5-méthylhexanethioamide**



2mL d'acide 5-méthylhexanoïque et 5mL de chlorure de thionyle sont introduits dans un ballon de 25mL. Le mélange est chauffé à 50°C pendant 1h puis le chlorure de thionyle est évaporé sous pression réduite. Un mélange CH_3CN (5mL) : (10mL) NH_4OH (28%) est ensuite ajouté à 0°C. La solution est alors agitée pendant 15min à 0°C. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner une poudre blanche.

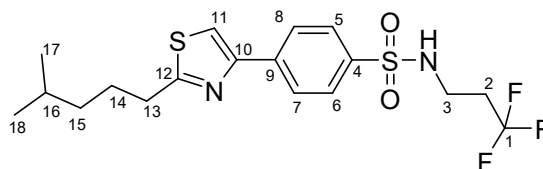
2,9g (0.5eq.) de réactif de Lawesson et 50mL de THF anhydre sont alors ajoutés au produit. La solution est agitée à TA pendant 4h. Le THF est évaporé sous pression réduite et le produit est purifié

sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 85:15 AcOEt → Cyclohexane 80:20 AcOEt) pour donner 950mg (47%) d'huile transparente qui cristallise ensuite.

LC-MS : $t_R = 3.03\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 146$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 8.35+7.46 (NH_2); 2.58 (t, 2H, $^3J = 7.60\text{Hz}$, 2); 1.64-1.74 (m, 2H, 3 ou 4); 1.50 (sp, 1H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 5); 1.12-1.21 (m, 2H, 3 ou 4); 0.82 (d, 6H, $^3J = 6.60\text{Hz}$, 6+7)

▪ **Composé 38 : 4-(2-(4-méthylpentyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**



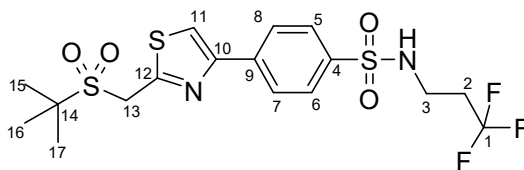
232mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-trifluoropropylbenzènesulfonamide (**31**) sont ajoutés à une solution de 90mg (1eq.) de 5-méthylhexanethioamide (**37**) dans 20mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux pendant 3h. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est purifiée sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 9:1 AcOEt → Cyclohexane 8:2 AcOEt) pour donner 60mg (24%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 7.60\text{min}$ (méthode d) ; $m/z : [M+H]^+ = 421$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 8.07 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 5+6); 7.91 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 7+8); 7.51 (s, 1H, 11); 4.89 (t, 1H, $^3J = 6.50\text{Hz}$, NH); 3.26 (q, 2H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 3); 3.06 (t, 2H, $^3J = 7.70\text{Hz}$, 13); 2.37 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.70\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.70\text{Hz}$, 2); 1.85 (q, 2H, $^3J = 7.80\text{Hz}$, 14); 1.63 (n, 1H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 16); 1.30-1.38 (m, 4H, 15+graisse); 0.92 (d, 6H, $^3J = 6.6\text{Hz}$, 17+18)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) : δ ppm = 172.6 (12); 153.0 (10); 139.2 (9); 138.3 (4); 127.7 (7+8); 127.2 (5+6); 120.5-131.5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 277.2\text{Hz}$, 1); 114.9 (11); 38.5 (15); 36.8 (3); 34.6 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 28.4\text{Hz}$, 2); 34.0 (13); 28.1 (14); 28.0 (16); 22.7 (17+18)

▪ **Composé 39 : 4-(2-(tert-butylsulfonylméthyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**



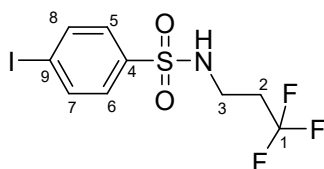
150mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-isopentylbenzènesulfonamide (**31**) sont ajoutés à une solution de 78.3mg (1eq.) de 2-(tert-butylsulfonyl)éthanethioamide dans 7mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux pendant 72h. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau puis à la saumure. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par HPLC pour donner 119mg (63%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 5.67\text{min}$ (méthode d) ; $m/z : [M+H]^+ = 471$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.44 (s, 1H, 11); 8.19 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 7+8); 7.94 (t, 1H, $^3J = 6.0\text{Hz}$, NH); 7.90 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 5+6); 5.09 (s, 2H, 13); 3.00 (q, 2H, $^3J = 6.60\text{Hz}$, 3); 2.44 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 11.2\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.0\text{Hz}$, 2); 1.38 (s, 9H, 15+16+17)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75Hz) : δ ppm = 157.1 (12); 152.5 (10); 139.0 (4); 137.4 (9); 127.2 (5+6); 126.6 (7+8); 126.4 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 277.0\text{Hz}$, 1); 120.0 (11); 66.3 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 27.2\text{Hz}$, 2); 60.2 (14); 50.3 (13); 36.03(q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.70\text{Hz}$, 3); 22.9 (15+16+17)

▪ **Composé 40 : 4-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**



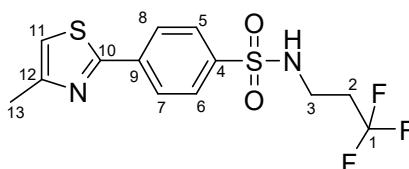
1.82mL (5eq.) de N-méthylmorpholine sont ajoutés à une solution de 593.2mg (1.2eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine dans 50mL de DMF. Le mélange est agité 5min à TA puis 1g (1eq.) de chlorure d'acide 4-iodobenzènesulfonique est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 2h. Le DMF est évaporé sous pression réduite puis le produit est repris dans l'acétate d'éthyle,

lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 1.17g (94%) de solide jaune pâle.

LC-MS : $t_r = 6.22\text{min}$ (méthode b) ; $m/z : [M-H]^- = 378$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 7.96 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 5+6 ou 7+8); 7.60 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 5+6 ou 7+8); 4.81 (m, 1H, NH); 3.25 (q, 2H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 3); 2.43 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.60\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.80\text{Hz}$, 2)

▪ **Composé 41: 4-(4-méthylthiazol-2-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**



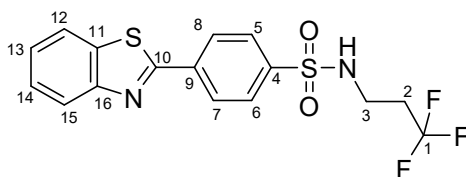
40.0 μL (1eq.) de 4-méthylthiazole, 4.9mg (0.05eq.) d'acétate de palladium, 83.7mg (1eq.) d'iodure de cuivre et 150mg (0.9eq.) de 4-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)-benzènesulfonamide (**40**) sont placés successivement dans un schlenk sous un flux d'argon. 1.5mL de DMF anhydre sont ajoutés *via* une canule sous argon à température ambiante. Le schlenk est tiré trois fois sous vide et rempli d'argon successivement. Le mélange réactionnel est agité à 140°C sous argon pendant 48h. Le milieu réactionnel est dilué à TA par 2mL d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'une solution aqueuse saturée en NH_4Cl (1:1 en volume). Le milieu est alors filtré et le solide lavé à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à la saumure (2x), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée sur célite puis évaporée sous pression réduite. Le produit est alors purifié sur colonne de silice prépaquée (AcOEt 1:9 Ether de Pétrole \rightarrow AcOEt 2:8 Ether de Pétrole) pour donner 73mg (53%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_r = 6.07\text{min}$ (méthode b) ; $m/z : [M+H]^+ = 351$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 8.11 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 7+8); 7.91 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 5+6); 7.04 (s, 1H, 11); 4.83 (m, 1H, NH); 3.26 (q, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 3); 2.51(s, 3H, 13); 2.39 (tq, 2H, $^3J_{2-1} = 10.60\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.80\text{Hz}$, 2)

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75MHz) : δ ppm = 164.8 (10); 154.4 (12); 141.0 (4); 137.0 (9); 128.0 (5+6); 127.2 (7+8); 126.85 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 277.1\text{Hz}$, 1); 116.9 (11); 36.4 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.8\text{Hz}$, 3); 33.6 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 27.4\text{Hz}$, 2); 17.3 (13)

▪ **Composé 42 : 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**



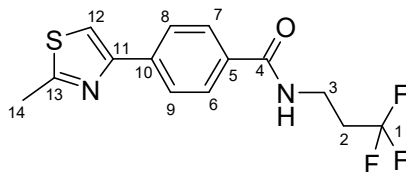
48.0 μ L (1eq.) de benzothiazole, 4.9mg (0.05eq.) d'acétate de palladium, 83.7mg (1eq.) d'iode de cuivre et 150mg (0.9eq.) de 4-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)-benzènesulfonamide (**40**) sont placés successivement dans un schlenk sous un flux d'argon. 1.5mL de DMF anhydre sont ajoutés *via* une canule sous argon à température ambiante. Le schlenk est tiré trois fois sous vide et rempli d'argon successivement. Le mélange réactionnel est agité à 140°C sous argon pendant 48h. Le milieu réactionnel est dilué à TA par 2mL d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (1:1 en volume). Le milieu est alors filtré et le solide lavé à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à la saumure (2x), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée sur célite puis évaporée sous pression réduite. Le produit est alors purifié sur colonne de silice prépaquée (AcOEt 1:9 Ether de Pétrôle → AcOEt 2:8 Ether de Pétrôle). Le produit est ensuite recristallisé dans 2mL d'éthanol pour donner 31mg (20%) de cristaux transparents.

LC-MS : $t_R = 6.73\text{min}$ (méthode b) ; $m/z : [M+H]^+ = 387$

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz) : δ ppm = 8.34 (d, 2H, ³J = 8.50Hz, 7+8); 8.21-8.23 (m ; 1H, 12 ou 15); 8.09-8.14 (m, 2H, NH + 12 ou 15); 8.00 (d, 2H, ³J = 8.50Hz, 5+6); 7.60 (td, 1H, ³J = 7.40Hz, ⁴J = 1.20Hz, 13 ou 14); 7.53 (td, 1H, ³J = 7.40Hz, ⁴J = 1.20Hz, 13 ou 14); 3.04 (t, 2H, ³J = 6.90Hz, 3); 2.39 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.60Hz, ³J₂₋₃ = 6.80Hz, 2)

RMN ¹³C (CD₂Cl₂, 75MHz) : δ ppm = 166.0 (10); 154.0 (16); 142.4 (9); 136.7 (16); 135.3 (11); 128.5 (5+6); 128.1 (7+8); 127.5 (13 ou 14); 126.6 (13 ou 14); 126.9 (q, ¹J_{C-F} = 273.4 Hz, 1); 123.8 (15 ou 12); 123.1 (15 ou 12); 36.5 (3); 33.7 (q, ²J_{C-F} = 27.5Hz, 2)

▪ **Composé 43 : 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



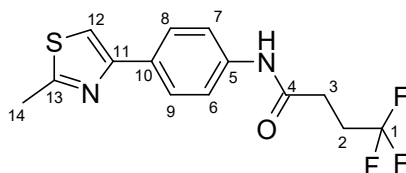
50mg (1eq.) d'acide 4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzoïque, 37mg (1.1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine (1.1eq.), 103mg (1.2eq.) d'HBTU, 52mg (1.5eq.) d'HOBT, 118 μ L (3eq.) de DIEA et 2.5mL de DMF sont introduits dans cet ordre là dans un ballon de 10mL. La solution est agitée pendant 2h à TA. Le DMF est évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé successivement à l'aide d'une solution aqueuse saturée en K_2CO_3 (2x), une solution aqueuse d'HCl 1N (2x), d'eau (1x) et de saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 67mg (93%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 3.10$ min (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 315$

RMN 1H (CD $_3$ OD, 300MHz) : δ ppm = 7.99 (d, 2H, $^3J = 8.50$ Hz, 8+9); 7.87 (d, 2H, $^3J = 8.50$ Hz, 6+7); 7.76 (s, 1H, 12); 3.64 (t, 2H, $^3J = 7.00$ Hz, 3); 2.76 (s, 3H, 14); 2.54 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.60$ Hz, $^3J_{2-3} = 6.80$ Hz, 2)

RMN ^{13}C (CD $_3$ OD, 75MHz) : δ ppm = 168.4 (4); 167.1 (13); 153.6 (11); 137.4 (10); 133.1 (5); 127.4 (6+7); 126.7 (q, $^1J_{C-F} = 277.8$ Hz, 1); 125.9 (8+9); 114.7 (12); 33.1 (3); 32.7 (q, $^2J_{C-F} = 27.5$ Hz, 2); 17.5 (14)

▪ **Composé 44 : 4,4,4-trifluoro-N-(4-(2-méthylthiazol-4-yl)phényl)butanamide**



82mg (1.1eq.) d'acide 4,4,4-trifluorobutyrique, 230 μ L (3eq.) de 2,4,6-triisopropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphorinane 2,4,6-trioxyde (T3P) en solution à 50% dans le DMF, 2mL de DMF anhydre, 100mg (1eq.) de 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-phénylamine et 640 μ L (3eq.) de triéthylamine sont ajoutés successivement dans un ballon de 10mL. La solution est agitée à TA pendant une nuit. Le DMF est

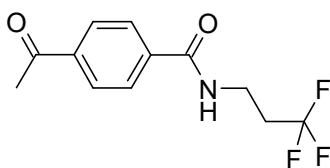
éaporé sous pression réduite. Le produit est ensuite repris dans l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution aqueuse saturée en K_2CO_3 (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 141mg (86%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 3.20\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 315$

RMN 1H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 7.82 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 8+9); 7.62 (d, 2H, $^3J = 8.70\text{Hz}$, 6+7); 7.54 (s, 1H, 12); 2.73 (s, 3H, 14); 2.60 (m, 4H, 2+3)

RMN ^{13}C (CD₃OD, 75MHz) : δ ppm = 171.1 (4); 168.3 (13); 155.9 (11); 139.8 (5); 134.2 (10); 131.5 (q, $^1J_{C-F} = 275.5\text{Hz}$, 1); 128.0 (8+9); 121.3 (6+7); 113.7 (12); 30.4 (q, $^2J_{C-F} = 29.7\text{Hz}$, 2), 30.2 (3); 18.9 (14)

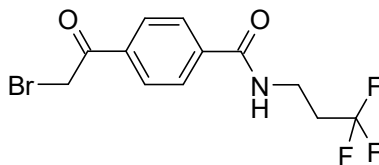
▪ **Composé 45 : 4-acétyl-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



546.6mg (1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine sont ajoutés à une solution de 600mg (1eq.) d'acide 4-acétylbenzoïque, 1.66g (1.2eq.) d'HBTU, 98mg (0.2eq.) d'HOBt, et 2.53mL (4eq.) de DIEA dans 15mL de DMF. Le milieu réactionnel est alors agité pendant 2h à TA. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite. L'huile orange obtenue est reprise dans l'acétate d'éthyle puis lavée à l'aide d'une solution aqueuse d'HCl 1N (2x), une solution aqueuse saturée en Na_2CO_3 (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 85:15 AcOEt → 80:20 → 70:30) pour donner 837 mg (88%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.70\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 260$

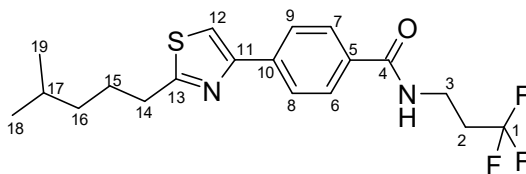
▪ **Composé 46 : 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



436.1mg (1eq.) de tribromure de triméthylphénylammonium sont ajoutés à une solution de 300mg (1eq.) de 4-acétyl-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**45**) dans un mélange de 15mL de DCE et 6mL de méthanol. La solution est agitée à 50°C. 43.6mg (0.1eq) de réactif de bromation sont ajoutés après 1h et 3h de réaction. Le DCE et le méthanol sont évaporés sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 387mg (99%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 2.93\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 340$

▪ **Composé 47 : 4-(2-(4-méthylpentyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

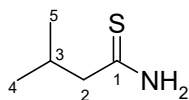


100mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) sont ajoutés à une solution de 43mg (1eq.) de 5-méthylhexanethioamide (**37**) dans 10mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux pendant 3h. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le solide beige obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 9:1 AcOEt) pour donner 25mg (22%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 3.77\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 385$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 7.99 (d, 2H, $^3J = 8.66\text{Hz}$, 8+9); 7.84 (d, 2H, $^3J = 8.66\text{Hz}$, 6+7); 7.51 (s, 1H, 12); 6.83 (t, 1H, $^3J = 5.70\text{Hz}$, NH); 3.73 (q, 2H, $^3J = 6.50\text{Hz}$, 3); 3.06 (t, 2H, $^3J = 7.77\text{Hz}$, 14); 2.53 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.92\text{Hz}$ $^3J_{2-3} = 6.78\text{Hz}$, 2); 1.87 (qn, 2H, $^3J = 7.85\text{Hz}$, 15); 1.66 (n, 1H, $^3J = 6.65\text{Hz}$, 17); 1.36 (q, 2H, $^3J = 7.51\text{Hz}$, 16); 0.95; (d, 6H, $^3J = 6.63\text{Hz}$, 18+19)

▪ **Composé 48: 3-méthylbutanethioamide**

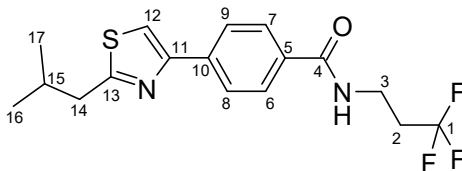


1.01g (0.5eq.) de réactif de Lawesson et 16mL de THF anhydre sont ajoutés à 505.8mg (1eq.) d'isovaléramide. La solution est agitée à TA pendant 4h puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'éther diisopropylique puis filtré. Le filtrat est ensuite purifié sur colonne de silice prépaquée (DCM 100%) pour donner 396mg (70%) d'huile transparente qui cristallise ensuite.

