

Université de Lille 2 – Droit et Santé
Ecole doctorale Biologie – Santé de Lille

THESE DE DOCTORAT
Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Discipline : Immunologie, Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Spécialité : Bactériologie – Virologie – Hygiène hospitalière

Présentée et soutenue publiquement le 16 septembre 2016

par **Marie TITECAT**

EVALUATION D'UNE NOUVELLE CLASSE D'ANTIBIOTIQUES :
LES INHIBITEURS DE LPXC

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs : Pr Richard BONNET
Pr Alexandra AUBRY
Examineurs : Pr Didier HOCQUET
Dr Alain BAULARD
Directeur de thèse : Dr Nadine LEMAÎTRE

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe : Peste et *Yersinia pestis*
Université de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille
Laboratoire de Bactériologie – Hygiène, CHU de Lille

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier :

Madame le Docteur Nadine Lemaître de m'avoir encadrée pendant ces cinq années et de m'avoir fait bénéficier de ses compétences médicales et scientifiques.

Madame le Professeur Alexandra Aubry et **Monsieur le Professeur Richard Bonnet** de me faire l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Monsieur le Professeur Boualem Sendid de l'intérêt porté à l'évolution de ce projet.

Monsieur le Professeur Didier Hocquet et **Monsieur le Docteur Alain Baulard** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur le Docteur Florent Sebbane, directeur de l'équipe « Peste et *Y. pestis* », de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Monsieur le Professeur Michel Simonet

Vous avez largement contribué à la réalisation des expériences *in vivo* de cette étude. Ce travail a été un « compagnonnage » durant lequel vous n'avez cessé de transmettre votre expertise et votre enthousiasme s'associant à la richesse de votre enseignement qui m'accompagne depuis le DCEM1.

Monsieur le Professeur René Courcol

Vous m'avez accueillie avec beaucoup de bienveillance dans votre service et avez contribué à me faire embrasser la Bactériologie. Vous m'avez toujours encouragée et donné les moyens de mener à bien les projets cliniques et scientifiques dans lesquels j'ai pu m'engager. Vous m'avez permis d'effectuer une partie de mon travail de thèse dans l'enceinte du laboratoire NSB3 de l'Institut de Microbiologie du CHU de Lille. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le Docteur Elizabeth Pradel de m'avoir guidée sur les voies complexes de la Biologie Moléculaire. Ta rigueur et ton expertise sont pour moi des modèles.

Monsieur le Docteur Michaël Marceau, pour la richesse de nos échanges.

Mes collègues Hospitaliers avec une attention particulière aux **Docteurs Caroline Loïez** et **Frédéric Wallet** dont le soutien et la bienveillance sont d'authentiques catalyseurs.

Un immense merci à **Audrey** et **Laure** d'avoir partagé mes aventures de paillasse, de m'avoir fait bénéficier de leurs compétences techniques et, au delà, d'en avoir fait une aventure humaine.

Je remercie tous ceux qui ont contribué à l'avancement de ce projet, au Centre de Biologie Pathologie ou à l'Institut Pasteur de Lille : toute l'équipe « Peste et *Y. pestis* » mais aussi les équipes voisines : les « BLIM », les « BRIPT », les Docteurs Jean-Claude Sirard et Christophe Carnoy, Delphine, ainsi que le personnel des animaleries et du LNSB3.

Je remercie enfin ma famille et mes amis de leur indéfectible soutien.

RESUMÉ

L'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques au sein des bactéries à Gram négatif (BGN) sont aujourd'hui des enjeux de Santé Publique nationaux et internationaux. La multi-résistance aux antibiotiques concerne non seulement des espèces fréquemment responsables d'infections nosocomiales mais aussi des espèces hautement virulentes comme *Yersinia pestis*, agent de la peste et du bioterrorisme. Dans ce contexte, la mise au point de nouvelles molécules actives sur d'autres cibles bactériennes est primordiale. La métallo-enzyme LpxC catalyse la première étape irréversible de la biosynthèse du lipide A, constituant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Des inhibiteurs de LpxC sont ainsi développés depuis une vingtaine d'années mais leur spectre sur les BGN était initialement limité aux entérobactéries et leur activité était partielle sur *Pseudomonas aeruginosa*. Dans ce travail, nous avons participé à l'optimisation de la structure chimique de ces molécules grâce à une approche dynamique des interactions enzymes/inhibiteurs utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette technique a permis l'élaboration d'un nouvel inhibiteur de LpxC, le LPC-058, caractérisé par une forte affinité pour l'enzyme ($K_i = 3,5 \pm 0,2$ pM). Nous avons évalué *in vitro* l'activité antibiotique du LPC-058 et de trois autres composés (CHIR-090, LPC-011 et LPC-087) vis-à-vis de 369 souches cliniques responsables d'infections nosocomiales aux profils de résistance variés. Le LPC-058 présentait le plus large spectre d'activité en particulier sur *Acinetobacter baumannii* et les valeurs de CMI les plus basses ($CMI_{90} = 0,12$ mg/L pour les entérobactéries et 0,5 mg/L pour *P. aeruginosa*). Il était bactéricide vis-à-vis de souches multi-résistantes et son action était synergique avec les C3G, l'imipénème, l'amikacine et la ciprofloxacine vis-à-vis de souches de *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* productrices de carbapénémases, respectivement KPC-2, VIM-1 et OXA-23. Le LPC-058 présentait néanmoins une forte fixation protéique et, *in vivo*, son volume de distribution était limité au compartiment sanguin ($V_d = 1,1$ L/kg). Nous avons évalué son activité *in vivo* dans un modèle murin de peste bubonique car il s'agit de l'une des infections les plus virulentes pour l'homme. Nous avons obtenu une survie de 87 % après 5 jours de traitement à la posologie de 10 mg/kg q8h par voie veineuse. Le LPC-058 occasionnant des diarrhées chez le rongeur, nous avons évalué un de ses dérivés, le LPC-069, caractérisé par une moindre fixation protéique, un plus grand volume de distribution et l'absence d'effets secondaires chez la souris, même à fortes doses. Nous avons démontré qu'à la posologie de 200 mg/kg q8h par voie veineuse, cet antibiotique était aussi efficace que la doxycycline (traitement de référence de la peste). L'ensemble de ces travaux souligne le rôle potentiel des inhibiteurs de LpxC dans la prise en charge des infections par des bactéries multi-résistantes ou hautement virulentes.

mots clefs : Lipide A, inhibiteurs de LpxC, carbapénémase, peste

ABSTRACT

Antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria (GNB) has become a national and international public health concern. Resistant strains are involved in nosocomial diseases and in highly virulent infections, such as plague caused by *Yersinia pestis*, a potential biological weapon. In this context the development of new antimicrobial compounds efficient on new bacterial targets is critical. LpxC metallo-enzyme catalyzes the first commitment step of the lipid A biosynthesis, a major component of the Gram negative cell wall. LpxC inhibitors have been developed for twenty years but their activity was restricted to enterobacteria and was weak against *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, we have collaborated in the chemical optimization of the compounds thanks to a dynamic approach of enzyme/inhibitor interactions brought by nuclear magnetic resonance (NMR). This technology enabled the development of LPC-058, a new inhibitor, showing a high potency against LpxC ($K_i = 3.5 \pm 0.2$ pM). We studied the *in vitro* efficacy of LPC-058 and three other compounds (CHIR-090, LPC-011 and LPC-087) against 369 clinical strains responsible for nosocomial infections with various antibiotic resistance profiles. In this part, LPC-058 displayed the broadest spectrum of efficacy, even on *Acinetobacter baumannii* with the lowest MIC values ($MIC_{90} = 0.12$ mg/L against enterobacteria and 0.5 mg/L against *P. aeruginosa*). It showed bactericidal activity against multi-resistant strains and synergistic activity in association with third generation cephalosporins, imipenem, amikacin and ciprofloxacin against carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* strains (respectively KPC-2, VIM-1 and OXA-23). However, LPC-058 was constrained by strong protein interactions and a small volume of distribution ($V_d = 1.1$ L/kg). *In vivo* efficacy was studied in a murine model of bubonic plague. A 87% survival rate was obtained after five days of 10 mg/kg q8h intravenous administration. As LPC-058 treatment was associated to diarrheas in mice, we evaluated another derivate, LPC-069, characterized by a larger volume of distribution, minor protein fixation and less side effects, even for a high dose posology. We demonstrated a comparable efficacy between 200 mg/kg q8h LPC-069 treatment and doxycyclin administration (recommended in plague treatment). This work highlights the potential use of LpxC inhibitors in the management of infections caused by multi-resistant or highly virulent Gram-negative bacteria.

Keywords : Lipide A, LpxC inhibitors, carbapenemase, plague

SOMMAIRE

INDEX DES ABREVIATIONS	9
INDEX DES FIGURES	10
INTRODUCTION	11
I. LE LIPIDE A	15
1. Structure	17
2. Biosynthèse	18
3. Variations structurales	21
a. Variations constitutives	21
i. Variations des voies de biosynthèse	21
ii. Variations structurales	22
b. Variations inductibles	22
i. Voies de régulation	23
ii. Variations de la fraction lipidique	23
iii. Variations du noyau hydrophile	24
4. Rôle du lipide A	26
a. Rôle structural	26
i. Constitutif	26
ii. Adaptatif	26
b. Rôle immunologique	27
i. Stimulation de la réponse immune	27
ii. Modulation de la réponse immune	28
II. L'ENZYME LPXC	29
1. Structure de LpxC	30
2. Site Catalytique	31
3. Mécanisme d'action	34
4. Régulation	35
III. LES INHIBITEURS DE LPXC	36
1. Les diphenyl-acétylènes : le CHIR-090	38
a. Structure chimique	38
b. Mécanisme d'inhibition	38
c. Interactions enzyme-inhibiteur	39
d. Activité antibiotique	41
2. Les phényl-pyridones (LpxC-4)	42
3. Les diphenyl-diacétylènes (LPC-009 et LPC-011)	43
a. Structure chimique	43
b. Interactions enzyme-inhibiteur	43
c. Activité antibiotique	44
4. Synthèse	44

IV. LA RESISTANCE AUX INHIBITEURS DE LPXC.....	46
1. La résistance naturelle	46
2. La résistance acquise.....	47
a. Chez les entérobactéries	47
b. Chez <i>P. aeruginosa</i>	48
OBJECTIFS DU TRAVAIL	49
<hr/>	
MATERIEL ET METHODES	50
<hr/>	
I. EXPERIENCES <i>IN VITRO</i>	51
1. Souches bactériennes.....	51
2. Antibiotiques et anti-LpxC	52
3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	54
4. Etude de la cinétique de bactéricidie.....	54
5. Détermination de la fréquence spontanée de mutation	55
6. Sélection de mutants résistants par la méthode des passages successifs	56
7. Séquençage des gènes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de LpxC.....	57
II. EXPERIENCES <i>IN VIVO</i>	58
1. Animaux	58
2. Détermination des paramètres pharmacocinétiques	58
3. Etude des effets indésirables en administration répétées	59
4. Etude de l'effet protecteur dans un modèle de peste bubonique	59
5. Analyse statistique.....	60
RESULTATS	61
<hr/>	
I. APPORT DE LA RMN DANS LA MISE AU POINT DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LPXC	62
1. Résumé de l'article	62
2. Article	63
II. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE DES INHIBITEURS DE LPXC VIS-A-VIS DE SOUCHES NOSOCOMIALES	64
1. Résumé de l'article	64
2. Article	65
III. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE DES INHIBITEURS DE LPXC VIS-A-VIS DE <i>YERSINIA PESTIS</i>	66
1. <i>In vitro</i>.....	66
a. Détermination des CMI des inhibiteurs de LpxC vis-à-vis de <i>Y. pestis</i>	66

b. Détermination de la cinétique de bactéricidie des inhibiteurs de LpxC vis-à-vis de <i>Y.pestis</i>	68
2. Propriétés pharmacologiques et tolérance des inhibiteurs de LpxC	69
a. Stabilité métabolique et étude pharmacocinétique des LPC-058 et LPC-069	69
b. Etude des effets indésirables des inhibiteurs de LpxC en administrations répétées.....	70
3. Protection conférée par le LPC-058 et le LPC-069 dans un modèle de peste bubonique	74
IV. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX INHIBITEURS DE LPXC	77
1. Détermination de la fréquence spontanée de mutation	77
2. Sélection de mutants résistants en milieu liquide	78
3. Analyse du support génétique de la résistance	80
<u>DISCUSSION</u>	82
<u>CONCLUSION</u>	90
<u>PERSPECTIVES</u>	90
<u>ANNEXES</u>	92
Annexe 1 : Table des acides aminés	93
Annexe 2 : Critères employés pour la détermination du niveau de résistance des souches (MDR, XDR, PDR)	94
Annexe 3 : Article 1	96
Annexe 4 : Article 2	139
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	183