LC-MS : $t_R = 1.92\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 118$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 7.65 (br s, 1H, NH); 6.85 (br s, 1H, NH); 2.52 (d, 2H, $^3J = 7.28\text{Hz}$, 2); 2.25 (n, 1H, $^3J = 6.95\text{Hz}$, 3); 1.00 (d, 6H, $^3J = 6.59\text{Hz}$, 4+5)

▪ **Composé 49 : 4-(2-isobutylthiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



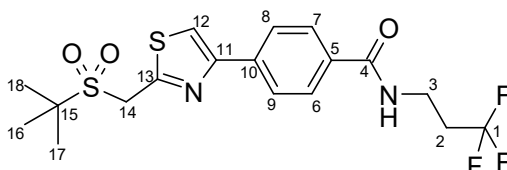
100mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) sont ajoutés à une solution de 34.7mg (1eq.) de 3-méthylbutanethioamide (**48**) dans 6mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux pendant une nuit. 3.5mg (0.1eq) de thioamide sont ajoutés et la solution est agitée 1h supplémentaire au reflux. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par HPLC préparative pour donner 78mg (74%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 3.17\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 357$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 8.01 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 8+9); 7.82 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 6+7); 7.53 (s, 1H, 12); 6.47 (br s, 1H, NH); 3.74 (t, 2H, $^3J = 6.50\text{Hz}$, 3); 2.95 (d, 2H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 14); 2.53 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.80\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.50\text{Hz}$, 2); 2.19 (n, 1H, $^3J = 6.70\text{Hz}$, 15); 1.05 (d, 6H, $^3J = 6.60\text{Hz}$, 16+17)

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75MHz) : δ ppm = 171.0 (13); 167.4 (4); 154.0 (11); 138.2 (10); 133.6 (5); 127.8 (6+7); 127.1 (q, $^1\text{J}_{\text{C-F}} = 277.8\text{Hz}$, 1); 126.7 (8+9); 114.2 (12); 42.8 (14); 34.0 (q, $^2\text{J}_{\text{C-F}} = 27.5\text{Hz}$, 2); 33.8 (3); 30.2 (15); 22.4 (16+17)

- **Composé 50 : 4-(2-(tert-butylsulfonylméthyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



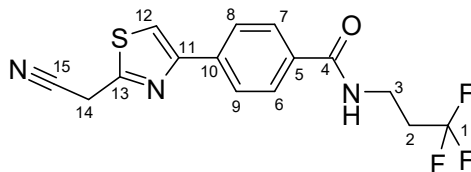
100mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) sont ajoutés à une solution de 57.8mg (1eq.) de 2-(tert-butylsulfonyl)éthanethioamide dans 6mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est agité et chauffé au reflux pendant une nuit. 11.7mg (0.2eq.) supplémentaires de thioamide sont ajoutés et le mélange est agité 2h au reflux. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 85 :15 Isopropanol \rightarrow Cyclohexane 1:1 Isopropanol) pour donner 98mg (76%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_{\text{R}} = 5.23\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [\text{M}+\text{H}]^+ = 435$

RMN ^1H (DMSO-d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.76 (t, 1H, $^3\text{J} = 5.60\text{Hz}$, NH); 8.37 (s, 1H, 12); 8.08 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.40\text{Hz}$, 8+9); 7.93 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.40\text{Hz}$, 6+7); 5.09 (s, 2H, 14); 3.52 (q, 2H, $^3\text{J} = 6.50\text{Hz}$, 3); 2.57 (qt, 2H, $^3\text{J}_{2-1} = 10.94\text{Hz}$, $^3\text{J}_{2-3} = 6.62\text{Hz}$, 2); 1.39 (s, 9H, 16+17+18)

RMN ^{13}C (DMSO-d_6 , 75MHz) : δ ppm = 166.3 (4); 157.2 (13); 153.7 (11); 136.8 (5); 133.9 (10); 128.3 (6+7); 127.5 (q, $^1\text{J}_{\text{C-F}} = 267\text{Hz}$, 1); 126.3 (8+9); 119.3 (12); 60.6 (15); 50.8 (14); 33.3 (q, $^3\text{J}_{\text{C-F}} = 3.5\text{Hz}$, 3); 32.9 (q, $^2\text{J}_{\text{C-F}} = 27.0\text{Hz}$, 2); 23.4 (16+17+18)

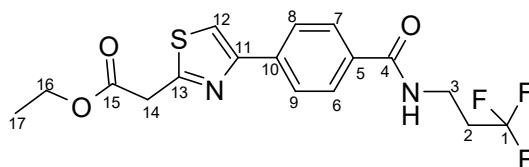
▪ **Composés 51 : 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



107mg (1.2eq.) de 2-cyanothioacétamide sont ajoutés à une solution de 300mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) dans 25mL de THF. Le milieu est agité pendant 24h au reflux. Le THF est alors évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à la saumure (2x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 302mg de solide orange. Le produit brut est utilisé ainsi dans la réaction suivante.

LC-MS : $t_R = 2.96\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M-H]^- = 296$

▪ **Composé 52 : 2-(4-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétate d'éthyle**

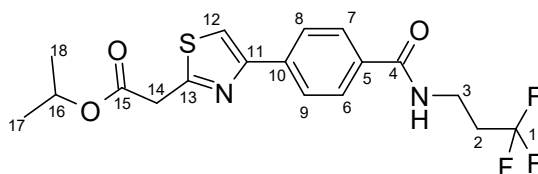


150mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) sont ajoutés à une solution de 44.4mg (1.1eq.) de 2-cyanoéthanethioamide dans 10mL de THF. Le mélange est agité pendant 15h au reflux. Le THF est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est utilisé tel quel. Sous argon, 515 μL (20eq.) d'éthanol absolu et 545 μL (10eq.) de TMSCl sont successivement ajoutés à TA dans un ballon sec. Le mélange est ensuite agité à 40°C pendant 2h. 200 μL de SOCl_2 sont alors ajoutés dans 1mL d'éthanol absolu. Le milieu réactionnel est agité à 40°C pendant 2h puis laissé revenir à TA. 1mL d'eau est ensuite ajouté et le pH est neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 . Le mélange est agité 15min à TA puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées à la saumure (2x), séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Le solide orange obtenu est recristallisé dans 2mL d'éthanol absolu pour donner 58mg (34%) de cristaux marron clair.

LC-MS : $t_R = 2.77\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 387$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 8.01 (d, 2H, $^3J = 8.50\text{Hz}$, 8+9); 7.83 (d, 2H, $^3J = 8.50\text{Hz}$, 6+7); 7.65 (s, 1H, 12); 6.47 (br s, 1H, NH); 4.26 (q, $^3J = 7.10\text{Hz}$, 16); 4.14 (s, 2H, 14); 3.73 (q, 2H, $^3J = 6.40\text{Hz}$, 3); 2.53 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.9\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.60\text{Hz}$, 2); 1.32 (t, 3H, $^3J = 7.10\text{Hz}$, 17)

▪ **Composé 53 : 2-(4-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)thiazol-2-yl)acétate d'isopropyle**



Sous argon, 3.23mL (48eq.) d'isopropanol, 2.66mL (24eq.) de TMSCl et 300mg (1eq.) de 4-(2-(cyanométhyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**51**) sont successivement ajoutés à TA dans un ballon sec. La solution est agitée pendant 10min à TA puis 16 μL (1eq.) d'eau sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité à 40°C pendant une nuit. Le pH est neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 . Le mélange est agité 15 min à TA puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées à la saumure (2x), séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Le résidu obtenu est alors purifié sur colonne de silice prépaquée (AcOEt 3:7 Cyclohexane) pour donner 51mg (15%) de solide blanc.

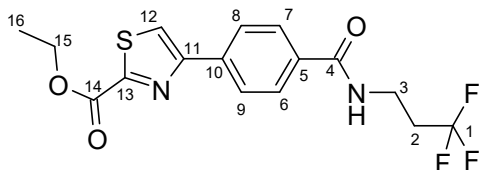
LC-MS : $t_R = 5.87\text{min}$ (méthode d) ; $m/z : [M+H]^+ = 387$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 7.99 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 8+9); 7.83 (d, 2H, $^3J = 8.60\text{Hz}$, 6+7); 7.58 (s, 1H, 12); 6.44 (m, 1H, NH); 5.14 (sp, 1H, $^3J = 6.30\text{Hz}$, 16); 4.13(s, 2H, 14); 3.77 (q, 2H, $^3J = 6.30\text{Hz}$, 3); 2.52 (tq, 2H, $^3J_{2-1} = 10.8\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.30\text{Hz}$, 2); 1.32 (d, 6H, $^3J = 6.20\text{Hz}$, 17+18)

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75MHz) : δ ppm = 168.9 (4); 167.4 (13); 163.0 (15); 154.0 (11); 137.9 (6); 133.9 (5); 127.9 (6+7); 127.3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 277.0\text{Hz}$, 1); 126.8 (8+9); 116.1 (12); 69.8 (16); 39.8 (14); 34.1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 27.5\text{Hz}$, 2); 33.9 (3); 22.0 (17+18)

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 282.4MHz) : δ ppm = -64.95 (t, $^3J = 10.8\text{Hz}$)

▪ **Composés 54 : 4-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)thiazole-2-carboxylate d'éthyle**

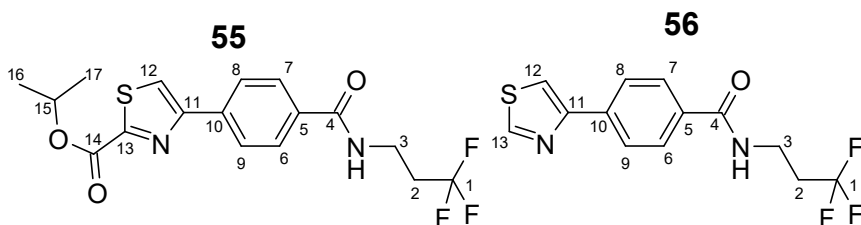


150mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**), 71mg (1.2eq.) de thiooxamate d'éthyle et 15mL de THF sont introduits dans un ballon de 50mL. Le mélange est chauffé à reflux pendant 24h. 11.5mg (0.2eq) de thioamide sont ajoutés et la solution est à nouveau agitée pendant 24h au reflux. 350mg (3eq.) de résine PS-Tos-NHNH₂ sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité à TA pendant une nuit. La solution est ensuite filtrée puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en K₂CO₃ (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 8:2 AcOEt → Cyclohexane 7:3 AcOEt) pour donner 100.1mg (61%) de poudre beige.

LC-MS : t_R = 3.22min (méthode c) ; m/z : [M+H]⁺ = 373

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) : δ ppm = 8.05 (d, 2H, ³J = 8.60Hz, 8+9) ; 7.81-7.85 (m, 3H, 6+7+12) ; 6.44 (m, 1H, ³J = 5.90Hz, NH) ; 4.53 (q, 2H, ³J = 7.10Hz, 15) ; 3.75 (q, 2H, ³J = 6.30Hz, 3) ; 2.50 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.80Hz, ³J₂₋₃ = 6.60Hz, 2) ; 1.47 (t, 3H, ³J = 7.10Hz, 16)

▪ **Composés 55: 4-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)thiazole-2-carboxylate d'isopropyle et et 56 : 4-(thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



100mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**), 40mg (1.1eq.) de thiooxamate d'éthyle et 10mL de THF sont introduits dans un ballon de 25mL. Le mélange est agité

pendant 24h au reflux. Le THF est évaporé sous pression réduite. Le produit est alors solubilisé dans 2.5mL d'isopropanol.

Dans un ballon refroidi à 0°C, 20.4mg (3eq.) de sodium sont dissous sous argon dans 2.5mL d'isopropanol. Le mélange est chauffé à 30°C jusqu'à dissolution complète du sodium. A cette solution est ajoutée goutte à goutte la solution dans l'isopropanol précédemment réalisée. Le mélange est ensuite agité pendant une nuit au reflux. 500µL de SOCl₂ sont alors ajoutés. La solution est agitée pendant une nuit au 50°C. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et les deux composés **55** et **56** formés en proportions identiques sont séparés par HPLC préparative pour donner 24mg de **55** et 21.7mg de **56**.

55 :

LC-MS : t_R = 4.90min (méthode d) ; m/z : [M+H]⁺ = 387

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) : δ ppm = 8.07 (d, 2H, ³J = 8.50Hz, 8+9); 7.84 (s, 1H, 12); 7.85 (d, 2H, ³J = 8.50Hz, 6+7); 6.42 (m, 1H, NH); 5.37 (sp, 1H, ³J = 6.30Hz, 15); 3.77 (q, 2H, ³J = 6.30Hz, 3); 2.52 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.70Hz, ³J₂₋₃ = 6.40Hz, 2); 1.46 (d, 6H, ³J = 6.30Hz, 16+17)

RMN ¹³C (CD₂Cl₂, 75MHz) : δ ppm = 166.7 (4); 159.2 (13 ou 14); 159.0 (13 ou 14); 156.0 (11); 136.6 (10); 134.1 (5); 127.5 (6+7); 126.7 (q, ¹J_{C-F} = 276.8Hz, 1); 126.6 (8+9); 120.2 (12); 70.8 (15); 33.6 (q, ²J_{C-F} = 27.5Hz, 2); 33.5 (q, ³J_{C-F} = 3.6Hz, 3); 21.5 (16+17)

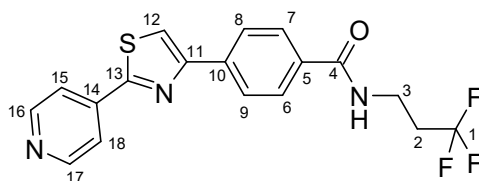
56 :

LC-MS : t_R = 5.82min (méthode d) ; m/z : [M+H]⁺ = 301

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) : δ ppm = 8.92 (d, 1H, ⁴J = 1.80Hz, 13); 8.03 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 8+9); 7.85 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 6+7); 7.64 (d, 1H, ⁴J = 1.80Hz, 12); 3.77 (q, 2H, ³J = 6.30Hz, 3); 2.51 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.80Hz, ³J₂₋₃ = 6.40Hz, 2)

RMN ¹³C (CD₂Cl₂, 75MHz) : δ ppm = 166.8 (4); 155.0 (11); 153.3 (13); 137.3 (10); 133.5 (5); 127.4 (6+7); 126.5 (8+9); 114.4 (12); 33.6 (q, ²J_{C-F} = 27.3Hz, 2); 33.4 (3)

▪ **Composés 57: 4-(2-(pyridin-4-yl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



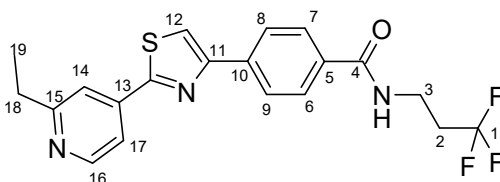
32.7mg (1eq.) de thioisonicotinamide sont ajoutés à une solution de 100mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) dans 6mL de THF. Le mélange est agité pendant une nuit au reflux. Le précipité formé est filtré puis lavé à l'éther diéthylique. Le solide orange obtenu est ensuite repris à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter, lavé avec une solution saturée de K_2CO_3 puis à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 8:2 Isopropanol) pour donner 59mg (66%) de solide jaune.

LC-MS : $t_R = 2.32\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 378$

RMN 1H (CD $_3$ OD, 300MHz) : δ ppm = 8.70 (m, 2H, 16+17); 8.20 (s, 1H, 12); 8.18 (d, 2H, $^3J = 8.80\text{Hz}$, 8+9); 8.08 (m, 2H, 15+18); 7.94 (d, 2H, $^3J = 8.80\text{Hz}$, 6+7); 3.67 (t, 2H, $^3J = 7.00\text{Hz}$, 3); 2.57 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 11.0\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.00\text{Hz}$, 2)

RMN ^{13}C (CD $_3$ OD, 75MHz) : δ ppm = 168.5 (4); 164.7 (13); 155.9 (11); 149.9 (16+17); 141.2 (14); 137.1 (5); 133.7 (10); 127.5 (6+7); 126.6 (q, $^1J_{C-F} = 278.1\text{Hz}$, 1); 126.2 (8+9); 120.6 (15+18); 117.2 (12); 33.1 (q, $^3J_{C-F} = 3.3\text{Hz}$, 3); 32.7 (q, $^2J_{C-F} = 27.8\text{Hz}$)

▪ **Composés 58: 4-(2-(2-éthylpyridin-4-yl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



45mg (1.1eq.) d'éthionamide sont ajoutés à une solution de 100mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) dans 10mL de THF. Le mélange est agité à reflux pendant 24h. Le précipité formé est filtré puis lavé par une solution d'éther diéthylique. Le solide jaune obtenu est ensuite repris à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter, lavé avec une solution saturée de

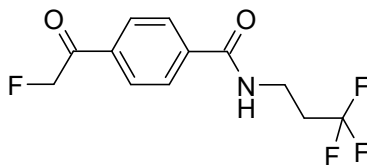
K₂CO₃ puis à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 75mg (63%) de solide jaune.

LCMS : t_R = 3.12min (méthode c) ; (m/z) : [M+H]⁺ = 406

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) : δ ppm = 8.66 (d, 1H, ³J = 5.30Hz, 16); 8.09 (d, 2H, ³J = 8.50Hz, 8+9); 7.86 (d, 2H, ³J = 8.5Hz, 6+7); 7.78 (s, 1H, 12); 7.69 (m, 2H, 15+17); 6.45 (m, 1H, NH); 3.77 (q, 2H, ³J = 6.30Hz, 3); 2.94 (q, 2H, ³J = 7.60Hz, 19); 2.52 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.80Hz, ³J₂₋₃ = 6.40Hz, 2); 1.40 (t, 3H, ³J = 7.60Hz, 20)

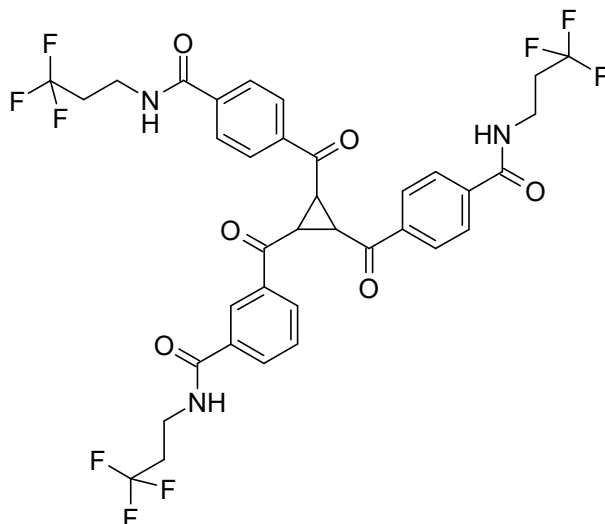
RMN ¹³C (CD₂Cl₂, 75MHz) : δ ppm = 167.5 (4); 166.5 (13); 165.4 (18); 156.1 (16); 150.6 (16); 140.9 (14); 137.6 (10); 134.4 (5); 128.1 (q, ¹J_{C,F} = 276.9Hz, 1); 128.0 (6+7); 127.0 (8+9); 119.1 (17); 118.2 (15); 116.4 (12); 34.26 (q, ²J_{C,F} = 27.7Hz, 2); 34.1 (3); 32.0 (19); 14.2 (20)

▪ **Composé 59 : 4-(2-fluoroacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

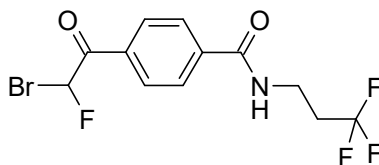


Une solution de 332mg (6eq.) de KF, 126mg (0.5eq.) d'éther couronne 18-6 dans 60mL d'acétonitrile est agitée pendant 5min à 70°C. Une solution de 323mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) dans 29mL d'acétonitrile est alors ajoutée toujours à 70°C au goutte à goutte (sur 2h) grâce à une ampoule de coulée. Le milieu réactionnel est agité à 70°C pendant 1 nuit. L'acétonitrile est évaporé sous pression réduite. Le produit est alors repris dans l'acétate d'éthyle et lavé à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite pour donner 265mg (100%) de poudre blanche.