INDEX DES ABREVIATIONS

ACP : (*acyl carrier protein*) : protéine porteuse d'acyle

BCP : Bromocrésol pourpre

BGN : Bactérie à Gram Négatif

BLSE : β -Lactamase à Spectre Etendu

BMR : Bactérie Multi-Résistante

CDC : Center for Disease Control and prevention

C3G : Céphalosporines de 3ème génération

DE₅₀ : Dose Efficace médiane

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DP₅₀ : Dose Protectrice médiane

DPA : Acide dipicolinique

EBLSE : Entérobactérie Productrice de β -lactamase à Spectre Etendu

ECDC : European Center for Disease prevention and Control

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

InVS : Institut national de Veille Sanitaire

IP : Intra-Péritonéal

IV : Intra-Veineux

LBP : LPS Binding Protein

LPS : Lipopolysaccharide

MAP kinase : Mitogen-Activated Protein kinase

MDR : Multi Drug Resistant

ND : Non Déterminé

NF κ B : Nuclear Factor κ B

pb : paires de bases

RAISIN : Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RND : Resistance Nodulation Division

TLR : Toll Like Receptor

TPS : Tampon Phosphate Salin

UFC : Unité Formant Colonie

XDR : Extensively Drug Resistant

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : La paroi des bactéries à Gram négatif	15
Figure 2 : Le lipide A de <i>E. coli</i>	17
Figure 3 : La voie de biosynthèse du lipide A chez <i>E. coli</i>	18
Figure 4 : Structure du Kdo ₂ -lipide A de <i>E. coli</i> K12.....	19
Figure 5 : Assemblage et transport des différentes fractions du LPS	20
Figure 6 : Activation de TLR4 par le LPS	27
Figure 7 : Le substrat naturel de LpxC.....	29
Figure 8 : Structure de l'enzyme LpxC chez <i>A. aeoliticus</i>	31
Figure 9 : Le canal hydrophobe de LpxC chez <i>A. aeoliticus</i>	32
Figure 10 : Alignement des séquences primaires de sept enzymes LpxC	33
Figure 11 : Le site catalytique de LpxC de <i>A. aeoliticus</i>	34
Figure 12 : Précurseurs de la voie de synthèse du lipide A et des acides gras bactériens ..	35
Figure 13 : Structure chimique de différents représentants des inhibiteurs de LpxC	37
Figure 14 : Le CHIR-090	38
Figure 15 : Mécanisme d'inhibition du CHIR-090.....	39
Figure 16 : Alignement des séquences primaires de LpxC (aa 187 à 222).....	40
Figure 17 : Interactions du CHIR-090 avec l'enzyme LpxC chez <i>A. aeoliticus</i>	41
Figure 18 : Le LpxC-2 et le LpxC-4	42
Figure 19 : Structure chimique des CHIR-090, LPC-009 et LPC-011	43
Figure 20 : Structure chimique du CHIR-090 et de ses dérivés.....	53
Figure 21 : Cinétique de bactéricidie des LPC-058 et LPC-069 vis-à-vis de <i>Y. pestis</i>	68
Figure 22 : Conséquences biologiques de l'administration répétée de LPC-058 et de LPC-069 par voie intra-veineuse ou intra-péritonéale à des souris OF1	72
Figure 23 : Retentissement tissulaire de l'administration de LPC-058 à 40 mg/kg q12h...	73
Figure 24 : Courbes de survie et dénombrement de la charge bactérienne dans les organes de souris traitées par LPC-058 et LPC-069 pendant 5 jours	74
Figure 25 : Cinétique de colonisation des organes d'animaux traités par LPC-058 (10 mg/kg q8h) ou LPC-069 (40 mg/kg q8h) et témoins dans un modèle de peste bubonique.....	75
Figure 26 : Protection conférée par le LPC-069 (200 mg/kg q8h) dans un modèle murin de peste bubonique.....	76

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les infections bactériennes sont un motif récurrent d'hospitalisations et une source fréquente de complications. En 2011, les infections associées aux soins représentaient 4% des patients hospitalisés aux Etats-Unis soit 648 000 individus (Magill *et al.*, 2014). Ce pourcentage s'élève à 19% si l'on considère les patients admis en unité de soins intensifs (Alberti *et al.*, 2002). En France, l'enquête nationale menée par l'InVS en 2012 sur une cohorte de 300 330 patients mettait en évidence une prévalence de 5,1% d'infections nosocomiales (données RAISIN 2013 ; InvS 2012). Les quatre types d'infections les plus représentées étaient urinaires, pulmonaires, les infections de site opératoire et les bactériémies. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient les trois pathogènes les plus fréquemment isolés par ordre décroissant de prévalence. Depuis une vingtaine d'années, la proportion des infections par les bactéries à Gram négatif (BGN) dépasse celle des infections par les espèces à Gram positif (Vincent *et al.*, 2009, Gaynes *et al.*, 2005). Entre 2006 et 2012, une diminution de 50% des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline était observée parallèlement à une augmentation de 38% des infections par des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (C3G). A l'échelle communautaire et nosocomiale, l'émergence et la diffusion de l'antibiorésistance au sein des espèces à Gram négatif sont des préoccupations majeures de santé publique.

Ce phénomène fait l'objet d'une veille attentive au sein de réseaux de surveillance nationaux et internationaux. En 2013, 7% des souches françaises d'*E. coli* étaient productrices d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) contre 0,2% en 2002 (données du Réseau REUSSIR ; ONERBA 2013). Ce phénomène est également constaté par l'ECDC (European Center for Disease prevention and Control) en 2014 avec une élévation de la proportion de souches d'*E. coli* (+ 3% sur la période 2011-2014) résistantes aux C3G dont la majorité étaient productrices de BLSE (ECDC 2015). Les β -lactamines qui étaient alors une classe largement

plébiscitée pour son large spectre antibactérien et sa bonne tolérance clinique sont mises en défaut par l'acquisition et l'expression d'enzymes bactériennes hydrolysant un grand nombre de molécules de cette spécialité. Les carbapénèmes, plus stables, constituaient encore il y a peu une « réserve thérapeutique » pour la prise en charge probabiliste des infections causées par ces bactéries multi-résistantes. En 2013, le CDC (Center for Disease Control and Prevention) qualifie la résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries de « menace urgente » aux Etats-Unis. Elle représente en effet 9 000 cas d'infections nosocomiales et 600 décès annuels (CDC 2013). En Europe, elle concerne 62,3% des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées en Grèce. D'autres espèces à Gram négatif sont concernées comme *P. aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii* dont la sensibilité à l'imipénème a diminué de plus de 20% entre 2000 et 2012 (données réseau REUSSIR ; ONERBA 2013).

La propagation rapide de ces souches est le fait du support génétique mobile codant la résistance à différentes classes de molécules (Canton *et al.*, 2012). La diffusion horizontale de la résistance repose sur l'acquisition et l'échange de plasmides, vecteurs de transposons capables de changer de localisation dans le génome, eux-mêmes porteurs d'éléments génétiques mobiles indépendants ou intégrons. Ce processus concerne l'ensemble des espèces à Gram négatif parmi lesquelles *Yersinia pestis*, agent de la peste. Cette espèce, responsable de pandémies historiques, persiste sous forme endémo-épidémique dans de nombreuses régions du monde et représente un agent de la menace bioterroriste (WHO 2016 ; Rotz *et al.*, 2002). En 1995, une souche isolée d'un cas de peste bubonique était résistante à 5 classes d'antibiotiques par l'acquisition d'un plasmide conjugatif dont la structure génétique était comparable à celle rencontrée chez les autres Enterobacteriaceae (Galimand *et al.*, 1997 ; Galimand *et al.*, 2006 ; Welch *et al.*, 2007). La diffusion de ces gènes de résistance restreint l'arsenal thérapeutique disponible voire conduit dans certains cas à de véritables impasses. Le

recours à d'anciens antibiotiques tels la colistine (Nation et Li, 2009) ou la fosfomycine (Falagas *et al.*, 2010), à des associations parfois non conventionnelles (Wareham *et al.*, 2011) ou à des inhibiteurs de β -lactamase (Bush, 2015) tente d'endiguer le phénomène. Cependant, la toxicité de certaines de ces molécules (colistine) et leur moindre efficacité grèvent le pronostic de ces infections dont la mortalité est supérieure à celle de bactéries sensibles (Falagas *et al.*, 2014 ; de Kraker *et al.*, 2011). Au delà, la multi-résistance remet en question le schéma de prise en charge de première intention des patients infectés en ville comme à l'hôpital. D'un point de vue économique, elle est responsable d'infections de plus longues durées nécessitant le recours à des thérapeutiques et des hospitalisations prolongées générant un surcoût majeur (Tansarli *et al.*, 2013).

Face à cette évolution épidémiologique, la recherche et le développement de nouvelles molécules, actives contre des cibles bactériennes non concernées par les mécanismes de résistance actuels sont primordiaux. Notre travail de thèse a consisté en l'étude de molécules inhibant une enzyme (LpxC) impliquée dans la biosynthèse du lipide A bactérien, constituant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ces inhibiteurs de LpxC ont été évalués *in vitro* vis-à-vis de souches bactériennes multi-résistantes d'origine nosocomiale et *in vivo* dans un modèle de peste bubonique, l'une des infections les plus virulentes pour l'homme.

I. LE LIPIDE A

A la différence des espèces à Gram positif, la paroi des bactéries à Gram négatif est caractérisée par un double feuillet membranaire (figure 1). Elle comporte une membrane interne phospholipidique et une membrane externe asymétrique dont les feuillets interne et externe sont respectivement constitués de phospholipides et de lipopolysaccharide (LPS). Plus de trois millions de molécules de LPS recouvrent les quelques μm^2 de la surface d'une bactérie à Gram négatif. Leur répartition varie et alterne avec des protéines de membrane externe : porines, protéines structurales ou impliquées dans les processus d'export et de sécrétion (Nikaido, 2003 ; Smit *et al.*, 1975).

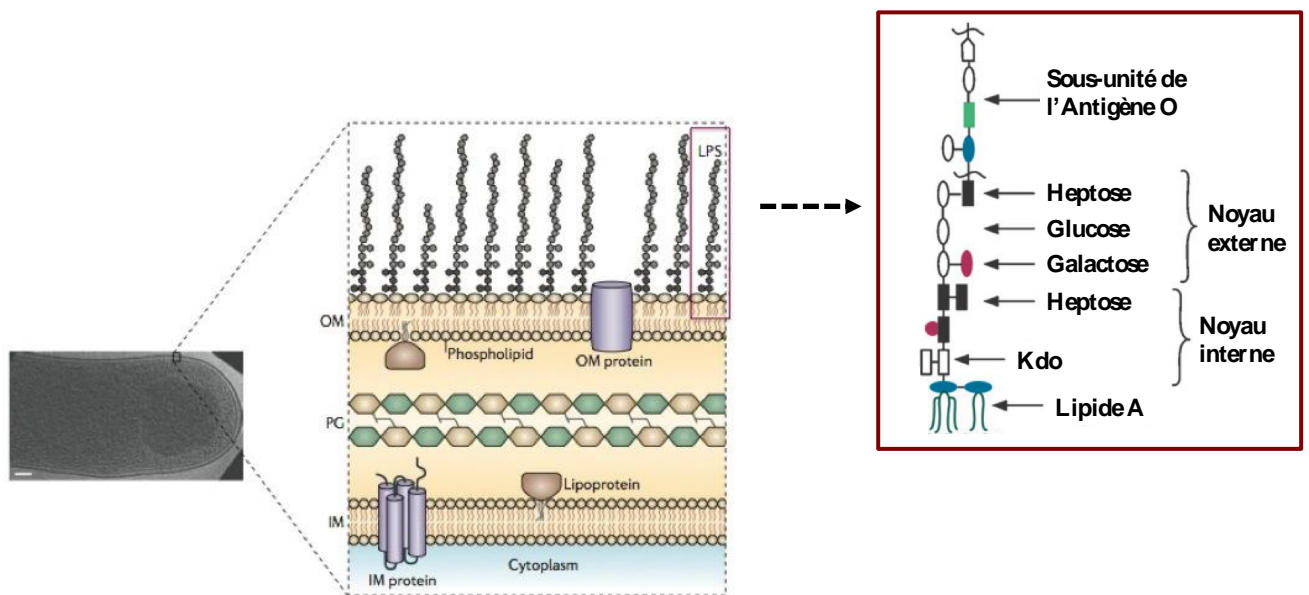


Figure 1 : La paroi des bactéries à Gram négatif d'après Needham et Trent, 2013 (figure gauche) ; d'après Raetz *et al.*, 2009 (figure droite).

Le LPS comporte 3 parties : une ancre membranaire hydrophobe (le lipide A) reliée à un noyau oligosaccharidique associé (LPS « lisse ») ou non (LPS « rugueux ») à une chaîne polysaccharidique, l'antigène O (Rieschel *et al.*, 1994).