LCMS : t_R = 2.42min (méthode c) ; (m/z) : [M-H]⁻ = 276

▪ **Composé 60**

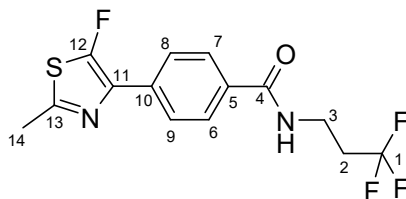
LCMS : $t_R = 3.06\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 772$

▪ **Composé 61 : 4-(2-bromo-2-fluoroacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

396mg (2eq.) de CuBr_2 sont ajoutés à une solution de 265mg (1eq.) de 4-(2-fluoroacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**59**) dans 10mL d'acétate d'éthyle. Le milieu réactionnel est agité pendant 1h30 à 90°C. Aucune conversion du produit de départ n'est observée par analyse LCMS ou CCM. 360mg (1eq.) de tribromure de triméthylphénylammonium sont alors ajoutés au milieu réactionnel qui est agité à 90°C pendant 2h. 198mg (1eq.) de CuBr_2 et 360mg (1eq.) de tribromure de triméthylphénylammonium sont ensuite ajoutés et la solution est agitée 2h supplémentaires à 90°C. La solution est refroidie à TA puis 10mL d'une solution aqueuse saturée en NH_4Cl sont ajoutés. Le mélange est agité 20min à TA. La phase aqueuse est séparée par décantation, la phase organique est lavée à l'aide d'une solution aqueuse saturée en NH_4Cl (2x), à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite pour donner une huile orange utilisée sans purification supplémentaire dans l'étape suivante.

LC-MS : $t_R = 2.78\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 354$

▪ **Composé 62 : 4-(5-fluoro-2-méthylthiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



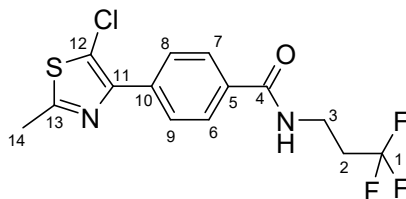
101mg (1eq.) de Selectfluor sont ajoutés à une solution de 90mg de 4-(2-méthylthiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**43**) dans 1.1mL de DMF anhydre. La solution est agitée pendant 15h à 5°C. L'analyse LCMS du milieu réactionnel montre une très faible conversion du produit de départ. 0.5eq de Selectfluor sont alors ajoutés à 0°C et la solution est agitée pendant une nuit à 15°C. 1eq. supplémentaire de Selectfluor est alors ajouté à 0°C puis la solution est agitée pendant 24h à TA. Une conversion >70% est ainsi obtenue. 1mL d'une solution d'ammoniaque 2M dans l'éthanol ainsi que 0.5mL d'eau sont ajoutés à 0°C et la solution est agitée à TA pendant une nuit. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est reprise dans l'acétate d'éthyle puis lavée à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le solide jaune obtenu est purifié par HPLC préparative pour donner 15mg (16%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.93\text{min}$ (méthode c), 5.32min (méthode d) ; $m/z : [M+H]^+ = 333$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 7.97 (d, 2H, $^3J = 8.30\text{Hz}$, 8+9); 7.81 (d, 2H, $^3J = 8.30\text{Hz}$, 6+7); 6.52 (br s, 1H, NH); 3.70 (q, 2H, $^3J = 6.50\text{Hz}$, 3); 3.63 (d, 3H, $^5J = 2.30\text{Hz}$, 14); 2.50 (qt, $^3J_{2-1} = 10.90\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.70\text{Hz}$, 2)

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75MHz) : δ ppm = 167.4 (4); 158.2 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 302.1\text{Hz}$, 12); 154.5 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8.6\text{Hz}$, 13); 135.7 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 5.8\text{Hz}$, 10); 133.6 (5); 133.5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 12.7\text{Hz}$, 11); 127.8 (6+7); 127.3 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 6.1\text{Hz}$, 8+9); 127.2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 275.4\text{Hz}$, 1); 34.2 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 27.0\text{Hz}$, 2), 34.0 (3); 20.7 (14)

▪ **Composé 64 : 4-(5-chloro-2-méthylthiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



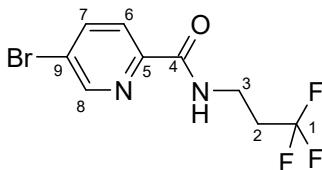
50mg (1eq.) d'acide 4-(2-méthylthiazol-4-yl)benzoïque sont ajoutés à une solution de 5mL de chlorure de thionyle. Le mélange est agité à 50°C pendant 2h. 2mL de chlorure de thionyle sont alors ajoutés et la solution est agitée 2h supplémentaires à 50°C. Un troisième ajout de 2mL de SOCl₂ est ensuite effectué et la solution est agitée 2h supplémentaires à 50°C. Le milieu réactionnel est alors évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu (composé **63**) est repris dans le dichlorométhane. 34mg (1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine et 158μL (4eq.) de DIEA sont ajoutés au milieu réactionnel et la solution est agitée pendant une nuit à TA. Le dichlorométhane est alors évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à la saumure (2x), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. L'huile beige obtenue est alors purifiée une première fois sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 85:15 iPrOH). La poudre blanche récupérée n'est pas pure. Le produit est ensuite purifié sur HPLC préparative pour donner 23.5mg (29%) de poudre blanche.

LCMS : t_R = 3.37min (méthode c) ; m/z : [M+H]⁺ = 349, [M-H]⁻ = 347

RMN ¹H (CD₂Cl₂, 300MHz) : δ ppm = 8.08 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 8+9); 7.84 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 6+7); 6.50 (m, 1H, NH); 3.74 (q, 2H, ³J = 6.40Hz, 3); 2.70 (s, 3H, 14); 2.53 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.90Hz, ³J₂₋₃ = 6.40Hz, 2)

RMN ¹³C (CD₂Cl₂, 75MHz) : δ ppm = 167.4 (4); 163.6 (13); 148.2 (11); 136.7 (10); 134.1 (5); 128.8 (6+7); 127.4 (8+9); 127.3 (q, ¹J_{C,F} = 277Hz, 1); 121.1 (12); 34.1 (q, ²J_{C,F} = 27.6Hz, 2); 34.0 (q, ³J_{C,F} = 3.1 Hz, 3); 20.1 (14)

▪ **Composé 65: 5-bromo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)picolinamide**

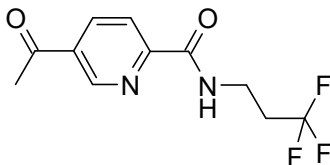


296mg (1eq.) de chlorhydrate 3,3,3-trifluoropropylamine sont ajoutés à une solution de 400mg (1eq.) d'acide 5-bromopicolinique, 1.40mL (1.2eq.) de solution de T3P à 50% dans l'AcOEt et 1.03mL (3eq.) de DIEA dans 10mL d'AcOEt. Le mélange est agité pendant 3h à TA. On ajoute alors de l'eau et de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau (2x) puis à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite pour donner 433mg (74%) de solide blanc.

LC-MS : $t_R = 2.58\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 297$

RMN ^1H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 8.73 (dd, 1H, $^4J_{7-8} = 2.25\text{Hz}$, $^5J_{8-6} = 0.52\text{Hz}$, 8); 8.16 (dd, 1H, $^3J_{7-6} = 8.39\text{Hz}$, $^4J_{7-8} = 2.27\text{Hz}$, 7); 8.01 (dd, 1H, $^3J_{6-7} = 8.33\text{Hz}$, $^5J_{6-8} = 0.59\text{Hz}$, 6); 3.67 (q, 2H, $^3J = 6.79\text{Hz}$, 3); 2.53 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.99\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.11\text{Hz}$, 2)

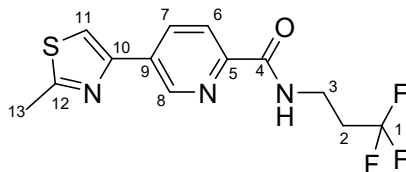
▪ **Composé 66 : 5-acétyl-N-(3,3,3-trifluoropropyl)picolinamide**



400mg (1eq.) de 5-bromo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)picolinamide (**65**) sont ajoutés à une solution de 95mg (0.1eq.) de PdCl₂(PPh₃)₂ dans 3.5mL de toluène dans un tube de type Schlenk sous argon. Le mélange est agité pendant 5min à TA puis 545 μ L (1.2eq.) de tributyl(1-éthoxyvinyl)stannane sont ajoutés toujours sous argon. Le milieu réactionnel est alors agité pendant une nuit à 90°C. La solution est refroidie à TA puis 1mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N est ajouté. Le mélange est alors agité pendant 1h à TA. Le milieu réactionnel est neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure (2x), séchées sur sulfate de magnésium et filtrées sur célite. Le résidu jaune obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 95:5 AcOEt \rightarrow 9:1 \rightarrow 85:15 \rightarrow 75:25 \rightarrow 7:3) pour donner 250mg (71%) de solide blanc.

LC-MS : $t_R = 1.57\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 261$

▪ **Composé 67 : 5-(2-méthylthiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)picolinamide**

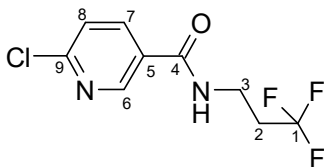


332mg (1eq.) de tribromure de triméthylphénylammonium sont ajoutés à une solution de 230mg (1eq.) de 5-acétyl-N-(3,3,3-trifluoropropyl)picolinamide (**66**) dans un mélange DCE (12.5mL) / MeOH (5mL). Le mélange est agité pendant 24h à 70°C. Le mélange de solvant est alors évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et lavé à l'eau puis à la saumure. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite pour donner un solide jaune qui est ensuite solubilisé dans 2mL d'EtOH absolu. 101mg (1.5eq.) de thioacétamide sont alors ajoutés et le milieu réactionnel est agité pendant 4h à reflux. L'EtOH est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau (2x) et à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par HPLC préparative pour donner 125mg (45%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.53\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 316$

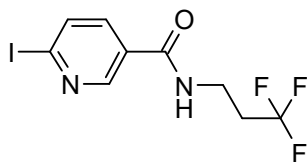
RMN ^1H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 9.15 (dd, 1H, $^4J_{8-7} = 2.20\text{Hz}$, $^5J_{8-6} = 0.75\text{Hz}$, 8); 8.40 (dd, 1H, $^3J_{7-6} = 8.18\text{Hz}$, $^4J_{7-8} = 2.23\text{Hz}$, 7); 8.12 (dd, 1H, $^3J_{6-7} = 8.18\text{Hz}$, $^5J_{6-8} = 0.74\text{Hz}$, 6); 7.94 (s, 1H, 11); 3.69 (t, 2H, $^3J = 7.11\text{Hz}$, 3); 2.78 (s, 3H, 13); 2.55 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.97\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.22\text{Hz}$, 2)

RMN ^{13}C (CD₃OD, 75MHz) : δ ppm = 167.7 (12); 165.2 (4); 150.7 (10); 148.2 (5); 146.2 (8); 134.3 (7); 132.7 (9); 126.5 (q, $^1J_{C-F} = 275.9\text{Hz}$, 1); 121.7 (6); 116.2 (11); 32.8 (q, $^2J_{C-F} = 27.8\text{Hz}$, 2); 32.6 (q, $^3J_{C-F} = 3.7\text{Hz}$, 3); 17.5 (13)

▪ **Composé 68 : 6-chloro-N-(3,3,3-trifluoropropyl)nicotinamide**

700mg (1eq.) de chlorure d'acide 6-chloronicotinique sont ajoutés à une solution de 595mg (1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine et 1.75mL (4eq.) de N-méthylmorpholine dans 40mL de DCM anhydre. Le milieu réactionnel est agité pendant 1h à TA. Un équivalent supplémentaire (700mg) de chlorure d'acide est ajouté et la solution est agitée pendant une nuit à TA. Le DCM est évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu est repris dans un mélange Cyclohexane 1:1 Acétate d'éthyle puis filtré sur silice. Le produit est ensuite purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 7:3 AcOEt) pour donner 918mg (92%) de poudre blanche.

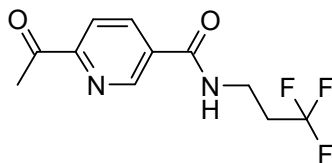
LC-MS : $t_R = 2.32\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+ = 253$, $[M-H]^- = 251$

▪ **Composé 69 : 6-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)nicotinamide**

28 μ L (0.2eq.) de chlorure d'acide acétique sont ajoutés sous argon à une solution de 500mg (1eq.) de 6-chloro-N-(3,3,3-trifluoropropyl)nicotinamide (**68**), 1.48g (5eq.) de NaI dans 15mL d'acétonitrile dans un tube à carrousel. La solution est agitée à 105°C pendant une nuit. L'acétonitrile est évaporée sous pression réduite, le produit est alors repris dans l'acétate d'éthyle, filtré, lavé avec une solution aqueuse de Na₂SO₃ à 10% puis avec une solution aqueuse de Na₂CO₃ à 5% puis à la saumure. La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 619mg (91%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.33\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+ = 345$, $[M-H]^- = 343$

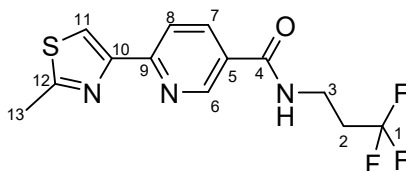
▪ **Composé 70 : 6-acétyl-N-(3,3,3-trifluoropropyl)nicotinamide**



300mg (1eq.) de 6-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)nicotinamide (**69**) sont ajoutés à une solution de 61mg (0.1eq.) de PdCl₂(PPh₃)₂ dans 2.6mL de toluène. Le milieu réactionnel est agité 5min à TA puis 353μL (1.2eq.) de tributyl(1-éthoxyvinyl)stannane sont ajoutés sous argon. Le milieu réactionnel est alors agité sous argon pendant une nuit à 110°C. Le milieu réactionnel est refroidi à TA, puis 8mL d'une solution aqueuse d'HCl 1N sont ajoutés et la solution est agitée pendant 2h à TA. Le milieu réactionnel est neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. Le milieu est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure (2x), séchées sur sulfate de magnésium et filtrées sur célite. Le résidu marron obtenu est solubilisé dans 5mL d'acétonitrile puis filtré. Le filtrat est alors purifié par HPLC préparative pour donner 89mg (35%) de poudre blanche.

LC-MS : t_R = 4.10min (méthode d) ; m/z : [M+H]⁺ = 261, [M-H]⁻ = 259

▪ **Composé 71 : 6-(2-méthylthiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)nicotinamide**



129mg (1eq.) de tribromure de triméthylphénylammonium sont ajoutés à une solution de 89mg (1eq.) de 6-acétyl-N-(3,3,3-trifluoropropyl)nicotinamide (**70**) dans 5.9mL d'un mélange DCE 5:2 MeOH. Le milieu réactionnel est agité à 50°C pendant 2h. L'analyse LCMS du milieu montre un taux de conversion quasi nul, la réaction est alors chauffée à 70°C pendant 72h. L'analyse LCMS du milieu montre une conversion non complète du milieu réactionnel et la formation de deux produits majoritaires : la cétone mono-bromée et la cétone mono-chlorée, ainsi qu'un peu de cétone di-chlorée. La réaction est néanmoins stoppée, et le mélange de solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans 1 mL d'éthanol absolu. 26 mg (1eq.) de thioacétamide sont alors ajoutés et la solution est agitée pendant 1h à reflux. 13mg (0,5eq.) supplémentaires sont ajoutés et le milieu

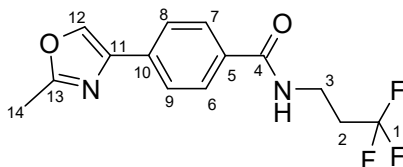
réactionnel est agité pendant 3h au reflux puis refroidi à TA. 6mL d'éther diéthylique sont ajoutés et la solution est refroidie au réfrigérateur pendant une nuit. Le précipité formé est filtré puis lavé à l'éther diéthylique. Le précipité est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite afin de donner 39mg (34%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.28\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+ = 316$, $[M-H]^- = 314$

RMN ¹H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 8.97 (dd, 1H, ⁴J₆₋₇ = 2.29Hz, ⁵J₆₋₈ = 0.84Hz, 6); 8.24 (dd, 1H, ³J₇₋₈ = 8.27Hz, ⁴J₇₋₆ = 2.30Hz, 7); 8.13 (dd, 1H, ³J₈₋₇ = 8.30Hz, ⁵J₈₋₆ = 0.81Hz, 8); 8.11 (s, 1H, 11); 3.65 (t, 2H, ³J = 7.00Hz, 3); 2.76 (s, 3H, 13); 2.55 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.84Hz, ³J₂₋₃ = 7.13Hz, 2)

RMN ¹³C (CD₃OD, 75MHz) : δ ppm = 167.3 (12); 166.4 (4); 154.4 (9); 153.4 (10); 148.1 (6); 136.1 (7); 128.5 (5); 126.6 (q, ¹J_{C-F} = 276.3Hz, 1); 120.3 (8); 118.8 (11); 33.1 (q, ³J_{C-F} = 9.74Hz, 3); 32.6 (q, ²J_{C-F} = 27.7Hz, 2); 17.6 (13)

▪ **Composé 72 : 4-(2-méthylloxazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



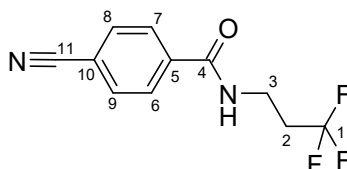
100mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) sont ajoutés à une solution de 21mg (1.2eq.) d'acétamide dans 300 μ L de toluène. Le milieu réactionnel est agité en réacteur micro-ondes pendant 10min à 110°C ($P_{\text{max}} = 300\text{W}$). 240mg (3eq.) de résine Tos-NHNH₂ sont ajoutés. La solution est agitée une nuit à TA puis filtrée. La solution est reprise dans l'acétate d'éthyle puis lavée à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite afin de donner 68mg (77%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 2.30\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+ = 299$, $[M-H]^- = 297$

RMN ¹H (CD₂Cl₂, 300MHz) : δ ppm = 7.97 (s, 1H, 12); 7.84-7.77 (m, 4H, 6+7+8+9); 3.70 (q, 2H, ³J = 6.50Hz, 3); 2.60-2.44 (m, 5H, 14+2)

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75MHz): δ ppm = 167.6 (4); 162.8 (13); 140.0 (11); 134.9 (5 ou 10); 134.8 (5 ou 10); 133.6 (12); 127.8 (6+7 ou 8+9); 127.1 (q, $^1\text{J}_{\text{C-F}} = 277.0\text{Hz}$, 1); 125.7 (6+7 ou 8+9); 33.8 (q, $^2\text{J}_{\text{C-F}} = 27.1\text{Hz}$, 2); 33.8 (q, $^3\text{J}_{\text{C-F}} = 3.7\text{Hz}$, 3); 14.0 (14)

▪ **Composé 73 : 4-cyano-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

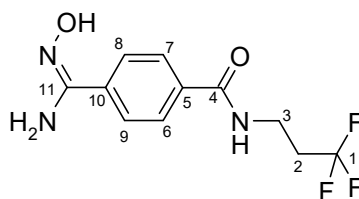


305mg (1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine sont ajoutés à une solution de 300mg (1eq.) d'acide 4-cyanobenzoïque, 1.46mL (1.2eq.) de solution de T3P à 50% dans l'acétate d'éthyle et 1.4mL (4eq.) de DIEA dans 3mL d'acétate d'éthyle. Le milieu réactionnel est agité une nuit à TA. La solution est alors lavée à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, évaporée sous pression réduite pour donner 424mg (86%) de solide blanc.

LC-MS: $t_{\text{R}} = 2.31\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[\text{M-H}]^- = 241$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz): δ ppm = 7.86 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.47\text{Hz}$, 6+7); 7.75 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.47\text{Hz}$, 8+9); 6.50 (br s, 0.5H, NH); 3.74 (q, 2H, $^3\text{J} = 6.30\text{Hz}$, 3); 2.49 (qt, 2H, $^3\text{J}_{2-1} = 10.69\text{Hz}$, $^3\text{J}_{2-3} = 6.38\text{Hz}$, 2)

▪ **Composé 74 : 4-(N'-hydroxycarbamimidoyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

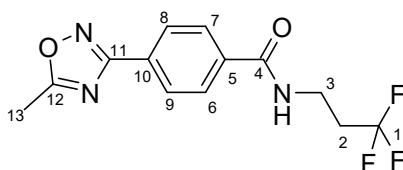


300mg (1eq.) de 4-cyano-N-(3,3,3-trifluoropropyl)-benzamide (**73**) sont ajoutés à une solution de 129mg (1.5eq.) de chlorhydrate d'hydroxylamine et 343 μL (1.6eq.) de DIEA dans 2.5mL d'éthanol. La solution est agitée à reflux pendant 2h. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite pour donner 330mg (97%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 3.74\text{min}$ (méthode d) ; m/z : $[M-H]^- = 274$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 9.79 (s, 1H, OH); 8.70 (t, 1H, $^3J = 5.52\text{Hz}$, NH-amide); 7.83 (d, 2H, $^3J = 8.55\text{Hz}$, 6+7 ou 8+9); 7.77 (d, 2H, $^3J = 8.48\text{Hz}$, 7+6 ou 8+9); 5.89 (s, 2H, NH_2); 3.50 (q, 2H, $^3J = 6.49\text{Hz}$, 3); 2.55 (qt, 2H, $^3J_{2,1} = 11.42\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 6.94\text{Hz}$, 2).

▪ **Composé 75 : 4-(5-méthyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



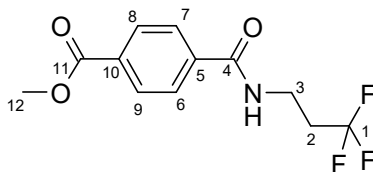
330mg (1eq.) de 4-(N'-hydroxycarbamimidoyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**74**) sont ajoutés à une solution de 78 μL (1.1eq.) d'acide acétique, 1.84mL (2.5eq.) de solution de T3P à 50% dans l'acétate d'éthyle et 643 μL (3eq.) de DIEA dans 9mL d'acétate d'éthyle. La solution est agitée pendant une nuit au reflux. La conversion est incomplète. Le milieu réactionnel est alors évaporé sous pression réduite. 1mL d'acétate d'éthyle, 368 μL (0.5eq.) de T3P et 107 μL (0.5eq.) de DIEA sont ajoutés. La solution est agitée pendant 48h au reflux. 2mL d'eau sont alors ajoutés et la réaction est agitée pendant 15min à TA. La phase organique est ensuite lavée à l'eau (2x) puis à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 9:1 Isopropanol) pour donner 215mg (66%) de solide blanc.

LC-MS : $t_R = 2.37\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+ = 300$, $[M-H]^- = 298$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.86 (t, 1H, $^3J = 5.54\text{Hz}$, NH); 8.09 (d, 2H, $^3J = 8.46\text{Hz}$, 8+9); 7.99 (d, 2H, $^3J = 8.55\text{Hz}$, 6+7); 3.52 (q, 2H, $^3J = 6.42\text{Hz}$, 3); 2.68-2.50 (m, 5H, 13+2)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz) : δ ppm = 177.8 (12); 167.1 (11); 165.6 (4); 136.6 (5); 128.8 (10); 128.1 (6+7); 127.0 (8+9); 126.9 (q, $^1J_{C-F} = 277.1\text{Hz}$, 1); 32.9 (3); 32.4 (q, $^2J_{C-F} = 27.1\text{Hz}$, 2)

▪ **Composé 76 : 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzoate de méthyle**

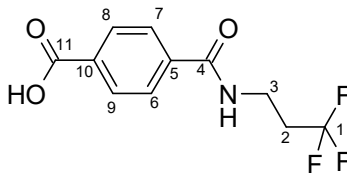


1,66g (1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine sont ajoutés à une solution de 2g (1eq.) de mono-méthyltéréphtalate, 5.04g (1.2eq.) de HBTU, 0.3g (0.2eq.) d'HOBt et 7.7mL (4eq.) de DIEA dans 45.5mL de DMF sur tamis moléculaire. Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 1h. Le DMF est alors évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé avec une solution saturée en NaHCO₃ (2x), une solution d'acide chlorhydrique 1N (2x) à l'eau (1x) et à la saumure (1x). La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 9:1 AcOEt → Cyclohexane 85:15 AcOEt) pour donner 1.25g (41%) de poudre blanche. Les fractions impures sont de nouveau purifiées sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 9:1 AcOEt) pour donner 1.27g (41%) de poudre blanche. Cela conduit à un rendement de 82%.

LCMS : t_R = 2.44min (méthode c) ; m/z : [M-H]⁻ = 274

RMN ¹H (CD₂Cl₂, 300MHz) : δ ppm : 8.10 (d, 2H, ³J = 8.63Hz, 8+9 ou 6+7); 7.83 (d, 2H, ³J = 8.55Hz, 7+6 ou 8+9); 6.60 (br s, 1H, NH); 3.95 (s, 3H, 12); 3.74 (q, 2H, ³J = 6.45Hz, 3); 2.53 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.93Hz, ³J₂₋₃ = 6.63Hz, 2)

▪ **Composé 77 : acide 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzoïque**



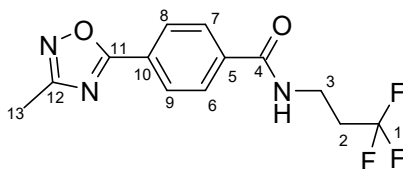
300mg (1eq.) de 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzoate de méthyle (**76**) sont ajoutés à une solution de 244.6mg (4eq.) d'hydroxyde de potassium dans 2.66mL de MeOH. Le mélange est agité au reflux pendant 2h. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite. Le solide blanc obtenu est repris dans un mélange Eau : AcOEt. La phase aqueuse est lavée à l'acétate d'éthyle puis acidifiée à l'aide d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH=2. Le précipité blanc

formé est alors solubilisé dans l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau (2x) puis à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite pour donner 254mg (89%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 4.28\text{min}$ (méthode d) ; $m/z : [M-H]^- = 260$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 13.21 (br s, 1H, COOH); 8.84 (t, 1H, $^3J = 5.56\text{Hz}$, NH); 8.02 (d, 2H, $^3J = 8.25\text{Hz}$, 6+7 ou 8+9); 7.91 (d, 2H, $^3J = 8.25\text{Hz}$, 6+7 ou 8+9); 3.50 (q, 2H, $^3J = 6.30\text{Hz}$, 3); 2.55 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 11.44\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.96\text{Hz}$, 2)

▪ **Composé 78 : 4-(3-méthyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



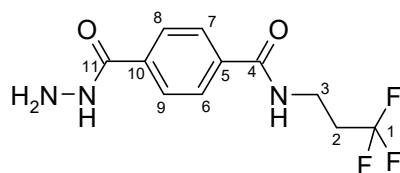
100mg (1eq.) d'acide 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzoïque (**77**) sont ajoutés à une solution de 28.4mg (1eq.) d'acétamidoxime, 570 μL (2.5eq.) de solution de T3P à 50% dans l'acétate d'éthyle, 199 μL (3eq.) de DIEA dans 191 μL d'acétate d'éthyle. Le mélange est agité au reflux pendant 12h. L'analyse CCM du milieu révèle une conversion incomplète. 228 μL (1eq.) de solution de T3P et 66 μL (1eq.) de DIEA sont alors ajoutés. La réaction est agitée 24h supplémentaires au reflux. 200 μL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel à TA et la solution est agitée pendant 10min à TA. Le produit est purifié par HPLC préparative pour donner 88mg (77%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 3.00\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M-H]^- = 298$

RMN ^1H (CD $_2$ Cl $_2$, 300MHz) : δ ppm = 8.21 (d, 2H, $^3J = 8.42\text{Hz}$, 8+9); 7.91 (d, 2H, $^3J = 8.42\text{Hz}$, 6+7); 6.54 (br s, H, NH); 3.75 (q, 2H, $^3J = 6.41\text{Hz}$, 3); 2.61-2.46 (m, 5H, 13+2)

RMN ^{13}C (CD $_2$ Cl $_2$, 75MHz) : δ ppm = 174.8 (4); 168.5 (12); 166.6 (11); 138.1 (5); 128.6 (8+9); 128.0 (6+7); 127.4 (10); 127.0 (q, $^1J_{C-F} = 276.8\text{Hz}$, 1); 34.0 (3); 33.9 (q, $^2J_{C-F} = 27.6\text{Hz}$, 2); 11.9 (13)

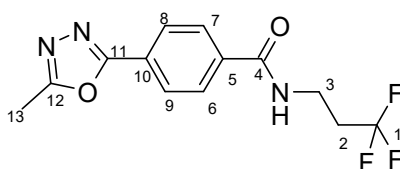
▪ **Composé 79 : 4-(hydrazinecarbonyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



211 μ L (4eq.) d'hydrazine monohydrate sont ajoutés à une solution de 300mg (1eq.) de 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzoate de méthyle (**76**) dans 2mL de MeOH. Le milieu réactionnel est agité pendant 2h au reflux. La solution est refroidie à TA et le précipité blanc formé est filtré puis lavé au méthanol pour donner 213mg (71%) de cristaux blancs. Le filtrat est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle. La solution est lavée à l'eau (2x) puis à la saumure (1x). La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 66mg (22%) de solide blanc. Cela conduit à un rendement global de 93%.

LCMS : $t_R = 1.65\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 276$

▪ **Composé 80 : 4-(5-méthyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



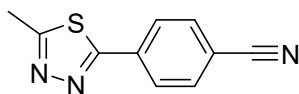
100mg (1eq.) d'acide 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzoïque (**77**) sont ajoutés à une solution de 31.2mg (1.1eq.) d'acétylhydrazine, 570 μ L (2.5eq.) de solution de T3P à 50% dans l'acétate d'éthyle et 199 μ L (3eq.) de DIEA dans 196 μ L d'acétate d'éthyle. La solution est agitée pendant 24h au reflux. L'analyse LCMS du milieu réactionnel montre la formation de 50% du produit souhaité et de 50% de l'intermédiaire non cyclisé. 66 μ L (1eq.) de DIEA et 228 μ L de solution de T3P à 50% dans l'acétate d'éthyle sont alors ajoutés et la solution est agitée pendant 48h au reflux. La solution est laissée revenir à TA puis 1mL d'eau est ajouté et le mélange est agité pendant 15min à TA. La phase organique est alors lavée à l'eau (2x) et à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite pour donner 102mg (90%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 4.68\text{min}$ (méthode d) ; $m/z : [M-H]^- = 298$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 8.07 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.44\text{Hz}$, 8+9); 7.88 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.44\text{Hz}$, 6+7); 6.73 (br s, 1H, NH); 3.72 (q, 2H, $^3\text{J} = 6.46\text{Hz}$, 3); 2.60 (s, 3H, 13); 2.50 (qt, 2H, $^3\text{J}_{2-1} = 10.85\text{Hz}$, $^3\text{J}_{2-3} = 6.64\text{Hz}$, 2)

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75MHz) : δ ppm = 166.8 (4); 164.7 (12); 164.5 (11); 137.2 (5); 128.1 (6+7); 127.2 (10); 127.2 (8+9); 127.0 (q, $^1\text{J}_{\text{C-F}} = 275.9\text{Hz}$, 1); 34.1 (q, $^3\text{J}_{\text{C-F}} = 2.8\text{Hz}$, 3); 33.9 (q, $^2\text{J}_{\text{C-F}} = 27.7\text{Hz}$, 2); 11.3 (13)

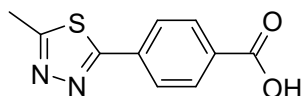
▪ **Composé 81 : 4-(5-méthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)benzonitrile**



482mg (1.5eq.) de réactif de Lawesson sont ajoutés à TA à une solution de 100mg (1eq.) d'acide 4-cyanobenzoïque, 51mg (1eq.) d'acétylhydrazine, 606 μL (1.5eq.) de solution de T3P à 50% dans l'acétate d'éthyle et 295 μL (2.5eq.) de DIEA dans 1.5mL d'acétate d'éthyle. La solution est alors chauffée pendant une nuit au reflux. Le milieu réactionnel est refroidi à TA puis 5mL d'eau sont ajoutés. La solution est agitée pendant 15min à TA. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (2x) puis à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est utilisée tel quel dans la réaction suivante.

LC-MS : $t_{\text{R}} = 2.10\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 202$

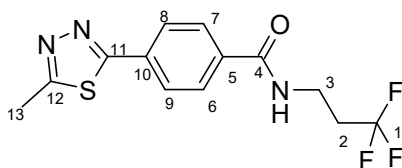
▪ **Composé 82 : acide 4-(5-méthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)benzoïque**



137mg (1eq.) de 4-(5-méthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)benzonnitrile (**81**) sont ajoutés à 5mL d'une solution aqueuse de soude à 10%. Le mélange est agité pendant 1h au reflux puis refroidi à TA et enfin lavé à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est alors acidifiée à l'aide d'une solution d'HCl 1N jusqu'à pH=2 puis extraite à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite. Le produit est utilisé tel quel dans l'étape suivante.

LC-MS : $t_R = 1.65\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M-H]^- = 219$

▪ **Composé 83 : 4-(5-méthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



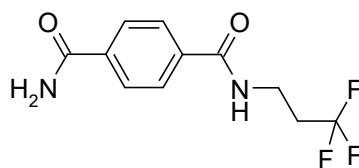
101mg (1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine sont ajoutés à une solution de 150mg (1eq.) d'acide 4-(5-méthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)benzoïque (**82**), 485 μL (1.2eq.) de solution de T3P à 50% dans l'acétate d'éthyle et 353 μL (3eq.) de DIEA dans 3mL d'acétate d'éthyle. La solution est agitée pendant une nuit à TA. 81 μL (0.2eq.) de solution de T3P sont ajoutés et le mélange est agité pendant 4h à TA. 2mL d'eau sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité pendant 15min à TA. La phase organique est lavée à l'eau (2x) puis à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice prépaquée (DCM \rightarrow DCM 99:1 MeOH \rightarrow DCM 98:2 MeOH) pour donner 22mg (10%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.17\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 316, [M-H]^- = 314$

RMN ^1H (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 8.04 (d, 2H, $^3J = 8.71\text{Hz}$, 8+9); 7.95 (d, 2H, $^3J = 8.71\text{Hz}$, 6+7); 3.65 (t, 2H, $^3J = 6.99\text{Hz}$, 3); 2.83 (s, 3H, 13); 2.55 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.88\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.10\text{Hz}$, 2)

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2 , 300MHz) : δ ppm = 169.7 (11); 169.1 (4); 168.4 (12); 137.7 (5 ou 10); 134.0 (5 ou 10); 129.3 (6+7); 128.9 (8+9); 128.0 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 276.3\text{Hz}$, 1); 34.5 (3); 34.0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 27.8\text{Hz}$, 2)

▪ **Composé 84 : N1-(3,3,3-trifluoropropyl)téréphthalamide**

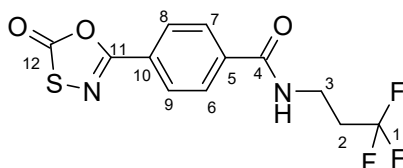


2mL de solution 7N d'ammoniaque dans le méthanol sont ajoutés à une solution de 200mg de 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzoate de méthyle (**76**) dans 2mL de méthanol. La solution est agitée pendant 36h au reflux. Les analyses LCMS et CCM du milieu réactionnel ne montrent quasiment aucune conversion de l'ester de départ. 500 μ L d'eau et 163mg (4eq.) de KOH sont alors ajoutés et le milieu réactionnel est agité pendant une nuit à reflux. La solution est acidifiée jusqu'à pH=4 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le précipité blanc formé est filtré et séché une nuit au dessiccateur (148mg).

Le produit est ensuite solubilisé dans 10mL de mélange DCE : SOCl₂ (1:1). La solution est agitée pendant 4h à 50°C. La solution est concentrée sous pression réduite puis reprise à 0°C dans 15mL de mélange CH₃CN : NH₄OH 28% (2:1). La solution est agitée à TA une nuit. Le milieu réactionnel est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées puis lavées à l'eau (2x) et à la saumure (1x), séchées sur sulfate de magnésium et évaporées sous pression réduite pour donner 115mg (61%) de solide blanc.