Le noyau consiste en une succession de 9 à 12 unités saccharidiques contenant de l'acide 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic (Kdo). Deux portions lui sont décrites : interne et externe. La structure du noyau interne est extrêmement conservée au sein des genres bactériens et associe des résidus de Kdo et de L-*glycéro*-D-*manno*-heptopyranoses. Le Kdo est un élément structural constant au sein des espèces à Gram négatif, il s'associe en dimère (ex : *E. coli*) ou parfois à son dérivé (ex : *Y. pestis*) l'acide D-*glycéro*-D-*talo*-oct-ulosonic (Ko). Le nombre d'heptopyranoses et leurs substitutions varient d'une espèce à l'autre. Le noyau externe plus variable est constitué d'hexoses. Seuls deux résidus Kdo du noyau interne associés au lipide A sont nécessaires et suffisants pour assurer la croissance d'*E. coli* (Raetz et Whitfield, 2002).

La chaîne O est un polysaccharide formé d'un nombre variable de sous unités répétitives de un à huit monosaccharides. Elle représente un épitope responsable de la spécificité antigénique de la bactérie, d'où son nom d' « antigène O ». La longueur et la constitution des chaînes saccharidiques de l'antigène O varient en fonction des espèces. Certaines bactéries à tropisme muqueux (ex : *Neisseria* spp., *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*) sont caractérisées par un court motif saccharidique appelé lipo-oligosaccharide (LOS) facilitant leur adhésion. Des chaînes plus longues sont retrouvées chez les entérobactéries leur permettant de résister à l'action du complément, à la phagocytose et aux sels biliaires.

Le LPS assure la cohésion membranaire, constitue une barrière chimique vis à vis des composés hydrophobes (Nikaido, 1994) et favorise l'adhésion de la bactérie aux surfaces qu'elle rencontre (Nikaido, 2003 ; Walker *et al.*, 2004).

Les premières expériences de purification du LPS menées par Westphal et Luderitz en 1954 ont permis de distinguer le « lipide A » ou fraction lipidique du LPS extraite après traitement à l'acide, du lipide B, la fraction protéique et phospholipidique du LPS (Brade H. 1999). Ce n'est que bien plus tard que sont caractérisées les propriétés biologiques du lipide A (Luderitz *et al.*, 1973), et en 1983 qu'une structure exacte en est pour la première fois proposée (Strain *et al.*, 1983).

1. Structure

La surface d'une bactérie d' *E. coli* est recouverte d'environ 10^6 molécules de Lipide A et 10^7 de glycérophospholipides (Raetz et Whitfield, 2002). Le lipide A s'organise autour d'un squelette disaccharidique, deux motifs D-glucosamine (bleu) liés en β -1,6, bisphosphorylés en 1' et 4' (rouge) et auxquels sont liées de manière directe ou indirecte des chaînes d'acides gras (noir). La forme canonique du lipide A de *E. coli* est représentée figure 2.

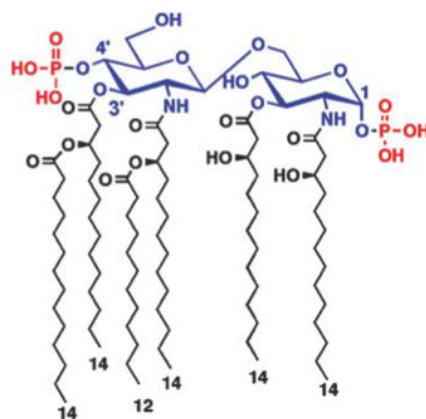


Figure 2 : Le lipide A de *E. coli* d'après Raetz *et al.*, 2009

2. Biosynthèse

Le lipide A est synthétisé au niveau de la face cytoplasmique de la membrane interne par neuf enzymes spécifiques et hautement conservées (Raetz *et al.*, 2009 ; Raetz et Whitfield, 2002). Les trois premières étapes sont catalysées par des protéines solubles cytoplasmiques (LpxA, LpxC et LpxD) tandis que les cinq dernières étapes sont catalysées par des enzymes situées dans la membrane interne (LpxK, WaaA, LpxL, et LpxM).

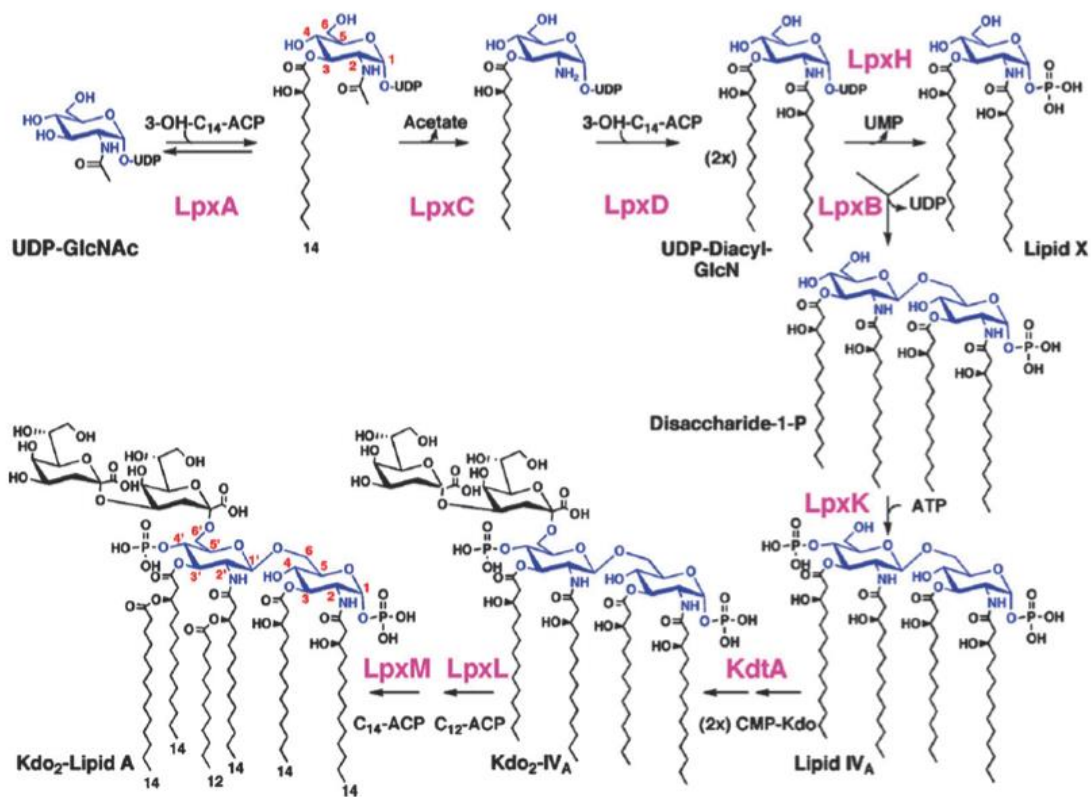


Figure 3 : La voie de biosynthèse du lipide A chez *E. coli* (d'après Raetz *et al.*, 2009)

La première étape de cette biosynthèse, représentée figure 3, consiste en l'acylation du carbone en position 3 d'un motif UDP-N-acétyl-glucosamine par l'enzyme LpxA dont le substrat est commun à la biosynthèse des phospholipides membranaires. Toutefois, l'équilibre de cette réaction réversible est davantage orienté vers la transformation du produit en substrat

(Anderson MS *et al.*, 1993). Ainsi, la seconde étape irréversible de déacétylation du UDP-3-O-(acyl)-GlcNAc par l'enzyme LpxC est considérée comme la première réaction engageant la voie de biosynthèse du lipide A. Une seconde chaîne β -hydroxymyristoyl est ensuite insérée par l'enzyme LpxD via une protéine porteuse d'acyle (ACP). Le produit de cette réaction ou UDP-2,3-diacyl-GlcN est ensuite clivé en 2,3-diacyl-GlcN-1-phosphate par LpxH. Cette forme intermédiaire (2,3-diacyl-GlcN-1-phosphate) est encore appelée lipide X. En greffant à ce lipide X une autre molécule de UDP-2,3-diacyl-GlcN, LpxB conduit à la formation d'un disaccharide. La phosphorylation de ce disaccharide par LpxK génère le lipide IV_A auquel sont incorporés deux résidus de Kdo par l'enzyme WaaA (ou KdtA). Elle utilise le CMP-Kdo (cytidine 5'-monophosphate-3-deoxy-D-manno-octulosonate), un produit du métabolisme du D-ribulose 5-P. Enfin les ajouts successifs d'un laurate (C12) puis d'un myristate (C14) respectivement par LpxL et LpxM conduisent à la forme définitive hexa-acylée du lipide A présentée figure 4 (Karow M *et al.*, 1991 ; Clementz T *et al.*, 1997).

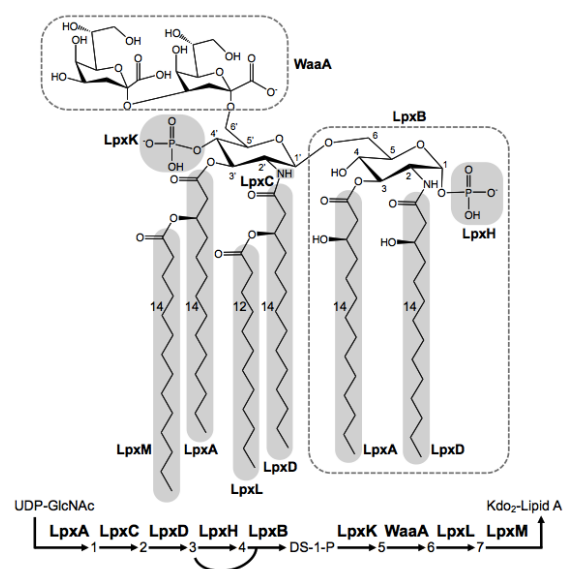


Figure 4 : Structure du Kdo₂-lipide A de *E. coli* K12 soulignant les modifications apportées par chacune des neuf enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse (d'après Opiyo *et al.*, 2010)

Des glycosyl-transférases procèdent ensuite à l'ajout de différents sucres (heptose, galactose, glucose) au motif Kdo₂-lipide A afin de constituer la structure « noyau-lipide A » du LPS (figure 5). Ce composé est ensuite basculé depuis la face cytoplasmique à la face externe de la membrane interne par la flippase MsbA qui contrôle dans le même temps la bonne conformation du LPS naissant. C'est dans le périplasm que le lipide A originel connaît un remodelage des différentes parties qui le constituent via l'ajout ou l'hydrolyse de chaînes acylées, de groupements phosphates voire le transfert de groupements phosphorylés ou aminés. L'antigène O, également synthétisé dans le cytoplasme, bascule ensuite dans le périplasm pour être lié au noyau-lipide A par la ligase WaaL qui donne naissance à la forme mature du LPS. Cette dernière est ensuite prise en charge par le complexe des protéines de transport LptABCDEFGG (Lpt : lipopolysaccharide transport) faisant circuler le LPS depuis la membrane interne à travers le périplasm et assurant son insertion dans la membrane externe (Sperandeo P *et al.*, 2009).

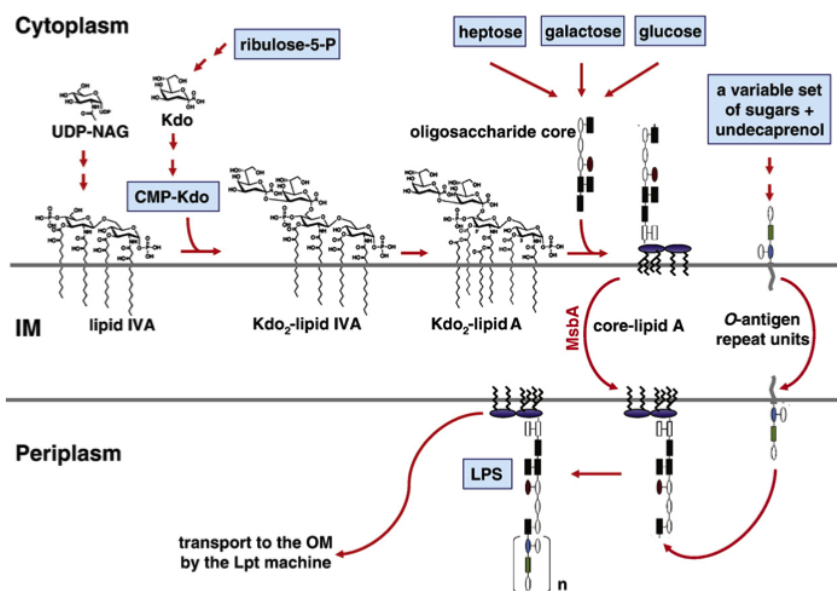


Figure 5 : Assemblage et transport des différentes fractions du LPS (d'après Sperandeo *et al.*, 2009)

Cette organisation finale du lipide A hexa-acylé qui ancre le LPS à la surface de *E. coli* est une structure type. Au delà de ce processus de biosynthèse hautement conservé, de nombreux travaux ont montré l'existence de variations entre les espèces à Gram négatif voire au sein d'une même espèce bactérienne, comme une réponse à la nécessité adaptative de la bactérie face à son environnement.

3. Variations structurales

Les techniques modernes de purification et d'analyse ont permis la mise en évidence d'un grand nombre de variations dans la constitution du lipide A au sein des espèces à Gram négatif. Ces variations structurales impliquent à la fois ses portions hydrophile et hydrophobe. Elles peuvent être constitutives et spécifiques d'une espèce ou induites par les variations des conditions de culture.

a. Variations constitutives

i. Variations des voies de biosynthèses

Le schéma théorique de biosynthèse doté des 9 enzymes est le propre d'un groupe de Gammaproteobacteria incluant *E. coli*, *Y. pestis* ou *H. influenzae*. Les schémas les plus rudimentaires associent les 4 enzymes *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, et *lpxB* dont les gènes respectifs sont organisés en cluster. De la même façon, les gènes codant *waaA* et *lpxK* sont également liés, soulignant l'importance des deux étapes qu'elles catalysent (respectivement la phosphorylation du dissaccharide et l'incorporation des deux résidus Kdo). La présence ou l'absence de certains de ces gènes résultent d'évènements indépendants de duplication ou de délétion témoignant des nécessités adaptatives des espèces à Gram négatif au cours de l'évolution. L'enzyme LpxH est par exemple absente du tiers des génomes de BGN (Raetz *et*

al., 2007). LpxM et LpxP seraient des formes évolutives duplicatives de LpxL (Opiyo *et al.*, 2010). Par ailleurs, LpxM n'est pas essentielle pour la bactérie et fait naturellement défaut aux espèces des genres *Pseudomonas* sp. (Gammaproteobacteria) ou *Bordetella* sp. (Betaproteobacteria).

ii. Variations structurales

Le noyau hydrophile constitué de résidus glucosamines (GlcN) chez les entérobactéries peut être associé (ex : *Campylobacter*) ou remplacé (*L. pneumophila*) par d'autres sucres comme le 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose (GlcN3N) ou le galactosamine (*N. meningitidis*). A ces noyaux différents s'ajoutent différentes liaisons aux chaînes d'acides gras. Chez *E. coli*, les chaînes d'acides gras sont liées au deux résidus de GlcN par des liaisons ester en position 3 et 3' et amide en position 2 et 2'. Chez *Brucella*, le noyau est un diaminoglucose relié à des chaînes acyles par des liaisons amide exclusives (Moran *et al.*, 1991 ; Zähringer *et al.*, 1995 ; Lapaque *et al.*, 2005).

La longueur des chaînes d'acides gras varie également entre les espèces à Gram négatif (C10 chez *P. aeruginosa* et d'autres espèces environnementales, C14 chez *E. coli*, C16 pour *H. pylori* ou C18-C19 pour *Brucella*) et répond à la spécificité des substrats employés par les acyl-transférases LpxA et LpxD de chacune d'entre elles (Sweet *et al.*, 2002 ; Bainbridge *et al.*, 2008). Le nombre de ces chaînes acylées est également inconstant (4 chez *P. aeruginosa*, 7 chez *A. baumannii*), tout comme leur répartition : symétrique chez *N. meningitidis* ou asymétrique autour du noyau dissaccharidique chez *E. coli*.

b. Variations inductibles

Contrairement à la voie constitutive, les enzymes impliquées sont essentiellement extra-cytoplasmiques. Elles se situent sur la portion périplasmique de la membrane interne ou dans

la membrane externe. Leur induction est le fait de variations de température, de pH, de concentrations ioniques ou est associée à la présence de peptides antimicrobiens dans le milieu extérieur (Raetz *et al.*, 2007).

i. Voies de régulation

Ces modifications adaptatives sont essentiellement dirigées par les systèmes à deux composants PhoP-PhoQ et PmrA-PmrB. Les systèmes à deux composants sont les « organes bactériens » de perception de l'environnement. Ils sont composés d'un système externe de détection du signal (senseur) qui le diffuse à travers la membrane vers un module transmetteur qui activera le composant régulateur. Le senseur PhoQ est stimulé par la diminution de la concentration d'ions Mg^{2+} dans le milieu, induite, par exemple, par des peptides antimicrobiens déplaçant les cations Mg^{2+} du LPS. Ce signal active la phosphorylation du régulateur transcriptionnel PhoP et conduit à l'activation ou la répression d'une quarantaine de gènes (Gunn et Miller, 1996 ; Sonici et Groisman, 1996). PmrA-PmrB est stimulé directement par une diminution du pH ou une élévation de la concentration en Fe^{3+} dans le milieu, ou indirectement par PhoP-PhoQ lors d'une variation de la concentration en Mg^{2+} via la transcription de la protéine PmrD. Ces systèmes à deux composants sont impliqués à la fois dans les modifications de la fraction lipidique et de la substitution du noyau dissaccharidique du lipide A (Groisman *et al.*, 1997 ; Guo *et al.*, 1997 ; Needham et Trent, 2013 ; Wang et Quinn, 2010).

ii. Variations de la fraction lipidique

La modification de la longueur des chaînes d'acides gras du lipide A participe à la réponse adaptative de la bactérie aux variations de température du milieu. Ainsi à basse température, *E. coli* ajuste la fluidité de sa membrane externe en exprimant le gène *lpxP* et réprimant *lpxL*.

Environ 80% des résidus de lipide A d'une population d'*E. coli* cultivée à 12°C seraient ainsi substitués par du palmitate (C16) en lieu et place du laurate (C12) majoritaire à 30°C (Carty *et al.*, 1999). La température du milieu fait également varier le nombre de chaînes d'acides gras. A 25°C, *Y. pestis* synthétise une forme hexa-acylée sous l'activation conjointe de LpxP et LpxM. A 37°C, la bactérie synthétise un lipide A tétra-acylé, LpxL lui faisant naturellement défaut (Montminy *et al.*, 2006).

D'autres enzymes situées dans la membrane externe des entérobactéries sont impliquées dans la modification du nombre de chaînes acylées du lipide A : PagP, PagL et LpxR. La première augmente leur nombre tandis que les deux dernières le réduisent. PagP et PagL sont activées par le système à deux composants PhoP-PhoQ (PhoP-activated-genes) et catalysent respectivement une palmitoylation (C16) et une 3-O-déacétylation tandis que LpxR catalyse une 3'-O-déacétylation indépendamment de PhoP PhoQ (Guo *et al.*, 1997 ; Bishop *et al.*, 2000 ; Reynolds *et al.*, 2006). D'autres modifications de la fraction lipidique peuvent également être observées telles sa 2-hydroxylation catalysée par l'enzyme LpxO.

iii. Variations du noyau hydrophile

Ces variations s'ajoutent à celle de la structure hydrophobe. La charge négative du lipide A repose sur la présence de 2 groupes phosphates en position 1- et 4'- du noyau dissaccharidique. Cette charge négative attire les peptides antimicrobiens cationiques en réponse desquels les bactéries à Gram négatif vont éliminer ou décorer certains de ces résidus phosphates et moduler ainsi la charge du lipide A originel.

Francisella novicida utilise ces deux voies. La bactérie élimine le groupement phosphate en position 4'- grâce à l'action de la phosphatase périplasmique LpxF. Parallèlement, elle substitue le groupement phosphate en position 1- avec un résidu de galactosamine (GalN) grâce à l'enzyme FlmK (Wang *et al.*, 2009).

D'autres substitutions décrites chez *E. coli* ou *Salmonella sp* sont sous le contrôle du système à deux composants PmrA-PmrB activé directement ou indirectement via la PhoP-PhoQ et l'adaptateur PmrD (Rubin *et al.*, 2015 ; Trent *et al.*, 2001 ; Zhou Z *et al.*, 2001). PmrAB active la transcription des gènes *eptA* et *arnT* qui substituent les résidus phosphates en 1- et 4'-respectivement par un ou deux résidus phosphoéthanolamine (pEtN) ou 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) en fonction de la présence ou non de Kdo (Lee *et al.*, 2003 ; Zhou *et al.*, 2001). Ces substitutions par du L-Ara4N permettent à *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* de coloniser la muqueuse respiratoire des patients mucoviscidosiques caractérisée par de fortes concentrations de peptides cationiques (Soong *et al.*, 1997). En plus de PmrAB et PhoPQ, *P. aeruginosa* dispose de deux systèmes à deux composants supplémentaires ParRS et CprRS impliqués dans l'activation de l'opéron *arn* qui contribue également à la résistance adaptative aux antibiotiques peptidiques et aux aminosides (Fernandez *et al.*, 2010; McPhee *et al.*, 2003). La présence de ces résidus aminoarabinoses au sein du lipide A et du noyau du LPS de *B. cepacia* lui confère une résistance naturelle à la colistine (Soyza *et al.*, 2008).

D'autres espèces comme *A. baumannii* et *N. meningitidis* ne synthétisent pas de 4-amino-arabinose et décoorent leur lipide A par des résidus phosphoéthanolamines. Cet ajout est constitutif chez *N. meningitidis* et inductible chez *A. baumannii* via *pmrAB* (Tzeng *et al.*, 2015 ; Beceiro *et al.*, 2011). L'une des conséquences est la résistance des souches d'*A. baumannii* aux polymyxines, classe d'antibiotique employée en cas de multirésistance (Arroyo *et al.*, 2011).

4. Rôle du lipide A

a. Rôle structural

i. Constitutif

Le lipide A est garant de l'intégrité cellulaire. La charge négative conférée par ses résidus phosphates attire les cations divalents et participe à la stabilisation du LPS à la surface de la bactérie. A de rares exceptions près (*N. meningitidis*, *A. baumannii*, *Chlamydia trachomatis*), l'absence de lipide A est létale pour la bactérie (Ley et Steeghs, 2003 ; Moffat *et al.*, 2010 ; Nguyen *et al.*, 2011). Ainsi, des mutations ciblant sa biosynthèse affectent la croissance bactérienne et induisent une sensibilité accrue aux antibiotiques hydrophobes (Normark *et al.*, 1969).

ii. Adaptatif

La composition du lipide A varie en fonction de l'environnement de la bactérie. Celle-ci ajuste la fluidité de sa membrane à la température du milieu par l'ajout des chaînes d'acides gras plus longues. La variation du nombre de chaînes de la fraction lipidique (PagP) ou les modifications de substitution du noyau hydrophile (déphosphorylation, L-aAra4N, phosphoéthanolamine) permettent à la bactérie de survivre dans des conditions ioniques hostiles. Au delà, les variations adaptatives du lipide A s'inscrivent dans l'évolution naturelle du processus infectieux. A titre d'exemple, le système à deux composants PhoP-PhoQ permet à *Y. pestis* de s'adapter aux variations thermiques rencontrées au cours de son cycle (6°C dans l'environnement, 21°C chez la puce, 37°C chez le mammifère), de se répliquer dans l'intestin de la puce et de survivre dans les cellules phagocytaires (Oyston *et al.*, 2000 ; Shannon *et al.*, 2013).

b. Rôle immunologique

i. Stimulation de la réponse immune

En plus de sa fonction structurale, le lipide A est une puissante endotoxine. Il représente le motif du LPS reconnu par le système immunitaire de l'individu et induit une réaction pro-inflammatoire vouée à contenir l'infection. Dans certains cas (susceptibilité de l'individu, inoculum bactérien important), cette réponse inflammatoire de l'hôte se montre excessive, le faisant évoluer cliniquement d'un état fébrile vers le sepsis jusqu'au choc septique (Mira *et al.*, 1991 ; Eidt *et al.*, 2016 ; Danner *et al.*, 1991, Annane *et al.*, 2005 ; Beutler et Poltorak, 2001). Le lipide A est un ligand reconnu chez l'hôte par les récepteurs membranaires de la famille des TLR (Toll Like Receptor). En 1998, Poltorak *et al.*, démontraient l'association entre une mutation au sein du locus codant le TLR4 murin et l'insensibilité des souris qui en étaient affectées au LPS (C3H/HeJ et C57/10ScCr). Les animaux étaient alors résistants aux doses létales d'endotoxines, mais d'une sensibilité accrue aux infections par des bactéries à Gram négatif (Poltorak *et al.*, 1998). La reconnaissance du LPS par les cellules de l'immunité innée est un processus complexe faisant intervenir l'activation du complexe TLR4-MD2-CD14 schématisé figure 6 (Miller *et al.*, 2005 ; Park *et al.*, 2009).