LC-MS : t_R = 1.77min (méthode c) ; m/z : [M-H]⁻ = 259

▪ **Composé 85 : 4-(2-oxo-1,3,4-oxathiazol-5-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

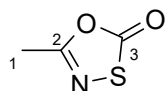


75 μ L (2eq.) de chlorure de chlorothioformyle sont ajoutés à une solution de 115mg (1eq.) de N1-(3,3,3-trifluoropropyl)téréphthalamide (**84**) dans 1,1mL de toluène. Le milieu réactionnel est agité pendant 24h à 90°C. 38 μ L (1eq.) de chlorure de chlorothioformyle sont alors ajoutés et la réaction est agitée à 90°C pendant 24h supplémentaires. Le toluène est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans du dichlorométhane puis filtré pour donner 95mg (68%) de solide blanc.

LC-MS : $t_R = 2.57\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M-H]^- = 317$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.90 (t, 1H, $^3J = 5.67\text{Hz}$, NH); 8.05-8.00 (m, 4H, 6+7+8+9); 3.52 (q, 2H, $^3J = 6.44\text{Hz}$, 3); 2.57 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 11.34\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.70\text{Hz}$, 2)

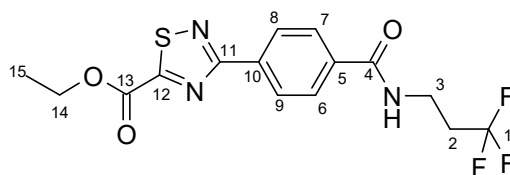
▪ **Composé 87 : 5-méthyl-1,3,4-oxathiazol-2-one**



361 μL (1eq.) de chlorure de (chlorothio)formyle sont ajoutés à une solution de 303mg (1.2eq.) d'acétamide dans 5mL de DCE. La solution est agitée une nuit à 60°C. La solution est laissée revenir à TA puis elle est filtrée. L'analyse du filtrat en RMN ^1H et ^{13}C révèle la présence du produit souhaité et de DCE. Le DCE résiduel est alors évaporé sous pression réduite pour donner 214mg (43%) de poudre blanche.

RMN ^{13}C (CDCl $_3$, 300MHz) : δ ppm = 173.0 (3); 156.7 (2); 22.0 (1)

▪ **Composé 89 : 3-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)-1,2,4-thiadiazole-5-carboxylate d'éthyle**

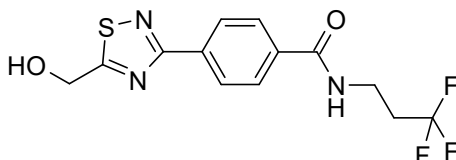


383mL (10eq.) de cyanoformiate d'éthyle sont ajoutés à une solution de 100mg (1eq.) de 4-(2-oxo-1,3,4-oxathiazol-5-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**85**) dans 400 μL de 1,2-dichlorobenzène. Le mélange est agité pendant 30min à 160°C dans un réacteur micro-ondes. La solution est refroidie à TA puis 6mL d'acétonitrile sont alors ajoutés. Le précipité formé est filtré pour donner 302mg (85%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.77\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 374$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 8.44 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.56\text{Hz}$, 8+9); 7.97 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.56\text{Hz}$, 6+7); 4.54 (q, 2H, $^3\text{J} = 7.16\text{Hz}$, 14); 3.66 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.04\text{Hz}$, 3); 2.55 (qt, 2H, $^3\text{J}_{2-1} = 10.83\text{Hz}$, $^3\text{J}_{2-3} = 7.04\text{Hz}$, 2); 1.47 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.13\text{Hz}$, 15)

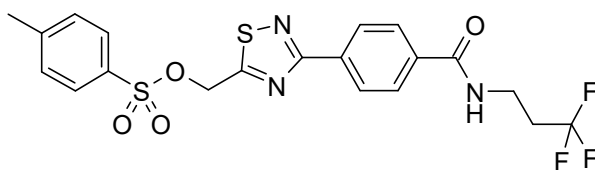
- **Composé 90 : 4-(5-(hydroxyméthyl)-1,2,4-thiadiazol-3-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



550 μL d'une solution 2M de LiBH_4 dans le THF sont ajoutés à 0°C et sous argon à une solution de 140 mg de 3-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)-1,2,4-thiadiazole-5-carboxylate d'éthyle (**89**) dans 3.5mL de THF anhydre. La solution est agitée pendant 30min à 0°C. 0.5mL d'une solution aqueuse saturée de NH_4Cl sont alors ajoutés pour neutraliser l'excès d'hydrure. Le milieu est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est alors purifié sur colonne de silice prépaquée (Toluène 97:3 MeOH \rightarrow Toluène 95:5 MeOH) pour donner 108mg (44%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_{\text{R}} = 2.18\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 332$, $[\text{M}-\text{H}]^- = 330$

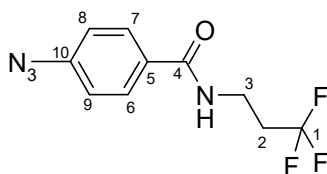
- **Composé 91 : (3-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)-1,2,4-thiadiazol-5-yl)méthyl 4-méthylbenzènesulfonate**



115 μL (5eq.) de DIEA sont ajoutés à une solution de 44mg (1eq.) de 4-(5-(hydroxyméthyl)-1,2,4-thiadiazol-3-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**90**) et 105 μL de chlorure d'acide benzènesulfonique. La réaction est agitée à TA pendant 5 jours. L'analyse LCMS du milieu montre une conversion totale de l'alcool de départ. Le produit souhaité est formé majoritairement, mais n'a pu être isolé.

LC-MS : $t_{\text{R}} = 2.97\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[\text{M}-\text{H}]^- = 484$

▪ **Composé 92 : 4-azido-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

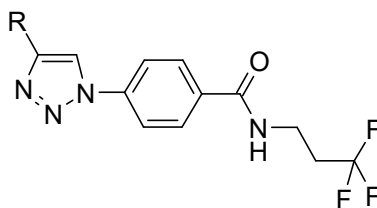


1.05g (1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine sont ajoutés à une solution de 1.14g (1eq.) d'acide 4-azidobenzoïque, 536mg (0.5eq) d'HOBt 3.19g (1.2eq) d'HBTU et 4.85mL (4eq.) de DIEA dans 5mL de DMF. La solution est agitée une nuit à TA puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissous dans l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (2x), une solution aqueuse d'HCl 1N (1x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 1.77g (98%) d'un solide marron clair.

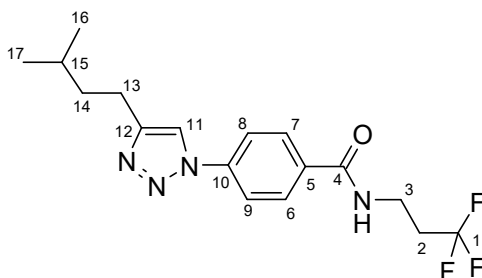
LC-MS : $t_R = 2.65\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[\text{M}-\text{H}]^- = 257$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 7.86 (d, 2H, $^3J = 8.91\text{Hz}$, 6+7 ou 8+9); 7.15 (d, 2H, $^3J = 8.92\text{Hz}$, 6+7 ou 8+9); 3.61 (t, 2H, $^3J = 6.97\text{Hz}$, 3); 2.51 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.99\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.05\text{Hz}$, 2)

▪ **Procédure (ii) : procédure générale de formation des cycles triazoles par "click chemistry"**



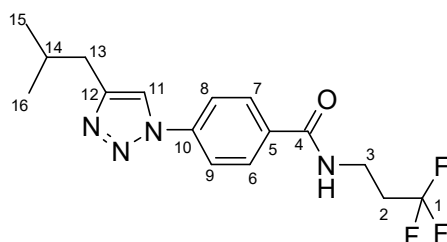
1eq. d'alcyne est ajouté à une solution de 115mg (1eq.) de 4-azido-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**92**), 8mg (0.1eq.) de CuSO_4 , 99.1mg (1eq.) d'ascorbate de sodium dans 6mL d'un mélange t-BuOH/ H_2O (1/1). La solution est agitée une nuit à TA.

▪ **Composé 93 : 4-(4-isopentyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

Procédure (ii) avec 65.7 μ L de 5-méthylhexyne. Le milieu est filtré après réaction. Le produit encore présent dans la phase aqueuse est extrait à l'acétate d'éthyle. Le produit est ensuite séché au dessiccateur pour donner 93mg (53%) de solide beige.

LC-MS : $t_R = 2.93\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 355$

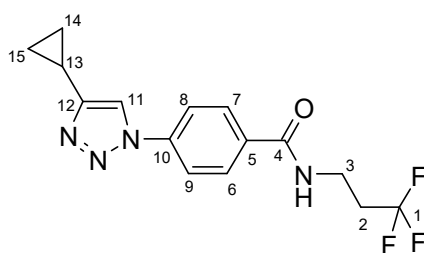
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.84 (br s, 1H, NH); 8.69 (s, 1H, 11); 8.03 (br m, 4H, 6+7+8+9); 3.53 (q, 2H, $^3J = 6.34\text{Hz}$, 3); 2.73 (t, 2H, $^3J = 7.42\text{Hz}$, 13); 2.58 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 11.40\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.11\text{Hz}$, 2); 1.67-1.54 (m, 3H, 14+15); 0.94 (d, 6H, $^3J = 6.13\text{Hz}$, 16+17)

Composé 94 : 4-(4-isobutyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide

Procédure (ii) avec 58.9 μ L de 4-méthylpentène. Après une nuit, la conversion n'est pas totale. 1eq. d'alcyne, 0.5eq. d'ascorbate de sodium et 0.05eq. de CuSO₄ sont ajoutés au milieu réactionnel. La solution est agitée pendant 4h à TA. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 128mg (75%) d'une poudre marron clair.

LC-MS : $t_R = 2.77$ min (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 341$

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz) : δ ppm = 8.42 (s, 1H, 11); 8.05-7.97 (m, 4H, 6+7+8+9); 3.65 (t, 2H, ³J = 6.98Hz, 3); 2.67 (d, 2H, ³J = 6.85Hz, 13); 2.55 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.93Hz, ³J₂₋₃ = 6.93Hz, 2); 2.03 (n, 1H, ³J = 6.75Hz, 14); 0.99 (d, 6H, ³J = 6.63Hz, 15+16)

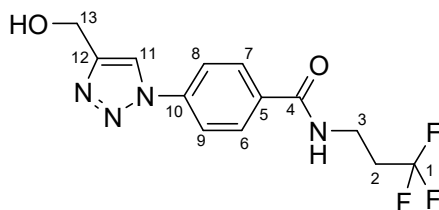
Composé 95 : 4-(4-cyclopropyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide

Procédure (ii) avec 42.4 μ L d'éthynylcyclopropane. Une partie du produit est récupérée par filtration du précipité formé. Le produit restant dans le filtrat est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 73mg (45%) d'une poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.52$ min (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 325$

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz) : δ ppm = 8.84 (br s, 1H, NH); 8.64 (s, 1H, 11); 8.05-7.97 (m, 4H, 6+7+8+9); 3.53 (q, 2H, ³J = 6.44Hz, 3); 2.58 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 11.51Hz, ³J₂₋₃ = 6.95Hz, 2); 2.09-2.00 (m, 1H, 13); 1.02-0.96+0.84-0.79 (m, 4H, 14+15)

- **Composé 96 : 4-(4-(hydroxyméthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



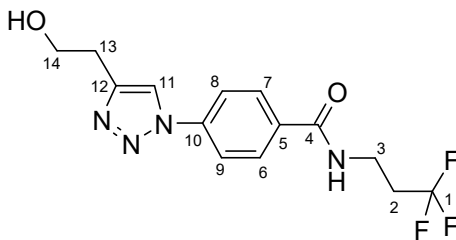
Procédure (ii) avec 29.2μL d'alcool propargylique. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 52mg (33%) d'une poudre beige.

LC-MS : t_R = 2.03min (méthode c) ; m/z : [M+H]⁺ = 315

RMN ¹H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 8.57 (s, 1H, 11); 8.07-7.99 (m, 4H, 6+7+8+9); 4.79 (s, 2H, 13); 3.67 (t, 2H, ³J = 6.97Hz, 3); 2.57 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.91Hz, ³J₂₋₃ = 6.98Hz, 2)

RMN ¹³C (CD₃OD, 75MHz) : δ ppm = 168.9 (4); 150.3 (12); 140.6 (5 ou 10); 135.5 (5 ou 10); 130.1 (6+7); 128.0 (q, ¹J_{C-F} = 276.1Hz, 1); 122.3 (11); 121.2 (8+9); 56.4 (13); 34.6 (3); 34.0 (q, ²J_{C-F} = 27.7 Hz, 2)

- **Composé 97 : 4-(4-(2-hydroxyéthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



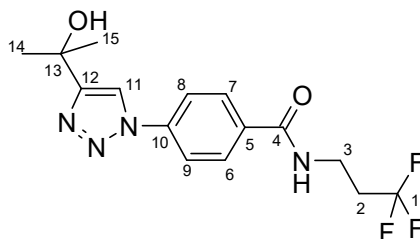
Procédure (ii) avec 37.9 μ L de 3-butyn-1-ol. Aucun précipité n'est observé. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 135mg (82%) de solide beige.

LC-MS : $t_R = 2.07$ min (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 329$

RMN 1H (CD $_3$ OD, 300MHz) : δ ppm = 8.44 (s, 1H, 11); 8.04-7.96 (m, 4H, 6+7+8+9); 3.89 (t, 2H, $^3J = 6.62$ Hz, 14); 3.65 (t, 2H, $^3J = 6.98$ Hz, 3); 3.00 (t, 2H, $^3J = 6.51$ Hz, 13); 2.44 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.85$ Hz, $^3J_{2-3} = 7.09$ Hz, 2)

RMN ^{13}C (CD $_3$ OD, 75MHz) : δ ppm = 168.9 (4); 147.3 (12); 140.7 (5 ou 10); 135.4 (5 ou 10); 130.1 (6+7); 128.0 (q, $^1J_{C-F} = 275.8$ Hz, 1); 122.2 (11); 121.1 (8+9); 61.9 (14); 34.6 (3); 34.0 (q, $^2J_{C-F} = 28.1$ Hz, 2); 29.9 (13)

- **Composé 98 : 4-(4-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

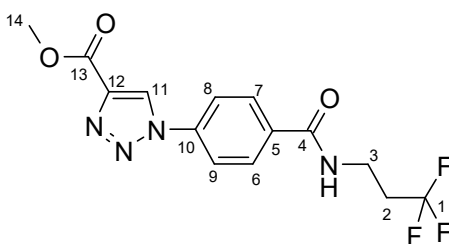


Procédure (ii) avec 48.9 μ L de 2-méthyl-3-butyn-2-ol. Une partie du produit est récupérée par filtration du précipité formé. Le produit restant dans le filtrat est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite. Le produit est séché au dessiccateur pour donner 80mg (53%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 2.18\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M-H]^- = 341$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 8.84 (t, 1H, $^3J = 5.18\text{Hz}$, NH); 8.71 (s, 1H, 11); 8.08-8.01 (m, 4H, 6+7+8+9); 5.29 (s, 1H, OH); 3.53 (q, 2H, $^3J = 6.40\text{Hz}$, 3); 2.58 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 11.53\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 6.72\text{Hz}$, 2)

▪ **Composé 99 : 1-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate de méthyle**



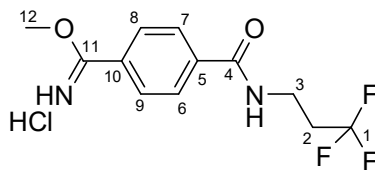
Procédure (ii) avec 41.4 μL de propionate de méthyle. Après une nuit, la conversion n'est pas totale. 0.5eq. d'alcyne, 0.5eq. d'ascorbate de sodium et 0.05eq. de CuSO_4 sont ajoutés au milieu réactionnel. La solution est agitée pendant 4h à TA. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 156mg (91%) d'une poudre beige.

LC-MS : $t_R = 2.37\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 343$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) : δ ppm = 9.62 (s, 1H, 11); 8.89 (t, 1H, $^3J = 5.56\text{Hz}$, NH); 8.14 (d, 2H, $^3J = 8.88\text{Hz}$, 8+9); 8.06 (d, 2H, $^3J = 8.88\text{Hz}$, 6+7); 3.91 (s, 3H, 14); 3.54 (q, $^3J = 6.46\text{Hz}$, 3); 2.59 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 11.44\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.06\text{Hz}$, 2)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz) : δ ppm = 165.1 (13); 160.5 (4); 139.7 (12); 138.0 (5 ou 10); 134.5 (5 ou 10); 128.9 (6+7); 127.5 (11); 126.9 (q, $^1J_{C-F} = 277.1\text{Hz}$, 1); 120.2 (8+9); 52.1 (14); 32.9 (3); 32.4 (q, $^2J_{C-F} = 26.6\text{Hz}$, 2)

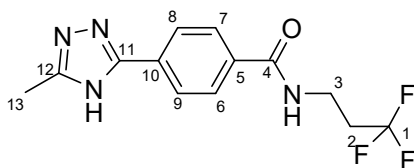
- **Composé 100 : chlorhydrate de 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzimidate de méthyle**



15mL d'une solution d'acide chlorhydrique 4N dans le dioxane sont ajoutés sous argon à 0°C à une solution de 300mg de 4-cyano-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**73**) dans 1mL de MeOH. Le mélange est agité pendant une nuit à TA. 20mL d'éther diéthylique sont ajoutés et la solution est refroidie au réfrigérateur pendant une heure. Le précipité est alors filtré, lavé à l'éther diéthylique et séché au dessiccateur pour donner 359mg (93%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 1.85\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+ = 275$, $[M-H]^- = 273$

- **Composé 101: 4-(5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

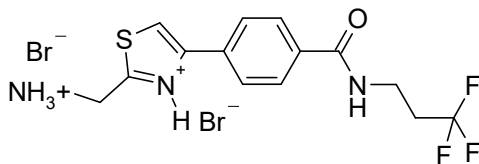


169 μ L (1.5eq.) de DIEA sont ajoutés à une solution de 200mg de chlorhydrate de 4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)benzimidate de méthyle (**100**) dans 5mL d'éthanol absolu. Le milieu réactionnel est agité pendant 15min à TA. L'acétylhydrazine (48mg) est alors ajoutée et la solution est agitée pendant 60h au reflux. L'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le solide rose obtenu est purifié par HPLC préparative puis lyophilisé pour donner 123mg (64%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_R = 1.92\text{min}$ (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+ = 299$, $[M-H]^- = 297$

RMN ^1H (CD $_3$ OD, 300MHz) : 8.08 (d, 2H, $^3J = 8.59\text{Hz}$, 8+9); 7.90 (d, 2H, $^3J = 8.68\text{Hz}$, 6+7); 3.64 (t, 2H, $^3J = 7.02\text{Hz}$, 3); 2.62-2.46 (m, 5H, 13+2)

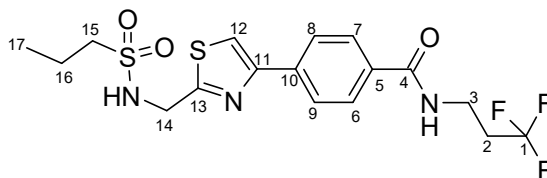
▪ **Composé 102 : di-bromhydrate de (4-(4-(3,3,3-trifluoropropylcarbamoyl)phényl)thiazol-2-yl)méthanaminium**



73mg (1.1eq.) de benzyl 2-amino-2-thioxoéthylcarbamate sont ajoutés à une solution de 100mg (1eq.) de 4-(2-bromoacétyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**46**) dans 5mL de THF anhydre. La solution est agitée pendant 3h à 70°C. Le THF est alors évaporé sous pression réduite et le solide obtenu est utilisé tel quel. 1mL d'une solution d'HBr à 25% dans l'acide acétique est ajouté et le milieu réactionnel est agité pendant 1h à TA. 8mL d'éther diéthylique sont ensuite ajoutés à TA pour former un précipité qui est refroidi dans un bain d'eau glacée. Le précipité est alors filtré, lavé à l'éther diéthylique froid puis séché au dessiccateur pour donner 157mg de solide marron pâle. Le produit est séparé en deux pour la synthèse des composés **103** et **104**.

LC-MS : $t_R = 1.85\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 330$

▪ **Composé 103 : 4-(2-(propylsulfonamidométhyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

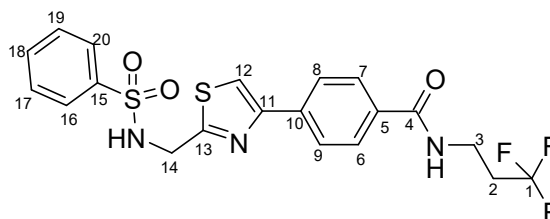


20 μ L (1.2eq.) de chlorure d'acide propansulfonique sont ajoutés à une solution de 75mg (1eq.) de composé **102** et 82 μ L de N-méthylmorpholine dans 1.5mL de DCM anhydre. Le milieu réactionnel est agité pendant 2h à TA. Le DCM est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 54mg (76%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 2.60\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M-H]^- = 434$

RMN ¹H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm : 8.05 (d, 2H, ³J = 8.43Hz, 8+9); 7.96 (s, 1H, 12); 7.89 (d, 2H, ³J = 8.49Hz, 6+7); 4.63 (s, 2H, 14); 3.66 (t, 2H, ³J = 6.99Hz, 3); 3.15-3.09 (m, 2H, 15); 2.56 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.89Hz, ³J₂₋₃ = 7.11Hz, 2); 1.84 (sx, 2H, ³J = 7.60Hz, 16); 1.04 (t, 3H, ³J = 7.46Hz, 17).

- **Composé 104 : 4-(2-(phénylesulfonamidométhyl)thiazol-4-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**

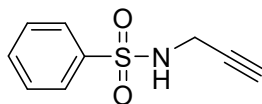


23μL (1.2eq.) de chlorure d'acide benzènesulfonique sont ajoutés à une solution de 75mg (1eq.) de composé **102** et 82μL de N-méthylmorpholine dans 1.5mL de DCM anhydre. Le milieu réactionnel est agité pendant 2h à TA. Le DCM est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite pour donner 51mg (67%) de poudre beige.

LC-MS : t_R = 2.73min (méthode c) ; m/z : [M-H]⁻ = 468

RMN ¹H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 7.96 (d, ³J = 8.50Hz, 8+9); 7.87 (m, 5H, 6+7+12+16+20); 5.57 (m, 3H, 17+18+19); 4.47 (s, 2H, 14); 3.65 (t, 2H, ³J = 7.00Hz, 3); 2.55 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 11.0Hz, ³J₂₋₃ = 7.10Hz, 2)

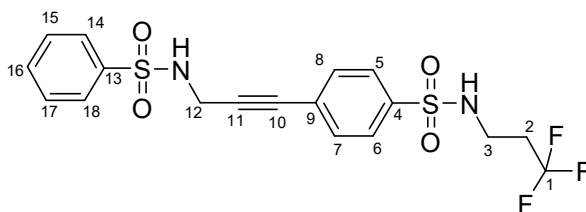
- **Composé 105 : N-(prop-2-ynyl)benzènesulfonamide**



200μL (1eq.) de chlorure d'acide benzènesulfonique, 129μL (1.2eq.) de propargylamine, 8mL de DCM et 1.08mL (4eq.) de DIEA sont agités à TA pendant 2h. Le DCM est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2x) et à la saumure (1x). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par HPLC préparative pour donner 238mg (78%) d'une huile transparente.

LC-MS : $t_R = 2.42\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M-H]^- = 194$

▪ **Composé 106 : 4-(3-(phénylesulfonamido)prop-1-ynyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**



50mg (1eq.) de N-(prop-2-ynyl)benzènesulfonamide (**105**), 87mg (0.9eq.) de 4-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide (**42**), 8.3mg (0.05eq.) de Bis(triphénylphosphine)palladium(II) chloride, 40.2mg (0.9eq.) d'iodure de cuivre, et 120 μ L (0.5mL/mmol) triéthylamine sont placés successivement dans un schlenk sous un flux d'argon. Le DMF anhydre est ajouté *via* une canule sous argon à température ambiante. Le mélange réactionnel est agité à 70°C sous argon pendant 48h.

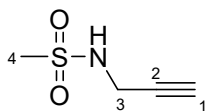
Le milieu réactionnel est alors dilué à TA par ajout d'un mélange AcOEt:NH₄Cl_{sat} (1:1). Le précipité formé est filtré et lavé à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (2x) puis à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée sur célite puis évaporée sous pression réduite. Le solide orange obtenu est solubilisé dans le minimum d'acétonitrile puis le produit est précipité par ajout d'éther diisopropylique et filtré pour donner 38mg (33%) de poudre beige.

LC-MS : $t_R = 3.13\text{min}$ (méthode c) ; $m/z : [M+H]^+ = 447$

RMN ¹H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 7.92 (m, 2H, 14+18 ou 15+17); 7.74 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 5+6); 7.50-7.57 (m, 3H, 16+(14+18 ou 15+17)); 7.30 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 7+8); 4.07 (s, 2H, 12); 3.08 (t, 2H, ³J = 7.10Hz, 3); 2.36 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.60Hz, ³J₂₋₃ = 6.80Hz, 2)

RMN ¹³C (CD₃OD, 75MHz) : δ ppm = 142.3 (4); 141.2 (13); 133.7 (16); 133.2 (7+8); 130.1 (14+18 ou 15+17); 128.4 (14+18 ou 15+17); 128.3 (9); 127.9 (5+6); 127.5 (q, ¹J_{C-F} = 276.7Hz, 1); 88.7 (11); 83.3 (10); 37.4 (3); 35.2 (q, ²J_{C-F} = 28.2Hz, 2); 33.8 (12)

▪ **Composé 107 : N-(prop-2-ynyl)méthanesulfonamide**

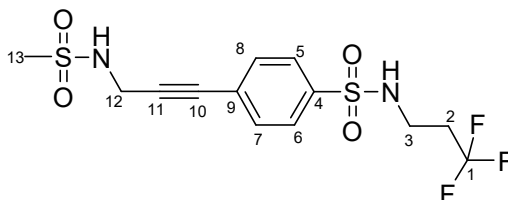


Une solution de 288 μ L (1eq.) de chlorure d'acide méthanesulfonique dans 3mL d'éther diéthylique est ajoutée à une solution de 500 μ L (2eq.) de propargylamine dans 6mL d'éther diéthylique refroidie à 0°C. Le mélange est agité pendant 30min. Le précipité formé est filtré et lavé deux fois à l'éther. Le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner 178mg (37%) d'un solide blanc.

LC-MS : t_R = 1.92 min (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+$ = 134

RMN 1H (CDCl₃, 300MHz) : δ ppm = 4.69 (m, 1H, NH) ; 4.00 (dd, 2H, $^3J_{3-NH}$ = 6.20Hz, $^4J_{3-1}$ = 2.50Hz, 2) ; 3.10 (s, 3H, 4) ; 2.41 (t, 1H, 3J = 2.50Hz, 1)

▪ **Composé 108 : 4-(3-(méthylsulfonamido)prop-1-ynyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide**

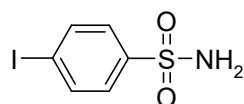


136mg (1.2eq.) d'acétate de tétrabutylammonium, 1mg (0.002eq.) de Pd EnCat³⁰, 142mg (1eq.) de 4-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzènesulfonamide (**42**) et 50mg (1eq.) de N-(prop-2-ynyl)méthanesulfonamide (**107**) sont ajoutés à 500 μ L de DMF. La solution est agitée pendant 24h à 80°C. Un mélange AcOEt:NH₄Cl_{sat.} 1:1 (2mL) est ajouté au milieu réactionnel. Le mélange est agité 10min puis filtré pour récupérer les billes de palladium. Le produit est récupéré dans la phase organique par extraction Eau:AcOEt. La phase organique est alors lavée à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium, filtré sur célite et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 95:5 Isopropanol \rightarrow Cyclohexane 90:10 Isopropanol) pour donner 39mg (27%) d'un solide beige.

LC-MS : t_R = 2.78min (méthode c) ; m/z : $[M+H]^+$ = 385

RMN ^1H (CD $_3$ OD, 300MHz): δ ppm = 7.84 (d, 2H, $^3J = 8.59\text{Hz}$, 5+6 ou 7+8); 7.64 (d, 2H, $^3J = 8.59\text{Hz}$, 5+6 ou 7+8); 4.17 (s, 2H, 12); 3.12-3.08 (m, 5H, 13+3); 2.38 (qt, 2H, $^3J_{2-1} = 10.78\text{Hz}$, $^3J_{2-3} = 7.28\text{Hz}$, 2)

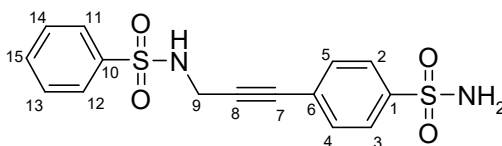
▪ **Composé 109 : 4-iodobenzènesulfonamide**



150mg (1eq.) de chlorure d'acide 4-iodobenzènesulfonique sont ajoutés à 1.5mL d'un mélange CH $_3$ CN 1:2 NH $_4$ OH (28%) refroidi à 0°C. La solution est agitée 1h à TA puis extraite à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée pour donner 134mg (96%) d'un solide blanc.

LC-MS: $t_R = 2.69$ min (méthode c); m/z : $[\text{M}-\text{H}]^- = 282$

▪ **Composé 110 : 4-(3-(phénylesulfonamido)prop-1-ynyl)benzènesulfonamide**



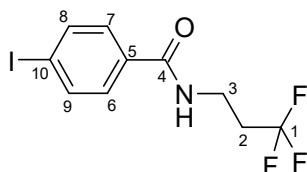
50mg (1eq.) de N-(prop-2-ynyl)benzènesulfonamide (**105**), 80mg (0.95eq.) de 4-iodobenzènesulfonamide (**109**), 9mg (0.05eq.) de Bis(triphénylphosphine)palladium(II) chloride, 48mg (1eq.) d'iodure de cuivre, et 128 μ L (0.5mL/mmol) triéthylamine sont placés successivement dans un schlenk sous un flux d'argon. 1mL de DMF anhydre est ajouté *via* une canule sous argon à température ambiante. Le mélange réactionnel est agité à 70°C sous argon pendant 48h.

Le milieu réactionnel est dilué à TA par ajout d'un mélange 1:1 AcOEt:NH $_4$ Cl $_{\text{sat}}$. Le précipité alors formé est filtré et lavé à l'acétate de l'éthyle. On effectue une extraction AcOEt:NH $_4$ Cl $_{\text{sat}}$. La phase organique est lavée à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée sur célite puis évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par HPLC préparative pour donner 28mg (33%) d'un solide blanc.

LC-MS: $t_R = 5.19$ min (méthode d); m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 351$

RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) : δ ppm = 7.92-7.95 (m, 2H, 11+12); 7.79 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.60\text{Hz}$, 2+3 ou 4+5); 7.53-7.56 (m, 3H, 13+14+15); 7.26 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.60\text{Hz}$, 2+3 ou 4+5); 4.07 (s, 2H, 9)

▪ **Composé 111 : 4-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



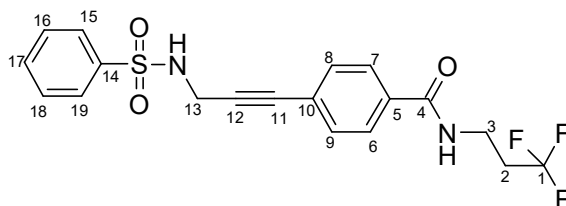
300mg (1eq.) d'acide 4-acétylbenzoïque, 181mg (1eq.) de chlorhydrate de 3,3,3-trifluoropropylamine, 33mg (0.2eq.) d'HOBt, 551mg (1.1eq.) d'HBTU et 10mL de DMF sont successivement ajoutés dans un ballon de 25mL. 840 μL (4eq.) de DIEA sont ensuite ajoutés et le mélange est agité 2h à TA. Le DMF est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé à la saumure (2x). La phase organique est alors évaporée sous pression réduite puis le produit est purifié sur colonne de silice prépaquée (Cyclohexane 8:2 AcOEt) pour donner 327mg (77%) de poudre blanche.

LC-MS : $t_{\text{r}} = 3.25$ min (méthode c) ; m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 344$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : δ ppm = 7.80 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.50\text{Hz}$, 8+9) ; 7.47 (d, $^3\text{J} = 8.50\text{Hz}$, 6+7) ; 6.34 (m, 1H, NH) ; 3.72 (q, 2H, $^3\text{J} = 6.30\text{Hz}$, 3) ; 2.47 (tq, 2H, $^3\text{J}_{2-1} = 10.70\text{Hz}$, $^3\text{J}_{2-3} = 6.40\text{Hz}$, 2)

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 282.4MHz) : δ ppm = -64.92 (t, $^3\text{J} = 10.8\text{Hz}$)

▪ **Composé 112 : 4-(3-(phénylesulfonamido)prop-1-ynyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



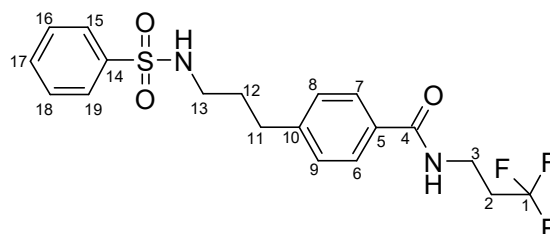
50mg (1eq.) de N-(prop-2-ynyl)benzènesulfonamide (**105**), 83.5mg (0.95eq.) de 4-iodo-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**111**), 9mg (0.05eq.) de Bis(triphénylphosphine)palladium(II) chloride, 48mg (1eq.) d'iodure de cuivre, et 128 μ L (0.5mL/mmol) de triéthylamine sont placés successivement dans un schlenk sous un flux d'argon. 1mL de DMF anhydre est ajouté *via* une canule sous argon à TA. Le mélange réactionnel est agité à 70°C sous argon pendant 48h.

Le milieu réactionnel est dilué à TA par ajout d'un mélange 1:1 AcOEt:NH₄Cl_{sat.}. Le précipité alors formé est filtré et lavé à l'acétate d'éthyle. On effectue une extraction avec un mélange AcOEt:NH₄Cl_{sat.}. La phase organique est lavée à la saumure (1x), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée sur célite puis évaporée sous pression réduite. L'huile marron obtenue est purifiée par colonne de silice prépaquée (DCM 95:5 AcOEt) pour donner 30mg (29%) d'un solide marron clair.

LC-MS : t_R = 5.43min (méthode d) ; m/z : [M+H]⁺ = 411

RMN ¹H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 7.94 (dd, 2H, ³J = 7.40Hz, ⁴J = 1.60Hz, 15+19); 7.71 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 6+7 ou 8+9); 7.55 (m, 3H, 16+17+18); 7.21 (d, 2H, ³J = 8.40Hz, 6+7 ou 8+9); 4.07 (s, 2H, 13); 3.62 (t, 2H, ³J = 7.00Hz, 3); 2.52 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.90Hz, ³J₂₋₃ = 7.00Hz, 2)

▪ **Composé 113 : 4-(3-(phénylesulfonamido)propyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide**



85mg de 4-(3-(phénylesulfonamido)prop-1-ynyl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)benzamide (**112**) sont solubilisés dans 5mL de méthanol. La solution est injectée dans le H-cube avec un débit de 1mL/min,

à pression et température ambiantes en mode Full H₂, sur une cartouche de palladium à 10% sur charbon. L'analyse LCMS montre une conversion complète et la formation du produit désiré. Le méthanol est évaporé sous pression réduite pour donner 83mg (97%) de poudre blanche.

LCMS : t_R = 2.62min (méthode c) ; m/z : [M+H]⁺ = 415

RMN ¹H (CD₃OD, 300MHz) : δ ppm = 7.83 (m, 2H, 15+19); 7.71 (d, 2H, ³J = 8.20Hz, 6+7); 7.64-7.52 (m, 3H, 16+17+18); 7.22 (d, 2H, ³J = 8.21Hz, 8+9); 3.62 (t, 2H, ³J = 7.02Hz, 3); 2.87 (t, 2H, ³J = 6.88Hz, 13); 2.68 (t, 2H, ³J = 7.65Hz, 11); 2.52 (qt, 2H, ³J₂₋₁ = 10.96Hz, ³J₂₋₃ = 7.08Hz, 2); 1.76 (qn, ³J = 6.93Hz, 12).

RMN ¹³C (CD₃OD, 75MHz) : δ ppm = 170.3 (4); 147.3 (10); 142.1 (14); 133.7 (17); 133.1 (5); 130.4 (16+18); 129.8 (8+9); 128.6 (6+7); 128.1 (q, ¹J_{C-F} = 276.4Hz, 1); 128.1 (15+19); 43.5 (13); 34.6 (3); 34.2 (q, ²J_{C-F} = 27.9Hz, 2); 33.7 (11); 32.3 (12).