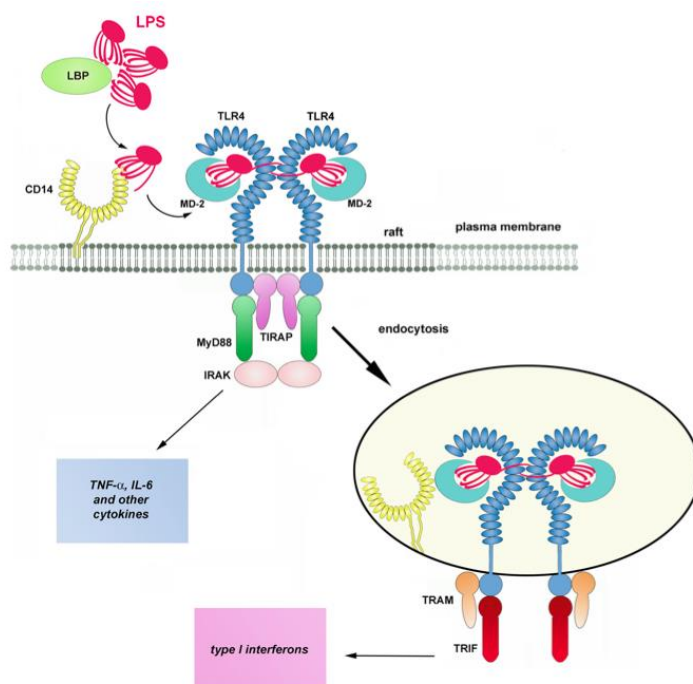


Figure 6 : Activation de TLR4 par le LPS (d'après Ptociennikowska *et al.*, 2015)

La LPS-binding protein eucaryote (LBP) se lie aux molécules de LPS circulantes qu'elle prépare et transfère au récepteur soluble CD14 qui se lie à son tour au complexe MD2/TLR4 (Yu et Wright, 1996). La dimérisation du récepteur TLR4 en présence de lipide A couplé au co-récepteur MD2 induit l'activation de voies de signalisation orientant la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 ou Interférons de type I)

ii. Modulation de la réponse immune

Les variations concernant le nombre (ex : *Y. pestis*) ou la longueur (ex : *B. cepacia*) des chaînes d'acides gras sont également des atouts dans l'évasion de la bactérie face aux défenses de l'hôte. Contrairement à la forme hexa-acylée de *E. coli*, la forme tétra-acylée du lipide A de *Y. pestis* est un faible agoniste des récepteurs immuns de l'homme et permet ainsi à la bactérie de proliférer à 37°C (Montminy *et al.*, 2006)

D'autres réactions catalysées par PagP (ajout d'un palmitate) et PagL (déacétylase) limitent l'activation du complexe TLR4/MD2 (Kawasaki *et al.*, 2004). Elles sont exprimées par *P. aeruginosa* ou *B. pertussis* afin de limiter la réponse immune de l'hôte lors du processus infectieux. L'expression d'autres enzymes telle la déacétylase LpxR favorise la réplication de *Salmonella* dans le macrophage (Kawasaki *et al.*, 2012 ; Kawano *et al.*, 2010 ; Reynolds *et al.*, 2006). D'autres modifications du lipide A telles sa 2-hydroxylation catalysée par LpxO contribuent également à protéger la bactérie de l'action des peptides anti-microbiens, par exemple au cours des infections pulmonaires à *K. pneumoniae* (Llobet *et al.*, 2015).

II. L'ENZYME LpxC

LpxC est une métalloamidase qui catalyse la déacétylation de l'UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acétylglucosamine ou première étape irréversible de la biosynthèse du lipide A. Elle est codée par un gène hautement conservé et présent en monocopie sur le chromosome des espèces à Gram négatif.

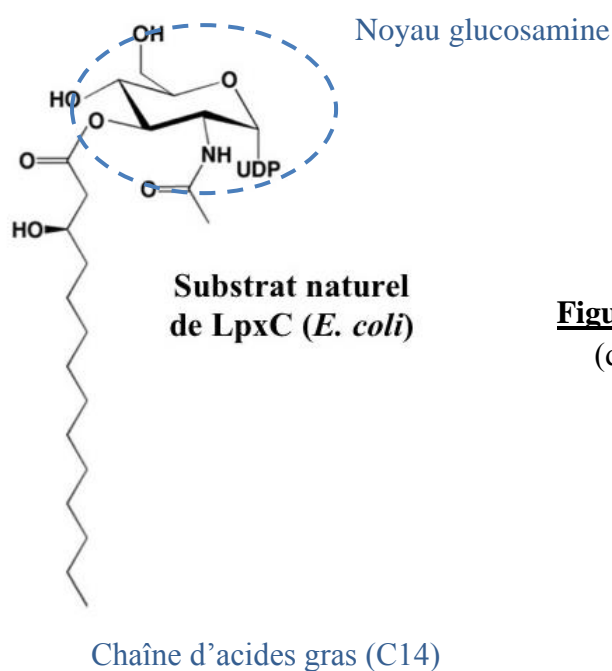


Figure 7 : Le substrat naturel de LpxC (d'après Gennadios *et al.*, 2006)

Cette enzyme a été historiquement mise en évidence au cours d'expériences menées sur des mutants d'*E. coli* résistants à la pénicilline (Normak *et al.*, 1969). En effet, des souches « lisses » issues de ces mutants étaient plus sensibles à la pénicilline que leurs parents « rugueux » et possédaient une morphologie microscopique atypique, filamenteuse, une paroi irrégulière, et montraient une sensibilité accrue à de nombreux antibiotiques. Le gène muté à l'origine de ce phénotype étaient alors appelé *envA* pour enveloppe mutant A. Plus tard, Young *et al.*, mettaient en évidence la production d'une moindre quantité de LPS chez ces bactéries mutées, conséquence d'une diminution de l'activité UDP-3-*O*-acyl-GlcNac

déacétylase affectant la biosynthèse du lipide A (Young *et al.*, 1995). Le gène *envA* fut renommé *lpxC* (Young *et al.*, 1995).

La biosynthèse du lipide A étant essentielle à la croissance bactérienne, LpxC est une enzyme hautement conservée au sein des bactéries à Gram négatif. A titre d'exemple, la séquence protéique de *E. coli* partage 57% d'identité et 79% de similarité avec celle de *P. aeruginosa*. Cette enzyme offre une structure tridimensionnelle originale : un canal hydrophobe s'ouvrant sur un site catalytique dont l'activité est coordonnée par la présence d'un ion zinc. Elle ne possède par ailleurs aucune homologie avec d'autres métallo-enzymes humaines ou animales, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix.

1. Structure de LpxC

La structure tridimensionnelle de LpxC de différentes espèces (*Aquifex aeolicus*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*) a été déterminée en présence d'analogues du substrat dont le TU-514 (Coggins *et al.*, 2003 ; Gennadios *et al.*, 2006), d'imidazole (Gennadios *et al.*, 2006), d'UDP (Buetow *et al.*, 2006), ou de l'enzyme complexée à divers acides gras (Whittington *et al.*, 2003 ; Hernick et Fierke, 2006 ; Shin *et al.*, 2007). Cette structure tridimensionnelle est comparable entre les espèces en dépit de variations au sein de la séquence primaire en acides aminés propres à chacune d'entre-elles. Elle est schématisée figure 8. LpxC est constituée de deux domaines représentés en vert (I et II) comportant chacun de 2 hélices α et 5 feuillets plissés β (4 chez *P. aeruginosa*) assemblés de sorte que les hélices α se trouvent à l'intérieur et les feuillets plissés β à l'extérieur de la protéine. Chaque domaine possède une région d'insertion du substrat orientée perpendiculairement au plan de ses feuillets β . L'insert I (orange) est constitué de trois feuillets plissés β antiparallèles et l'insert II (bleu) d'un motif

$\beta\alpha\alpha\beta$. Ces deux inserts placés du même côté de la protéine forment le site actif de l'enzyme et orientent le substrat vers les deux hélices du domaine I.

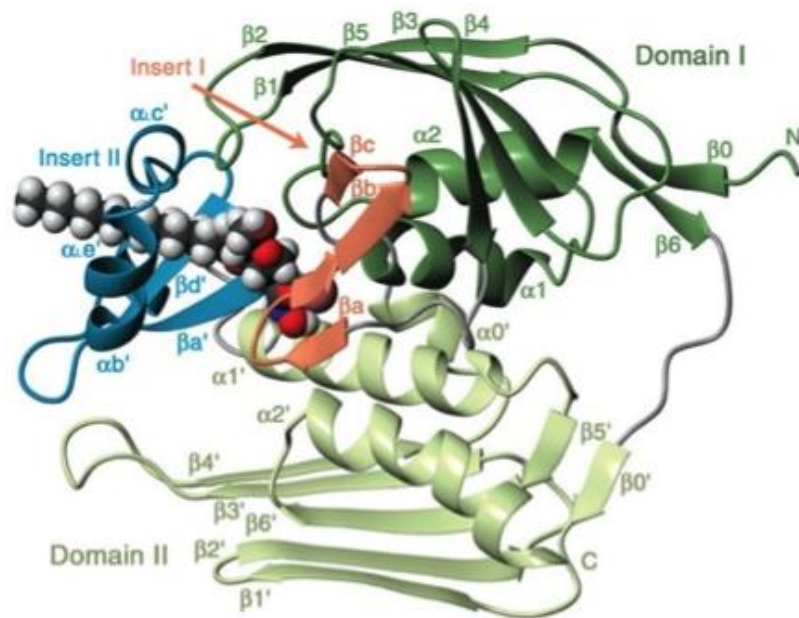


Figure 8 : Structure de l'enzyme LpxC chez *A. aeoliticus* (d'après Coggins *et al.*, 2003)

2. Site catalytique

Les analyses cristallographiques menées sur le site catalytique d' *A. aeoliticus* ont permis de préciser sa structure. Il est constitué de deux parties : un canal hydrophobe menant au site actif. Le canal hydrophobe est dessiné par le motif $\beta\alpha\alpha\beta$ de l'insert II (en bleu figure 8). Il est bordé de résidus ayant une très forte affinité pour la chaîne d'acide gras du substrat représentés figure 9 (Coggins *et al.*, 2003 ; Coggins *et al.*, 2005).

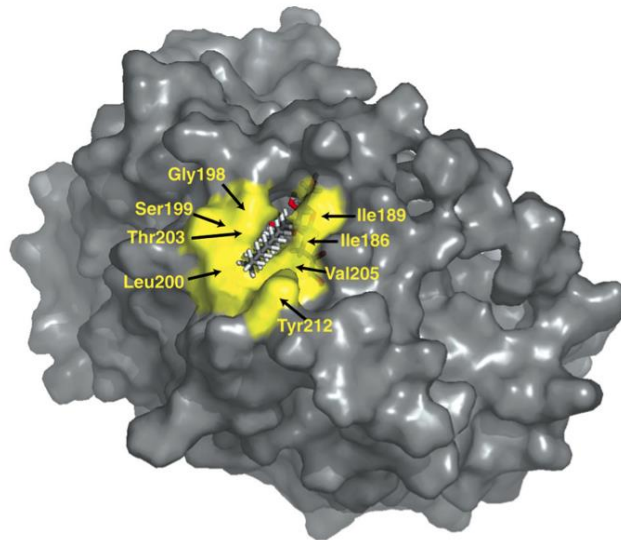


Figure 9 : Le canal hydrophobe de LpxC chez *A. aeoliticus* (d'après Coggins *et al.*, 2003)