III Evaluation Biologique des composés

III.1 Le test de TSA (Thermal Shift Assay)

Le SYPRO Orange (Invitrogen) a été utilisé comme marqueur fluorescent pour suivre l'évolution de la dénaturation de la protéine. Ce composé est sensible à l'environnement et sa fluorescence augmente lorsqu'il rentre en contact avec les zones hydrophobes de la protéine lors de sa dénaturation.

Le test TSA a été réalisé sur un appareil Lightcycler 480 (Roche). Cet appareil contient un système de chauffage/refroidissement pour le contrôle de la température ainsi qu'un capteur photographique pour la mesure en temps réel des changements de fluorescence.

Les concentrations finales dans l'échantillon sont 10 μ M pour la protéine EthR, 2,5X pour le SYPRO Orange, 1% en DMSO et 20 μ M en ligand, dans le tampon EthR. Les échantillons sont chauffés de 37°C à 85°C avec une augmentation de 0.04 °C par seconde. La mesure de la fluorescence a été réalisée en utilisant des longueurs d'ondes de 465nm et 510nm pour l'excitation et l'émission respectivement. Les données ont ensuite été obtenues en utilisant le logiciel Wavemetrics Igor et représentées sous forme de courbes donnant l'évolution de la fluorescence en fonction de la température. La température de dénaturation T_m est alors déterminée au point d'inflexion de la courbe.

III.2 Le test de résonance plasmonique de surface

III.2.1 Principe du test

La résonance plasmonique de surface (RPS) permet la visualisation en temps réel de phénomènes d'association ou de dissociation entre un partenaire immobilisé sur un biosenseur et un second partenaire injecté en flux continu sur cette surface. Les biosenseurs sont des systèmes analytiques qui mettent en jeu une reconnaissance biologique et sa traduction en signal électrique.

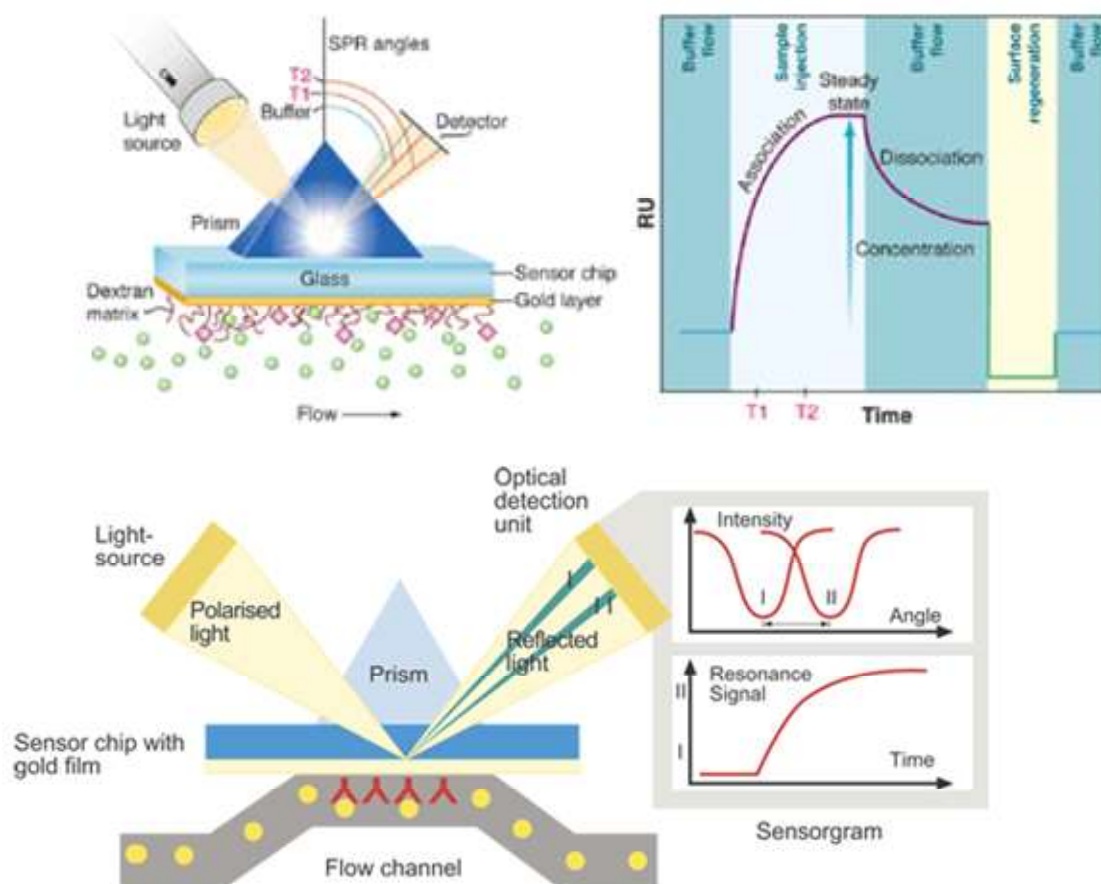


Figure 193 : Principe de la Résonance Plasmonique de Surface (RPS).

Ici, le senseur est composé d'une fine couche d'or recouvrant un matériau transparent comme du verre par exemple. Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique passe d'un matériau possédant un indice de réfraction élevé, comme le verre, à un milieu avec un faible indice de réfraction, une partie de la lumière est réfractée et l'autre partie est réfléchi. Il existe un angle d'incidence critique (θ_c) au-delà duquel la totalité de la lumière est réfléchi. Cependant, il se propage au sein du milieu d'indice de réfraction le plus faible, sur une distance de l'ordre de la longueur d'onde, une onde dite « évanescente » dont l'amplitude décroît exponentiellement avec la distance à l'interface, correspondant à une légère diminution de l'intensité du faisceau réfléchi. Si, la surface de verre est recouverte d'une couche extrêmement fine d'un métal noble comme l'or, alors le nuage électronique de celle-ci peut entrer en résonance avec l'onde évanescente, provoquant une diminution de l'intensité du faisceau réfléchi. Il existe alors un second angle θ_{spr} pour lequel l'intensité du faisceau réfléchi est minimale. Cet angle est appelé l'angle de résonance plasmonique de surface. La valeur de cet angle est fonction de l'indice de réfraction du milieu traversé par l'onde évanescente, là où les interactions entre molécules peuvent se produire. Lorsqu'une interaction survient, l'indice de réfraction du milieu et l'angle d'énergie minimale varient.

L'appareil est couplé à un détecteur ultra-sensible capable de mesurer de très faibles variations de θ_{spr} . Le signal donné à l'opérateur est exprimé en Unités de Réponse (RU), 1RU correspondant à une variation d'angle de 10^{-4} degrés.

Il existe une corrélation linéaire entre l'énergie de résonance et la masse de constituant biologique immobilisée à la surface de la couche d'or. Ainsi, les variations observées en termes d'unités de réponse lors de l'association ou dissociation de deux molécules sont directement reliées à la quantité d'analyte se fixant au partenaire immobilisé sur la surface.

Les profils d'interaction observés en temps réel, ou sensorgrammes, permettent d'avoir accès à des données cinétiques comme les constantes d'association (k_a) et de dissociation (k_d), mais également des grandeurs thermodynamiques comme la constante d'affinité K .

Lors d'une expérience de résonance plasmonique de surface, on distingue trois phases majeures (Figure 194):

- une première phase, où l'analyte a à sa disposition un grand nombre de partenaires avec lesquels il peut interagir. Lors de cette phase, les phénomènes d'association et de dissociation sont tous les deux mis en jeu. Cependant, l'analyte étant injecté en flux continu, sa concentration peut-être considérée constante, ce qui favorise le déplacement de l'équilibre vers l'association des deux partenaires.
- une deuxième phase, où l'ensemble des sites accessibles sont saturés par l'analyte. Cela se caractérise par un état d'équilibre, où les phénomènes d'association et dissociation se compensent.
- une troisième phase, où l'injection de l'analyte a cessé. Néanmoins, la solution tampon continue d'être injectée en flux continu, la concentration en solution de l'analyte peut alors être considérée comme nulle, ce qui favorise le déplacement de l'équilibre vers la dissociation des deux partenaires. Lors de cette phase, seul le phénomène de dissociation intervient.

Enfin, si la dissociation se fait de manière non complète ou trop lente, une solution de régénération peut alors être injectée afin de favoriser cette dissociation et permettre le retour à la ligne de base.

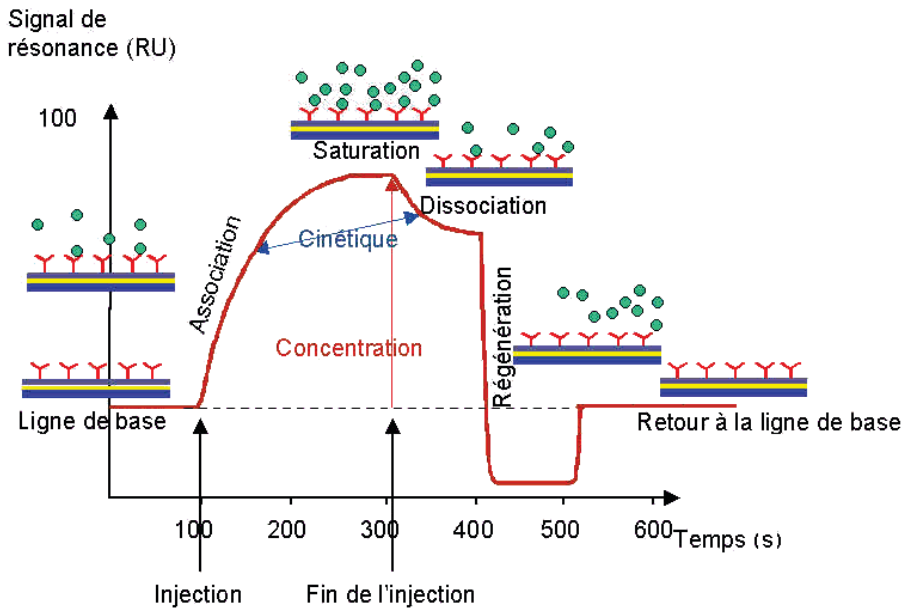


Figure 194 : Les différents processus lors d'une expérience de RPS.

Dans notre cas, la technique de RPS nous permet de visualiser l'interaction entre la protéine EthR (analyte injecté en flux continu) et le promoteur du gène *ethA* (partenaire immobilisé sur la surface).

Nous avons utilisé deux cellules pour le test : une cellule de mesure où est accroché l'ADN dit relevant, c'est-à-dire correspondant au promoteur du gène *ethA* et une cellule de contrôle où se trouve un brin d'ADN non relevant de même longueur, permettant de soustraire les interactions protéine/ADN non spécifiques. Dans un premier temps, la protéine EthR est injectée seule, jusqu'à saturation, ce qui permet de mesurer un signal SI_{EthR} correspondant à la quantité de protéine EthR venue se lier à l'ADN (Figure 69). Dans un second temps, l'expérience est répétée en présence d'un ligand potentiel à différentes concentrations. Si le composé se lie à EthR, l'empêchant ainsi de venir se fixer sur l'ADN, une diminution de la réponse du signal ($SI_{EthR+cpd}$) dose-dépendante est observée.

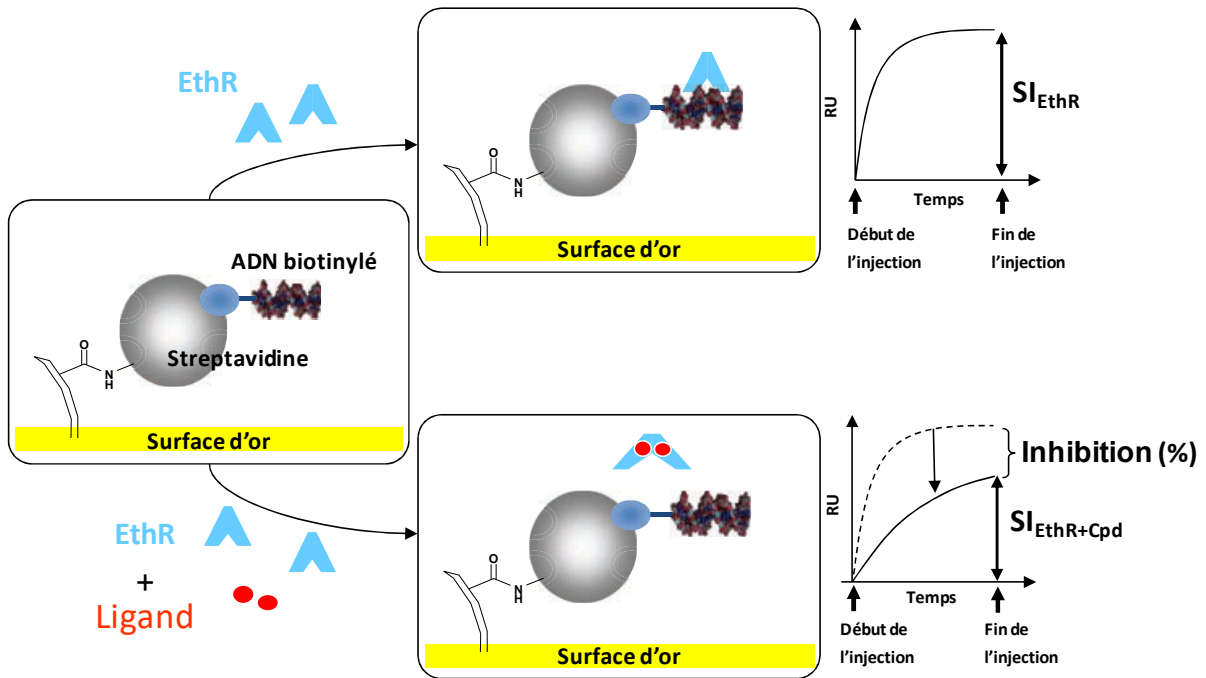


Figure 195 : Principe du test d'inhibition de l'interaction EthR/ADN par résonance plasmonique de surface.

En utilisant l'équation ci-dessous, on peut calculer pour chaque concentration un pourcentage d'inhibition du ligand étudié. A l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0, nous en déduisons une valeur d' IC_{50} (Figure 70).

$$\%Inhibition = 100 \times \frac{SI_{EthR} - SI_{EthR+cpd}}{SI_{EthR}}$$

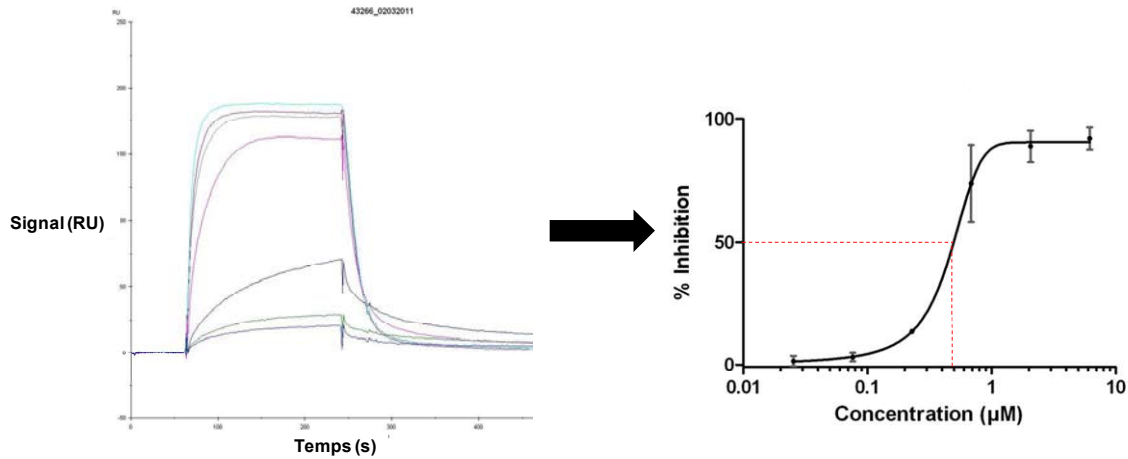


Figure 196 : Signaux obtenus pour différentes concentration de ligand (à gauche) et courbe dose réponse qui en découle (à droite).

III.2.2 Optimisation de la méthode

Afin d'être immobilisé à la surface de la puce, les brins d'ADN sont biotinylés et viennent s'ancrer sur les molécules de stréptavidine fixées à la surface. Jusqu'à présent, au sein du projet, des puces CM5, recouvertes en surface de fonctions carboxyliques, étaient fonctionnalisées afin de venir immobiliser les molécules de stréptavidine de manière covalente en formant des liaisons amides.

Nous avons envisagé l'utilisation de puces commerciales déjà fonctionnalisées avec des molécules de stréptavidine, ce qui représente un gain de temps en termes de fonctionnalisation de la puce. Une quantité identique à la puce CM5 d'ADN relevant et non relevant a été immobilisée (environ 70 RU). L'injection d'une solution d'EthR sur chaque puce à une concentration identique (environ 600nM) donne une réponse de 230RU sur la puce stréptavidine contre 60 RU pour la puce CM5 (Figure 197 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). L'utilisation de la puce stréptavidine permet donc d'augmenter le rapport signal/bruit. De plus, la réponse ayant tendance à diminuer au cours du temps, due à l'usure de la puce, la puce stréptavidine possède potentiellement une durée d'utilisation plus importante.