Le site actif est une poche, dessinée par les deux inserts, qui maintient le noyau glucosamine (figure 7 p 29) du substrat grâce à des interactions polaires et hydrophobes. Ce site est caractérisé par une séquence de liaison à l'ion Zn^{2+} , un « patch » hydrophobe et un « patch » basique. LpxC possède un motif original HKX(L ou F)D de liaison au zinc qui n'est pas retrouvé chez les autres métalloamidases (Gennadios *et al.*, 2006). Le patch hydrophobe est constitué de trois résidus phénylalanines hautement conservés : Phe155, Phe180 et Phe182 interagissant avec le noyau hexose du substrat (numérotation *A. aeoliticus*). Le « patch » basique, situé à l'opposé du « patch » hydrophobe, comporte une série de résidus chargés positivement Lys227, Arg137, Arg250 et His253 dont le rôle est la neutralisation des deux phosphates de l'UDP du substrat. L'alignement des séquences protéiques de l'enzyme met en évidence la présence de dix résidus hautement conservés au sein du site catalytique, dont des acides aminés de type : His (positions 74, 226 et 253), Glu (position 73) et Asp (positions 230 et 234) (Jackman *et al.*, 2001). Le site liant l'UDP du substrat est également constitué de résidus hautement conservés permettant sa stabilisation grâce à des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes (Buetow *et al.*, 2006). Les acides aminés essentiels à l'activité de LpxC sont représentés figure 10.


```

A.a MGLEKTVKEKLSFEVGIHTGEYSKLI IHPEKEGTGIRFFKNG----VYI PARHEFV VHT
E.c MIKQRTLKRIVQATGVGLHTGKKVTLTLR PAPANTGVIYRRTDLNPPVDFPADAKSVRDT
P.a MIKQRTLKNIIRATGVGLHSGEKVYLTLPAPVDTGIVFCRTDLDPVVEI PARAEENVGET
S.m MIQQRTLKNTIRATGVGLHSGDKVYMTLR PAPVNHGIVFRRVDLDPVVEVPAKAELVTEV
A.b MVKQRTLNRVVKASGIGLHSGQKVMINFI PHTVDGGIVFRRIDLDPVVDIPANALLIQEA
B.c MLKQRTIKSIVKTVGIGVHSGRKEIETLR PAAPGTGIVFSRVLDLPTVVDIPAAATSIGDT
A.x MFRQRSIQNLVRTTGVGVHSGRRVELTLR PAAPNTGIVFHRVDLPEVVDLPAQATGVGDT
          74
          *
A.a NHSTDLGFKGQ-RIKTV EHLIILSVLHLLLEITNVTIEVIGNEIPIILDGSGWEFYEAIRK-NI
E.c MLCTCLVNEHDVRI STVEHLNAALAGLGIDNIVIEVNAPEIPIMDGSAAPFVYLLLDAGI
P.a TMSTTLVK-GDVKVD TVEHLLSAGLGLIDNAYVELSASEVPIMDGSAGPFVFLIQSAGL
S.m TLCTGLTC-NDAKIQTVEHLMSALAGLGVDNIIVELSSAELPIMDGSAGPFVFLIQSAGI
A.b FMCNSLVT-GDIKVG TIEHVMSAIAGLGIDNLIVEVSASEVPIMDGSAGPFYILLMQGGL
B.c RLASVLQK-DGVRVSTVEHLMSACAGLGIDNLYVDVTAEIPIMDGSAATFVFLIQSAGI
A.x RMASVLQQ-GNVRVSTVEHLMSALAGLGIDNLHIDLTAEEVPIMDGSAAATFVYLLRSAGI
          155
          *
A.a LNQNREIDYFVVEEPIIVEDEG----RLIKAEPSDTLEVTYEGE KKNFLGRQKFTFVEGN
E.c DELNCAKKFVRIKETVRVEDGD----KWAEFKPYNGFSLDFTIDFNHPAIDSSNQRYAMN
P.a QEQA AAKKFIRIKREVSVEEGD----KRAVFPFDGFKVSFEIDFDHPVFRGRTQQASVD
S.m VEQDAPKRFIRVLKTV ETEGD----KVARFTPYEGYKLGFTIQFDHPMIPAKQSRQEIE
A.b CEQDAPKRFIKILKPVEALIDD----KKAIFSPHNGFQLNFTIDFDHPAFAKEYQSATID
B.c EEQNAPKRFVVKKTVEIRDGD----KFARLDPYFGFKLKFSIDFRHPAVDKTGQELEVD
A.x VEQNAPKQFIRVLKTV EREGGRNEKWARLEPHEGYALAFSIDSFRHPAIDSTANFAEID
          180   186   198   205   212
          *   *   *   *   *
A.a -----EEIIVLARTFCFDWETIEHIKKVGLGKGGSLKNLVLGKDKVYNPEGLRYNEPV
E.c FSADAFMRQISRARTFGEMRDI EYLQSRGLCLGGSFDCAIVDDYRVLNEDGLRFEDFV
P.a FSSTSFVKEVSRARTFGEMRDI EYLRSQLALGGSVENAIVVDENRVLNEDGLRYEDFV
S.m FSTLAYTKEISRARTFGEMRDI EYMRERNLGLGGSMDNAIVLDEFRVLNEDGLRYADFV
A.b FSTETFVYEVSEARTFGFMKDL DYLKANNLALGASLDNAIGVDDTGVVNEEGLRFADEFV
B.c FANTSYVREIARARTFGFAHEAEMLR EMLLARGGSMENAIIVLDEYRILNNDGLRYDDEFV
A.x FATHSYVREIARARTFGFVNEVEAL RSMGLARGGSLDNAI VMDEYRVLNSDGLRYDDEFV
          226 230 234          253
          *   *   *          *
A.a RHKVFDLIGDLYLLGSPVKGFYSFRGGHSLNVKLVKELAKKQKLTRDLP HPLPSVQAL--
E.c RHKMLDAIGDLFMC GHNIIGAFTAYKSGHALNKKLLQAVLAKQEAW EYVTFQDDAEL-PL
P.a KHKILDAIGDLYLLGN SLIGEFRGFKSGHALNNQLLRTL IADKDAWEV VTFEDARTA-PI
S.m RHKILDAIGDLYLAGGQVLGAYEGFKSGHALNKKLVRALMADASAW EWVSFDSPATPDPV
A.b RHKILDVAGDLYLLGHQII AKFDGYKSGHALNNQLLRNVQSDPSNYEIVTFNDEKDC-PI
B.c KHKMLDAIGDLYVIGHPL LASYTAYKSGHGLNNALLRELLANEDAYEIVTFDDPQAA-PK
A.x KHKILDAIGDLYLLGKPLVARYVACKSGHGLNNQLARALLAQRD AWELVSYESQAEA-PQ

A.a -----
E.c AFKAPSAVLA
P.a SYMRPAAAV-
S.m EYATPAYA--
A.b PYVSVT----
B.c GFAFDAQTAF
A.x AFRHEWQLA-

```

Figure 10 : Aligement des séquences en acides aminés des enzymes LpxC de *A. aeoliticus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *B. cepacia*, *A. xylosoxidans* (NP214214.1 ; BAB96664.1 ; NP253096.1 ; CRX68495.1 ; AJF83452 ; AJP83452 ; KIS49143.1 ; ADP14145.1, respectivement). Les résidus du patch hydrophobe sont surlignés en vert et ceux du canal hydrophobe en rose. Le motif de liaison au zinc est surligné en bleu et les autres acides aminés du site catalytique en jaune. La numérotation est celle d'*A. aeoliticus*.

3. Mécanisme d'action

Bien que le zinc soit le cofacteur naturel de l'enzyme, d'autres cations tels Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} voire Fe^{2+} permettent son activité catalytique (Jackman *et al.*, 1999 ; Gattis *et al.*, 2010). Une activité enzymatique optimale est obtenue pour un ratio métal/protéine de 1. A l'inverse, un excès de zinc conduit à une inhibition de l'enzyme.

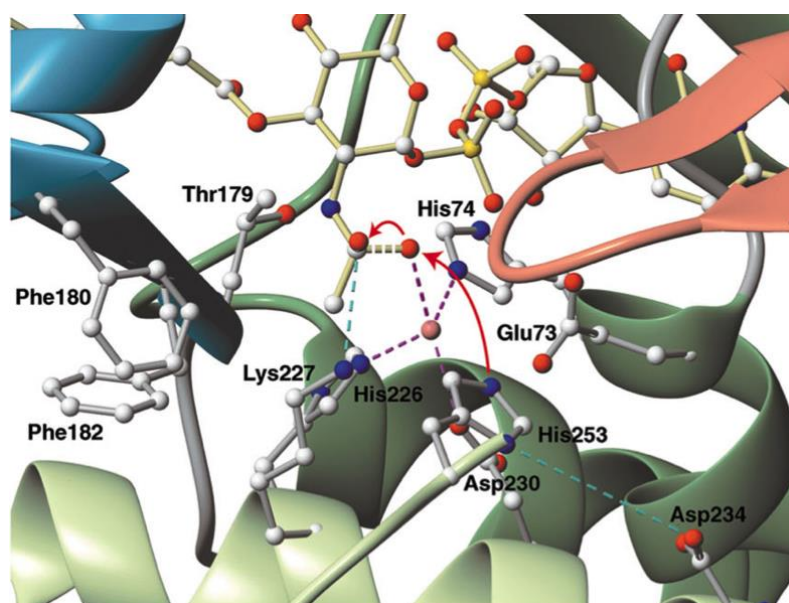


Figure 11 : Le site catalytique de LpxC de *A. aeoliticus* couplée à un analogue synthétique du substrat (d'après Coggins *et al.*, 2005)

Plusieurs schémas catalytiques de LpxC ont été proposés (Mc Clerren *et al.*, 2005 ; Hernick et Fierke, 2005), renforcés par des expériences de mutagenèse dirigée montrant que les résidus Glu73, His253 et Asp234 étaient essentiels à l'activité catalytique de l'enzyme (Jackman *et al.*, 2001 ; Mc Clerren *et al.*, 2005). Les résidus Glu73 et His253 fonctionneraient comme un couple acido-basique et l'Asp234 formerait une liaison hydrogène avec l'His253 essentielle à la coordination de l'ion Zn^{2+} .

4. Régulation

Les synthèses du LPS et des phospholipides membranaires sont co-régulées de façon à maintenir une proportion équivalente de ces deux constituants majeurs de la membrane externe. Ces deux voies de biosynthèses utilisent le même précurseur, le R-3-hydroxymyristoyl-ACP (figure 12). Il a été ainsi observé que la diminution d'expression de LpxC s'accompagnait d'une diminution d'expression de FabZ afin de maintenir l'équilibre entre LPS et phospholipides. Leurs gènes respectifs sont par ailleurs associés au sein du même cluster sur le chromosome bactérien.

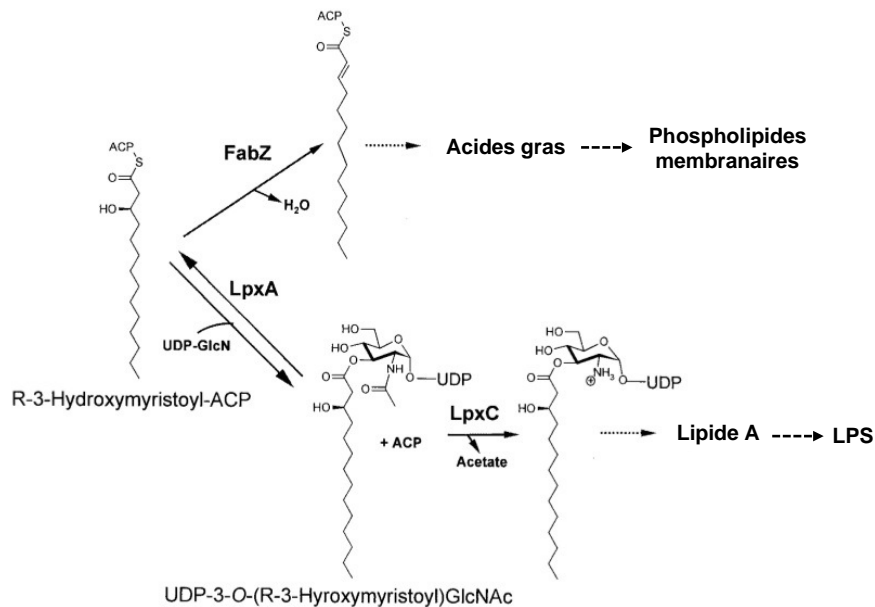


Figure 12 : Précurseurs communs de la voie de biosynthèse du lipide A et des acides gras bactériens (d'après Clements *et al.*, 2002)

Chez les entérobactéries, cet équilibre est sous le contrôle de la protéase FtsH de la famille des AAA (ATPase associated with various cellular activity). Cette métallo-enzyme reconnaît une séquence signal spécifique de type LAXXXXXAVLA, faite de 6 résidus non polaires parmi les 11 derniers acides aminés de la séquence protéique de LpxC, qui est alors dégradée (Langklotz *et al.*, 2011 ; Führer F *et al.*, 2007). Une élévation de la concentration de LpxC est

toxique pour *E. coli* (Sorensen *et al.*, 1996). L'inactivation de la protéase FtsH n'est alors viable qu'en présence d'une mutation conjointe de l'enzyme FabZ conduisant à son hyperactivation ; l'absence de dégradation de LpxC est alors contrebalancée par un emballement de la voie de biosynthèse des phospholipides membranaires (Ogura *et al.*, 1999). La concentration de LpxC est finement régulée : trop faible elle est délétère (Schäkerman *et al.*, 2013), trop élevée elle se montre toxique pour la bactérie (Sorensen *et al.*, 1996).

Compte tenu des variations inter-espèces de la séquence primaire de LpxC, ce mode de régulation n'est pas strictement conservé au sein des BGN. Ainsi, chez *P. aeruginosa*, l'expression enzymatique ne semble pas être régulée par la protéolyse, mais serait sous le contrôle d'un petit ARN localisé dans la région intergénique en amont du gène *lpxC* (Tomaras *et al.*, 2014). Par ailleurs, contrairement aux entérobactéries, une sur-expression de LpxC est mieux tolérée par *P. aeruginosa* (Langklotz *et al.*, 2011). Chez d'autres espèces environnementales à Gram négatif, telles *Agrobacterium tumefaciens* ou *Rhizobium leguminosarum*, LpxC n'est pas dégradé par FtsH mais par la Lon protéase (Langklotz *et al.*, 2011).

III. LES INHIBITEURS DE LPXC

Le rôle central de LpxC, enzyme catalysant la première étape irréversible de la biosynthèse du lipide A qui est un composé majeur impliqué dans l'intégrité membranaire, associé à son absence de similitude avec les protéines eucaryotes, en font une cible antibiotique de choix. Différents radicaux (hydroxamate, phosphinate, carboxylate, thiol ou sulfamide) dédiés à la chélation de l'ion zinc du site actif de LpxC ont été évalués (Pirrung *et al.*, 2002). Le groupe hydroxamate, le plus efficace, a été retenu pour la mise au point de différentes classes d'inhibiteurs par des équipes scientifiques académiques et industrielles. Toutes ces molécules

agissent par inhibition compétitive de l'enzyme mais leur efficacité n'est pas équivalente d'un genre bactérien à l'autre. Plusieurs familles de composés ont été ainsi successivement mises au point : les phényloxazoline-hydroxamates (le L-161,240), les analogues du substrat (le TU-514) et les sulfamides-hydroxamates (le BB-78785). Ces molécules, représentées figure 13, ont été abandonnées en raison d'un spectre d'activité restreint à quelques espèces d'entérobactéries voire en raison de l'absence d'activité antibiotique notamment pour le TU-514. Actuellement, deux familles sont en cours de développement : le CHIR-090 et ses dérivés « LPC » ainsi que les phényl-pyridones (LpxC-4). Tous ont en commun, en plus du groupe hydroxamate (cerclé en bleu), un groupe lipophile (cerclée en violet) destinée à interagir avec les résidus du canal hydrophobe de l'enzyme. Le spectre et les CMI de chaque molécule sont détaillés dans le tableau 1 page 45.

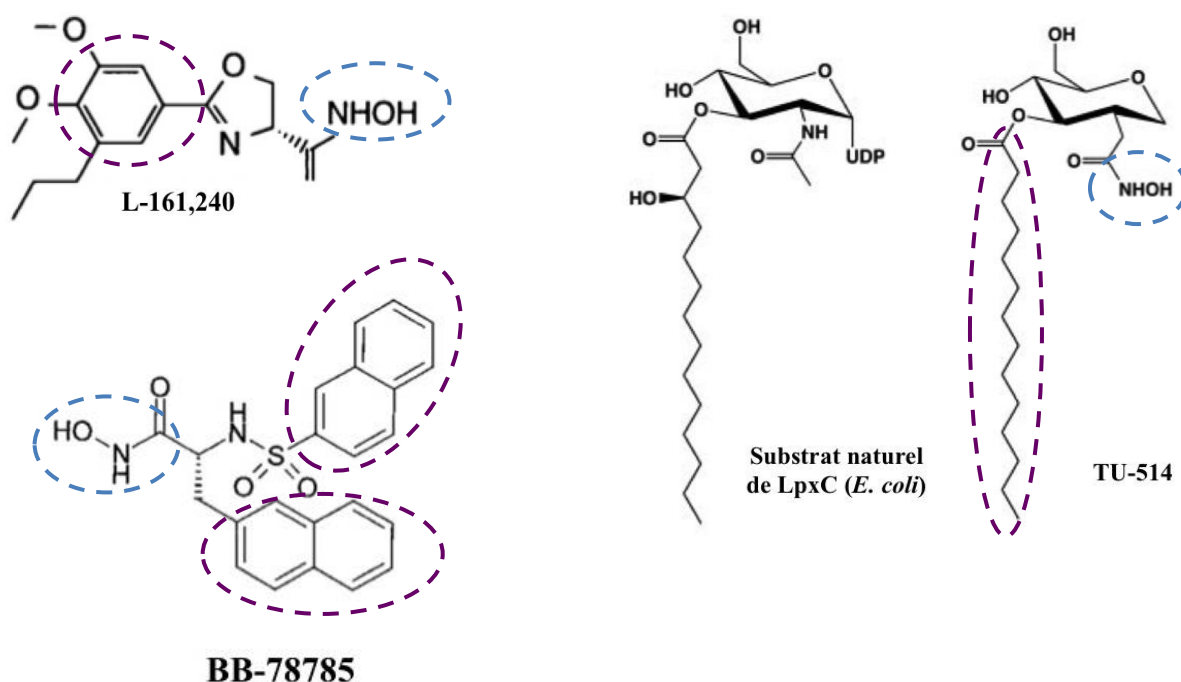


Figure 13 : Structure chimique de différents représentants des phényloxazoline-hydroxamates (le L-161, 240, d'après Onishi *et al.*, 1996), des analogues du substrat (le TU-514, d'après Jackman *et al.*, 2000) et des sulfamides-hydroxamates (le BB-78785, d'après Clements *et al.*, 2002).

1. Les diphényl-acétylènes : le CHIR-090 (Acide N-aryl-L-thréonine hydroxamique)

a. Structure chimique



Figure 14 : Le CHIR-090 (d'après Mc Clerren *et al.*, 2005)

Ce composé est le chef de file d'une série de dérivés évalués dans ce travail de thèse. Il est caractérisé par 3 portions : thréonine-hydroxamate (bleu), biphényl-acétylène (violet) et un cycle morpholine (vert) (figure 14).

b. Mécanisme d'inhibition

Le CHIR-090 est un inhibiteur lent de LpxC qui agit en compétition avec le substrat. Il procède en deux temps (figure 15) : une première étape de fixation rapide et réversible à l'enzyme pour former un complexe Enzyme-Inhibiteur (EI) réversible puis une seconde étape lente, irréversible, temps-dépendante, d'isomérisation du complexe vers un Enzyme Inhibiteur (EI*) inactif. Ce processus d'inhibition est comparable quelle que soit l'espèce étudiée : *A. aeoliticus*, *E. coli* ou *Y. enterocolitica* (Mc Clerren *et al.*, 2005 ; Barb *et al.*, 2007 ; Barb *et al.*, 2007).

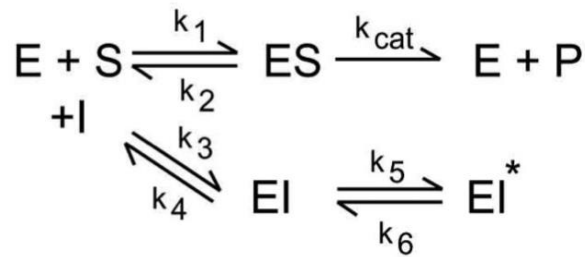


Figure 15 : Mécanisme d'inhibition du CHIR-090 (d'après Barb *et al.*, 2007)

c. Interactions enzyme-inhibiteur

La forme en « L » du CHIR-090 est parfaitement adaptée à celle du site catalytique de l'enzyme et sa structure chimique plus rigide permet une stabilisation des interactions hydrophobes au niveau de l'insert II de l'enzyme. Ces dernières sont à l'origine des propriétés d'inhibition temps-dépendantes du composé. Comparativement aux autres inhibiteurs (L-161-240, BB-78785) un plus large spectre d'efficacité du CHIR-090 s'explique par des interactions avec des résidus hautement conservés de l'enzyme ciblée. Ceux-ci sont présentés ci-après dans un alignement des séquences d'acides aminés des enzymes LpxC d'*A. aeoliticus* et de 14 espèces d'intérêt médical, dont des entérobactéries et des espèces non fermentantes (figure 16).

<i>Yersinia_enterocolitica</i>	SRARTEFGFMRDIEYLRQSRGLCLGGSFDCAIIVDDYR
<i>Yersinia_pestis</i> ^a	SRARTEFGFMRDIEYLRQSRGLCLGGSFDCAIIVDDYR
<i>Escherichia_coli</i> ^b	SRARTEFGFMRDIEYLRQSRGLCLGGSFDCAIIVDDYR
<i>Pseudomonas_aeruginosa</i>	SRARTEFGFMRDIEYLRQNLALGGSVENAIIVDENR
<i>Aquifex_aeolicus</i>	VLARTECFDWEIEHIKKVGLGKGGSLKNTLVLGKDK
<i>Salmonella_enterica</i> ^b	SRARTEFGFMRDIEYLRQSRGLCLGGSFDCAIIVDDYR
<i>Francisella_tularensis</i> ^a	SKARTEGFYEQLAYLHQNNLAKGASLDNAVGVNEG
<i>Helicobacter_pylori</i>	AKARTEGFLOEVNYLRSLGAKGGSLNNAIVLDENS
<i>Rickettsia_prowazekii</i> ^b	ADARTEGFIRDVEYLRKSKGLAQGASFENAIIGIDEHD
<i>Neisseria_meningitidis</i>	ARARTEFGFMEVEMMRAHNLGLGGNLNNAIVIDDTD
<i>Vibrio_cholerae</i> ^b	SRARTEFGFMRDIEYLRQSNLCLGGSFDCAIIVLDDYR
<i>Burkholderia_pseudomallei</i> ^b	ARARTEGFAGHEVEMMRELGLARGGSMDNAIVLDEYR
<i>Burkholderia_mallei</i> ^b	ARARTEGFAGHEVEMMRELGLARGGSMDNAIVLDEYR
<i>Coxiella_burnetii</i> ^b	SRARTEGFVSDYEFIRKNNLALGASLDNAIVLDEYK
<i>Brucella_abortus</i> ^b	STARTEFGFMKVERLWAAGLALGASLDNSLVIGDDN

Figure 16: Alignement des séquences primaires de LpxC (aa 187 à 222 numérotation de *E. coli*). Sont figurés les résidus hautement conservés en bleu et globalement conservés en vert. Les résidus interagissant avec le CHIR-090 sont soulignés (d'après Cole *et al.*, 2011)

Les relations structurales de l'enzyme en présence de cet inhibiteur ont été étudiées grâce aux techniques de RMN chez *A. aeoliticus* et *Y. enterocolitica* avec la mise en évidence d'interactions comparables.

Chez *A. aeoliticus*, le groupe thréonine-hydroxamate interagit via des liaisons hydrogènes avec les résidus Thr179, His253 et Asp230 du site catalytique et via des liaisons de Van der Waals à la Phe180 de l'enzyme (figure 17 gauche). La portion biphenyl-acétylène du CHIR-090 occupe le canal hydrophobe de l'enzyme, le cycle morpholine s'insère quant à lui dans une petite poche hydrophobe latéralisée à l'extrémité du canal (figure 17 droite, d'après Barb *et al.*, 2007).

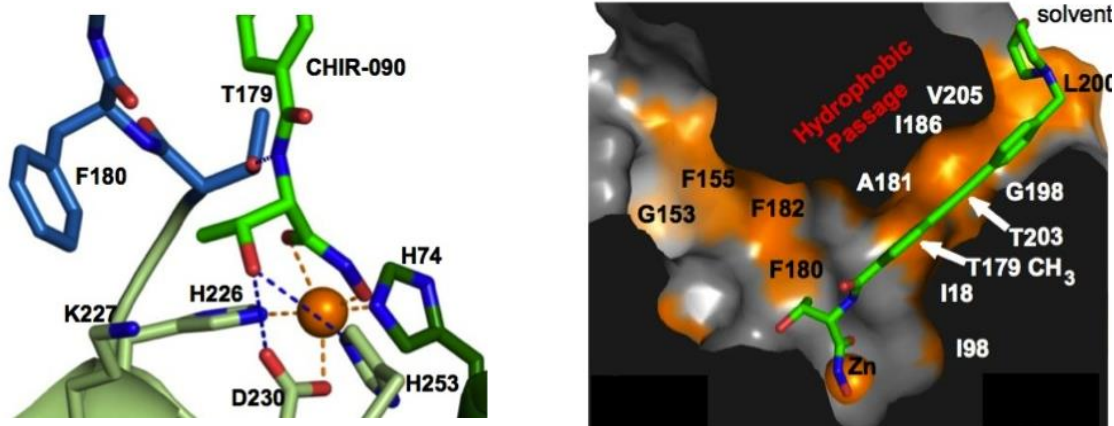


Figure 17 : Interactions du CHIR-090 avec le site catalytique (gauche) et le canal hydrophobe (droite) de LpxC chez l'espèce *A. aeoliticus* (d'après Barb *et al.*, 2007)

d. Activité antibiotique

Le CHIR-090 est le premier inhibiteur actif sur des enzymes purifiées de diverses bactéries à Gram négatif d'intérêt médical : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *N. meningitidis* (Barb *et al.*, 2007 ; Mc Clerren *et al.*, 2005). Son activité antibiotique évaluée en diffusion vis-à-vis de *E. coli* et *P. aeruginosa* s'est avérée comparable à celle de la tobramycine et de la ciprofloxacine (Mc Clerren *et al.*, 2005). Une zone d'inhibition significative était également observée sur des cultures de *Y. enterocolitica* dont la séquence primaire partage 99,7% d'homologie avec celle de *Y. pestis* (Cole *et al.*, 2011). A ce titre, le CHIR-090 représente un antibiotique potentiellement actif contre des espèces communautaires (*E. coli*), nosocomiales (*P. aeruginosa*) voire de la menace bioterroriste (*Y. pestis*). Ce composé demeure néanmoins inefficace sur *A. baumannii*, une autre espèce responsable d'infections nosocomiales.