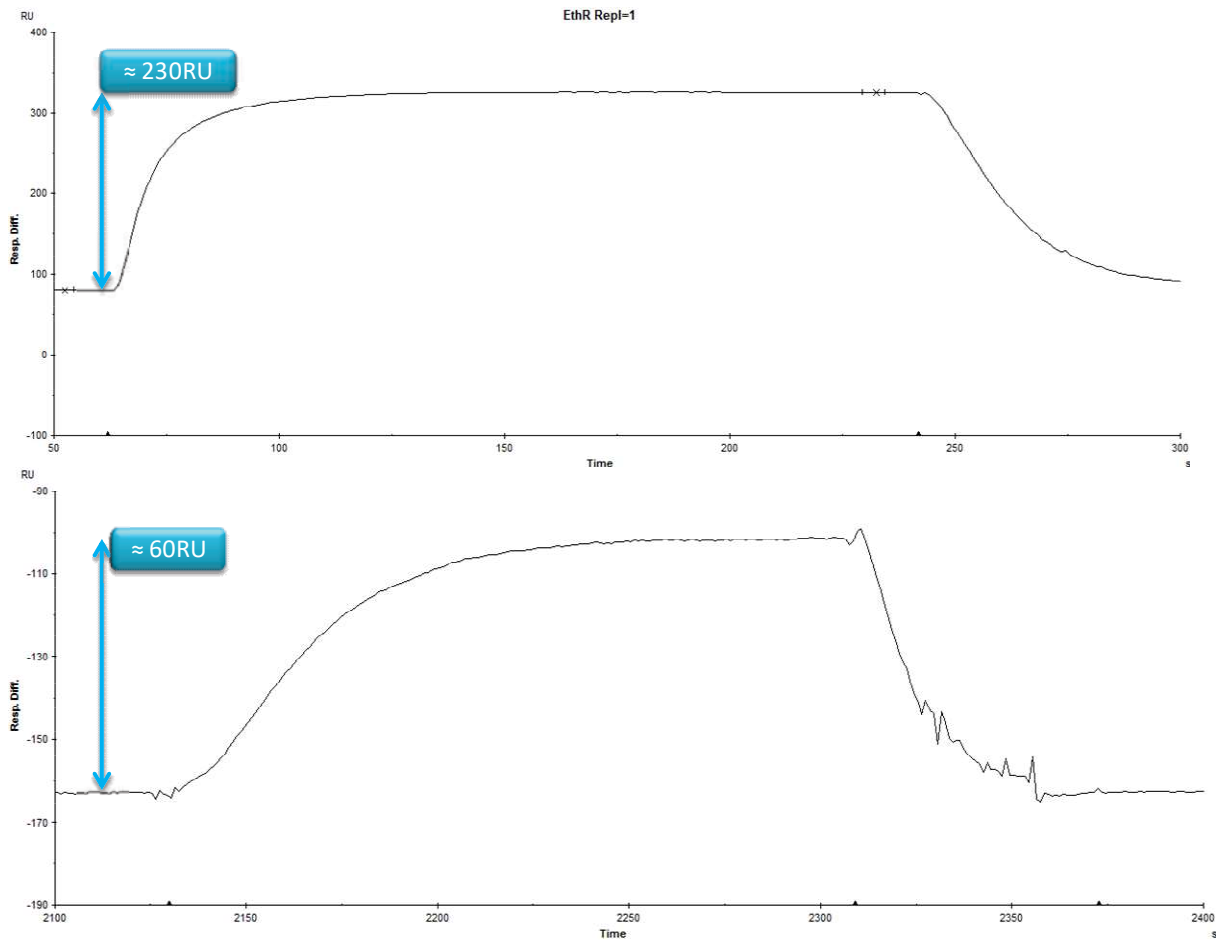


Figure 197 : Sensorgrammes obtenus lors de l'injection d'une solution 600 nM d'EthR sur une puce streptavidine (en haut) et CM5 (en bas) fonctionnalisées par 70 RU d'ADN.

Par la suite nous avons vérifié que le changement de puce ne modifiait pas les valeurs des IC_{50} mesurées afin de pouvoir comparer entre eux les produits testés sur une puce streptavidine et les composés testés précédemment sur une puce CM5. Le composé de référence qui a été utilisé est le BDM41907. Les résultats obtenus pour ce ligand sur les deux puces sont présentés (Figure 198). L'utilisation de la puce streptavidine par rapport à la puce CM5 ne modifie pas significativement la valeur de l' IC_{50} (370 nM et 300 nM respectivement), mais permet en revanche d'améliorer la qualité du plateau haut (plus proche de 100%) ainsi que le coefficient de corrélation R^2 .

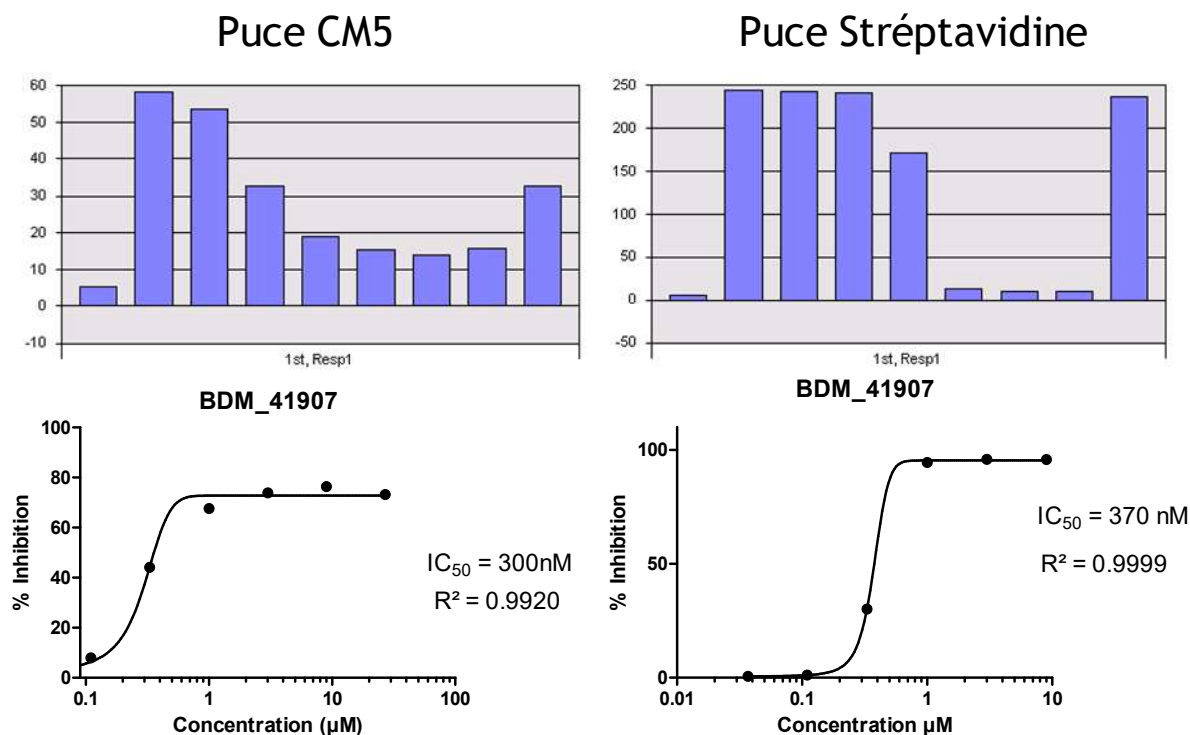


Figure 198 : Résultats obtenus pour le composé BDM_41907 sur les deux puces CM5 et stréptavidine. L'histogramme représente les valeurs de RU obtenues pour chaque concentration en ligand. La première expérience correspond au contrôle négatif en absence de protéine. La seconde et la neuvième correspondent au contrôle négatif en absence de ligand.

Ces conditions ont été utilisés afin d'évaluer tous les composés.

III.2.3 Mode opératoire

L'étude de l'interaction entre la protéine EthR et son promoteur *ethA* a été réalisée par résonance plasmonique de surface, en utilisant des puces "Research grades Streptavidin-coated Sensor Chips (Sensor Chip SA, Biacore Inc.)" sur un appareil Biacore3000 (Biacore, Uppsala, Sweden). L'ADN relevant biotinylé d'une longueur de 106 paires de bases a été obtenu par PCR, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose. L'immobilisation sur la puce SA é été réalisée par injection d'une solution d'ADN biotinylé à une concentration de 150ng/mL sur l'un des canaux jusqu'à obtenir une réponse fixe de 75RU. Sur un second canal un fragment d'ADN double brins biotinylé non relevant d'une longueur de 113 paires de bases (fragment +14 à +127 du gène *bla* d'*E. coli* amplifié par PCR). La fixation de la protéine EthR à l'ADN a été réalisée à 25°C dans un tampon 10mM Tris-HCl (pH 7.5, 200mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1 mM DTT et 1% en DMSO) avec un débit de 20µL/min pendant 3min. Le signal correspondant à l'interaction spécifique (SI) entre EthR et l'ADN relevant de 106 paires de bases a été mesuré par différence entre les deux canaux.

Pour l'obtention des courbes dose-réponse, les échantillons ont été dilués successivement dans le tampon de course en présence de la protéine EthR à une concentration de 590nM. Les échantillons sont alors incubés 5 min à 37°C puis injectés sur les deux canaux à un débit de 20µL/min pendant 3min. Les signaux spécifiques SI ont été mesurées à la fin de l'injection et utilisés pour calculer le pourcentage d'inhibition de l'interaction EthR/ADN selon la formule suivante.

$$\%Inhibition = 100 \times \frac{SI_{EthR} - SI_{EthR+cpd}}{SI_{EthR}}$$

Les valeurs d'IC₅₀ ont ensuite été déterminées à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

III.3 Test de potentialisation de l'éthionamide

10⁸ macrophages de type Raw264.7 sont infectés par une suspension de 10⁸ bacilles de type H37Rv-GFP dans 300 mL pendant 2 h à 37 °C sous agitation (100 tours par minute (tpm)). Après deux lavages par centrifugation à 1100 tpm pendant 5min, les bacilles extracellulaires restants sont tués à l'aide d'un traitement d'une heure à l'amykacine (20µM, Sigma, A2324-5G). Après une dernière étape de centrifugation, 40µL de macrophages infectés sont répartis à l'aide du Wellmate (Matrix) dans des plaques Evotec 384 puits pré-remplies de 10µL d'une solution du composé à tester diluée dans le milieu cellulaire. Le tout est ensuite incubé à 37°C pendant 5 jours sous une atmosphère à 5% de CO₂. Les macrophages sont alors teints avec du SYTO 60 (Invitrogen, S11342) pendant 1h puis les plaques sont scellées. Les images confocales ont été réalisées à l'aide d'un microscope automatique à fluorescence ultra-haut débit Opera (Evotec). Une double excitation laser (à 488nm et 635nm) ainsi que des miroirs dichroïques ont été utilisés afin de pouvoir mesurer la fluorescence émise à la fois par la bactérie (GFP) et par le macrophage (SYTO). Chaque mesure est effectuée deux fois, ce qui permet de calculer le pourcentage de macrophages infectés et le nombre total de cellules par moyenne de ces deux mesures. La concentration au point d'inflexion de la courbe représentant l'évolution du pourcentage de macrophages infectés en fonction de la concentration en composé est alors déterminée et correspond à l'EC₅₀.

III.4 La technique Bactec

Cette évaluation a été réalisée dans un premier temps sur un appareillage Bactec MGIT 960. Cette méthode est utilisée dans la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en antituberculeux d'une souche clinique de *M. tuberculosis*.

L'appareil Bactec MGIT 960 nécessite l'usage de tubes de cultures de milieu 7H9 supplémenté en OADC et contenant un indicateur fluorescent (Tris 4,7-diphényl-1,10-phénanthroline ruthénium pentahydraté). Ce dernier émet une fluorescence qui est inhibée en présence d'oxygène. En cas de développement mycobactérien, l'oxygène présent dans le tube de culture sera consommé et la fluorescence va devenir détectable après un certain temps. En revanche, l'absence de croissance ne va induire aucune modification sur le taux d'oxygène et la fluorescence va être inhibée. Les tubes de cultures sont mis dans l'appareil par série, le premier tube étant toujours un témoin de croissance correspondant à la pousse d'un inoculum mycobactérien cent fois plus faible que celui introduit dans les autres tubes. Le résultat est donné par l'appareil lorsque la fluorescence produite par ce témoin atteint un certain niveau. A ce moment précis, chaque tube de la série est dit soit « sensible » si aucune croissance mycobactérienne n'est détectée (fluorescence faible), soit « résistant » lorsqu'un développement a bien eu lieu. *Mycobacterium tuberculosis* possédant une durée de division d'une vingtaine d'heures, les résultats sont communiqués en une semaine.

IV Evaluation des paramètres physico-chimiques et ADME des composés

IV.1 Mesure de la solubilité

40 μ L d'une solution à 10mM dans le DMSO de l'échantillon est ajoutée à 1,96mL de MeOH ou de PBS à pH 7.4. Les échantillons sont alors agités pendant 24h à TA, centrifugés pendant 5min puis filtrés sur des filtres de taille 0.45 μ m. 20 μ L de chaque solution est alors ajoutée à 180 μ L de MeOH puis analysée par LC-MS. La solubilité est déterminée comme le ratio des aires des signaux de masses PBS/MeOH.

IV.2 Mesure du logD

40 μ L d'une solution à 10mM dans le DMSO de l'échantillon est ajoutée à 1,96mL d'un mélange 1/1 octanol/PBS à pH 7.4. La solution est agitée pendant 2h à TA. 20 μ L de chaque phase est ajoutée à 180 μ L de MeOH et analysés par LC-MS. Chaque composé est évalué en triplicate. Le logD est déterminé comme étant le logarithme du ratio des concentrations en produit dans les phases octanol et PBS, déterminés par les signaux de masse.

IV.3 Mesure de la stabilité microsomale

Le produit testé et le propranolol (référence) sont incubés en duplicate, à 37°C, avec les microsomes de souris femelle (0,6mg/mL), dans un tampon phosphate 50mM, pH 7.4 et en présence de MgCl₂ (5mM), de NADP (1mM), de glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.4U/mL) et de glucose-6-phosphate (5mM).

Des aliquotes de 75 μ L sont prélevés à 10, 20, 30 et 40min et la réaction est stoppées par addition de 4 volumes d'acétonitrile glacé contenant un standard interne.

Après centrifugation des échantillons 10min à 4°C et 10000rpm, les surnageants sont analysés par LC-MS/MS.

En parallèle, des incubations « Contrôles » (t_0 et t_{final}) sont réalisées en triplicate, en présence de microsomes de souris femelle dénaturés par l'acétonitrile glacé contenant le standard interne.

Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$ exprimé en minutes) est calculé d'après l'équation suivante :

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(2)}{k}$$

où k est la constante de dégradation du premier ordre, déterminée à l'aide de la régression linéaire de la représentation $\ln(\% \text{ restant}) = f(\text{temps})$.

La clairance *in vitro* intrinsèque (Cl_{int} exprimée en $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$) est estimée d'après la formule : $Cl_{\text{int}} = \text{dose}/AUC_{\infty}$ où la dose correspond à la quantité initiale de composé incubé ($1\mu\text{M}$) et l' AUC_{∞} à l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps, extrapolée à l'infini.

IV.4 Mesure de la stabilité plasmatique

Le produit testé et l'enalapril (référence) sont incubés en duplicate, à 37°C , à une concentration finale de $10\mu\text{M}$ (1% DMSO maximum) dans du plasma de souris femelle.

Des aliquotes de $50\mu\text{L}$ sont prélevés à 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 et 1440min et la réaction est stoppée par addition de 9 volumes d'acétonitrile glacé contenant un standard interne.

Après centrifugation des échantillons 10min à 10000rpm, les surnageants sont analysés par LC-MS/MS.

Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$ exprimé en heures ou en minutes) est calculé d'après l'équation suivante :

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(2)}{k}$$

où k est la constante de dégradation du premier ordre, déterminée à l'aide de la régression linéaire de la représentation $\ln(\% \text{ restant}) = f(\text{temps})$.

V Structure des réactifs utilisés pour la conception de la chimiothèque virtuelle.

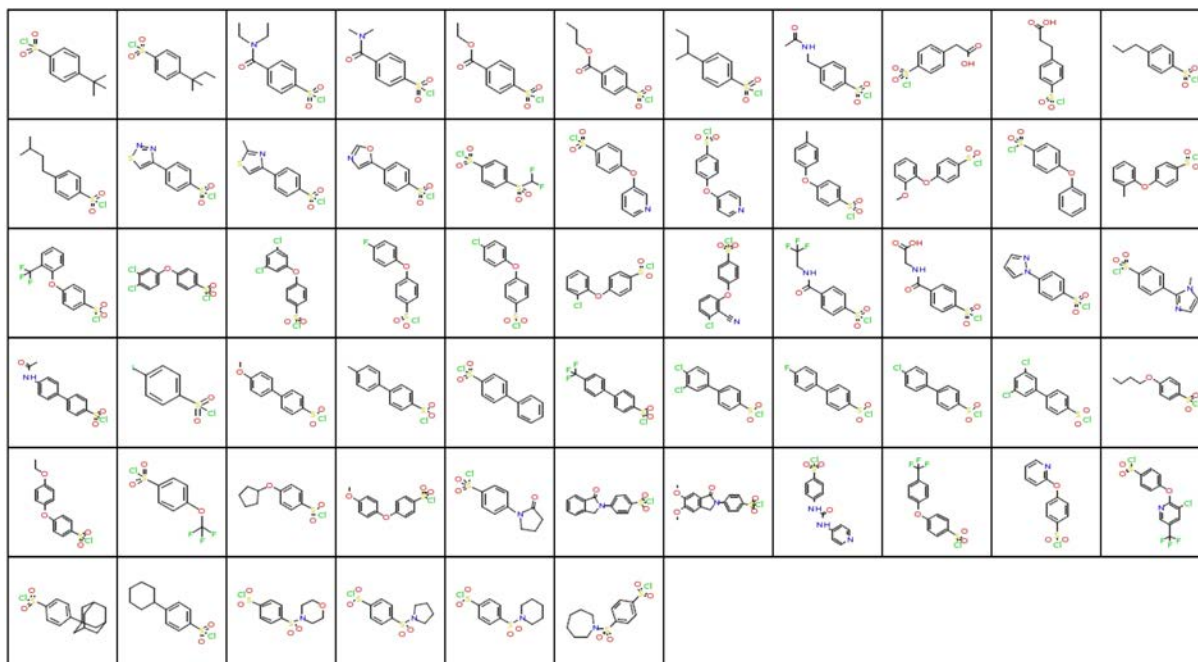


Figure 199 : Structure des 61 chlorures d'acide sulfonique utilisés pour la conception de la chimiothèque virtuelle.

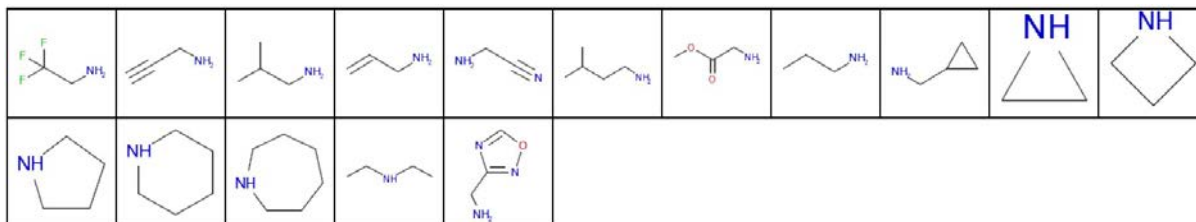


Figure 200 : Structures des 16 amines utilisées pour la conception de la chimiothèque virtuelle.