2. Les phényl-pyridones (LpxC-4)

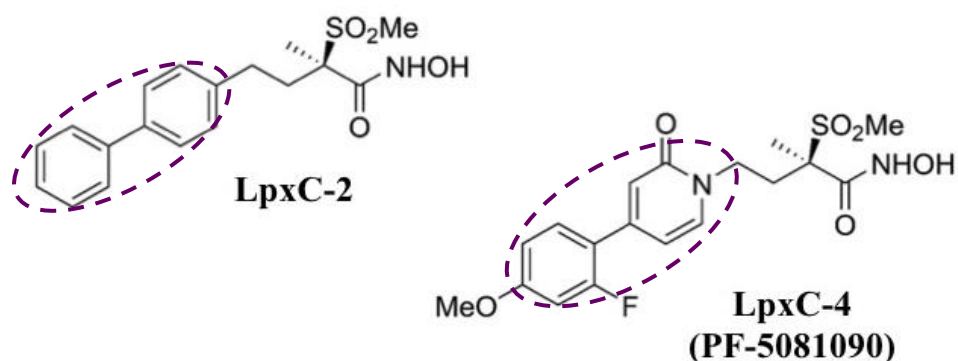


Figure 18 : Le LpxC-2 et le LpxC-4 (d'après Tomaras *et al.*, 2013)

Ces composés sont constitués d'un groupe méthyl-sulfone, d'un cycle pyridone et d'un noyau phényl (portion hydrophobe en violet) auquel est rattaché (LpxC-4) ou non (LpxC-2) un radical méthoxy (en position « para ») et un fluor (en position « ortho ») (Figure 18). Les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) étaient 10 et 3 fois plus faibles pour LpxC-4 que pour LpxC-2 vis-à-vis des enzymes de *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* respectivement. Les CMI₉₀ du LpxC-4 étaient comparables à celles du CHIR-090 sur *E. coli* (79 souches) et *P. aeruginosa* (souche PAO1). L'analyse de la cinétique de bactéricidie du LpxC-4 met en évidence une activité bactériostatique du composé vis-à-vis d'une souche sauvage de *P. aeruginosa* et une souche multirésistante de *K. pneumoniae*. Bien que cette molécule soit un substrat des pompes à efflux, elle offre un spectre d'activité plus large que le CHIR-090 avec des CMI₉₀ basses vis-à-vis de *B. cepacia* et *S. maltophilia*, respectivement de 0,5 et 2 µg/mL (tableau 1 p 45).

3. Les diphényl-diacétylènes (LPC-009 et LPC-011)

a. Structure chimique

Le LPC-009 ou 1,4-diphényl-1,3-butadiyne a été développé à partir du CHIR-090 dont le cycle morpholine distal a été ôté et auquel une fonction acétylène a été ajoutée (figure 19, cercle violet). Le LPC-011 diffère du LPC-009 par l'ajout d'une fonction amine (figure 19, cercle vert) en position para du cycle phényl distal qui le rend plus soluble.

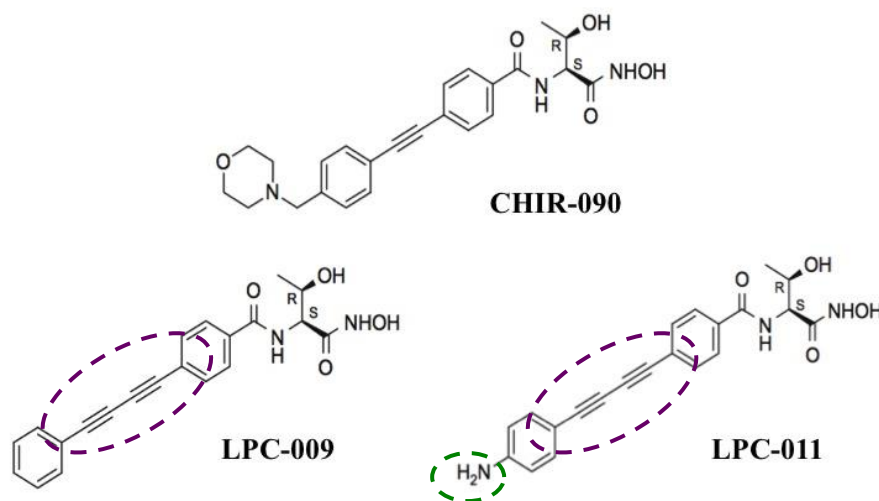


Figure 19 : Structure chimique des CHIR-090, LPC-009 et LPC-011 (d'après Liang *et al.*, 2011)

b. Interaction enzyme-inhibiteur

L'interaction du LPC-009 avec l'enzyme était pratiquement semblable au CHIR-090 dans la partie catalytique de LpxC. La portion hydrophobe de la molécule, plus longue, lui permet d'occuper l'ensemble du canal sans conflit avec les résidus situés à l'extrémité distale de

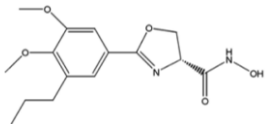
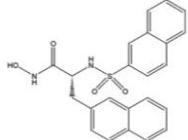
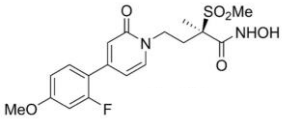
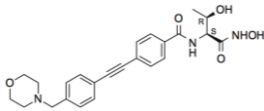
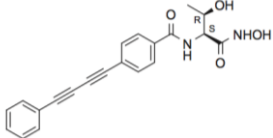
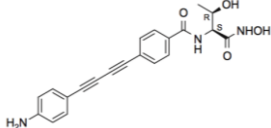
celui-ci, possiblement à l'origine de résistances. La flexibilité du bras diacétylène permet à la molécule d'épouser la conformation d'enzymes de différentes espèces et d'élargir le spectre antibactérien (Faruk Mansoor *et al.*, 2011). L'adjonction d'une fonction amine en position para (LPC-011) favorise les interactions entre le groupe phényle distal du LPC-011 et des résidus du canal hydrophobe (Liang *et al.*, 2011).

c. Activité antibiotique

La CMI du LPC-009 vis-à-vis d'une souche de *E. coli* sauvage exprimant l'enzyme LpxC de *R. leguminosarum* était 20 fois inférieure à la celle du CHIR-090. De même, le LPC-009 montrait une activité antibiotique respectivement 2 à 4 fois plus efficace sur *P. aeruginosa* et *E. coli* (Lee *et al.*, 2011). Le LPC-011 était tout aussi efficace avec des valeurs de CMI discrètement plus basses que celles du LPC-009 (tableau 1 p 45). Toutefois, aucun de ces deux dérivés diacétylènes n'était actif vis-à-vis d'*A. baumannii*.

4. Synthèse

Tableau 1 : Spectre et CMI des différentes molécules de LpxC au regard des données de la littérature (ND : Non déterminé)

Structure	Composé	Espèces sensibles		Espèces résistantes		Références
		Nom	CMI (mg/L)	Nom	CMI (mg/L)	
	L-161,240	<i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i>	1 6	<i>S. marcescens</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i>	>100 >100 50	Onishi <i>et al.</i> , 1996 Lee <i>et al.</i> , 2013
	BB-78485	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. marcescens</i> <i>B. cepacia</i>	1 2 1 1	<i>P. aeruginosa</i>	>100	Clements <i>et al.</i> , 2002 Mochalkin <i>et al.</i> , 2008 Lee <i>et al.</i> , 2013
	LpxC-4 (PF-5081090)	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>B. cepacia</i> <i>S. maltophilia</i>	0,25 1 0,5 0,5 2	<i>A. baumannii</i>	256	Tomaras <i>et al.</i> , 2014 Garcia <i>et al.</i> , 2016
	CHIR-090	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>	0,20 0,64 1,6	<i>A. baumannii</i> <i>B. cepacia</i> <i>S. maltophilia</i>	>64 >64 >64	Mc Clerren <i>et al.</i> , 2005 Barb <i>et al.</i> , 2007 Tomaras <i>et al.</i> , 2014
	LPC-009	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>	0,05 0,10 0,74	<i>B. cepacia</i>	12	Lee <i>et al.</i> , 2011 Liang <i>et al.</i> , 2011
	LPC-011	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>	0,03 0,10 0,5	ND	ND	Liang <i>et al.</i> , 2011 Lee <i>et al.</i> , 2013

IV. LA RESISTANCE AUX INHIBITEURS DE LPXC

1. Résistance naturelle

En plus des espèces naturellement dépourvues de LpxC ou dont l'enzyme n'est pas fonctionnelle (*Leptospira*, *Borrelia*), certaines espèces à Gram négatif ont une affinité moindre pour les inhibiteurs en raison d'une séquence primaire différente de celle de *E. coli* et par conséquent d'une conformation spatiale moins réceptive aux composés.

L'inefficacité des premiers composés mis au point vis-à-vis de *P. aeruginosa* était liée à la structure de l'enzyme elle-même (Mdlui *et al.*, 2006). Des analyses structurales comparant *P. aeruginosa* et *E. coli* ont mis en évidence des variations parmi les résidus actifs du site catalytique, plus profond chez *P. aeruginosa* que chez *E. coli* (4,7-6,3 Å versus 4,4-5,2 Å respectivement) ayant pour conséquence une modification des interactions stériques et électrostatiques de l'enzyme avec l'inhibiteur (Kadam *et al.*, 2007).

Un autre exemple est celui de *Rhizobium leguminosarum*, une espèce environnementale, qui est naturellement résistante au CHIR-090 en raison de la présence en position 214 d'une Sérine en lieu et place d'une Glycine. Cette Ser214 induit une répulsion locale (« clash ») avec le CHIR-090 et, par ailleurs, réduit la largeur du canal hydrophobe pour l'inhibiteur. Ce phénomène explique l'efficacité des molécules LPC-009 et LPC-011 dont le bras hydrophobe est plus long et plus étroit (Barb *et al.*, 2007).

2. Résistance acquise

Les mécanismes régissant la résistance « acquise » aux inhibiteurs de LpxC sont encore imparfaitement connus. Il semble que ceux-ci diffèrent suivant qu'il s'agisse d'entérobactéries ou d'espèces non fermentantes, telle *P. aeruginosa*.

a. Chez les entérobactéries

Ce phénomène a été visualisé dans un premier temps par la présence de colonies d'*E. coli* dans la zone d'inhibition d'un disque chargé avec 50 µg de la forme racémique du L-161,240 (Jackman *et al.*, 2000). Parallèlement, la fréquence spontanée de mutations de *E. coli* vis-à-vis du BB-78484 (8x la CMI) a été déterminée et variait de 4.10^{-8} à 2.10^{-9} en fonction des souches. Les mutants présentaient alors une sensibilité 4 à 64 fois moindre au composé. L'analyse du support génétique de cette résistance a permis de caractériser des mutations au sein du gène *fabZ* (A69V et A78V) qui code l'enzyme homonyme dont le substrat, employé pour la biosynthèse des phospholipides bactériens, est commun à la biosynthèse du lipide A (Figure 12 p35 ; Clements *et al.*, 2002). Chez un seul mutant de *E. coli*, la résistance était la conséquence d'une mutation du gène cible *lpxC* (I38T). Ce même travail entrepris plus tard avec CHIR-090 (Zeng *et al.*, 2013) puis LpxC-4, a confirmé l'implication du gène *fabZ* dans la résistance d'*E. coli* et *K. pneumoniae* à ces composés grâce à l'identification d'autres mutations (respectivement : L17Q, A71V et R121L, P22S, P22L). Ces dernières étaient associées à une diminution de l'activité enzymatique de FabZ corrélée à une diminution de l'activité de LpxC. Une régulation commune de ces deux enzymes par un système à deux composants impliqué dans la réponse cellulaire au stress membranaire (CpxAR) était alors démontrée. Le premier mécanisme de résistance mis en jeu par les entérobactéries vis-à-vis

des inhibiteurs de LpxC est donc une atteinte de la voie de biosynthèse des acides gras via des mutations compensatoires dans le gène *fabZ* (Zeng *et al.*, 2013 ; Tomaras *et al.*, 2014).

D'autres clones résistants au CHIR-090 présentaient des mutations au sein du gène *thrS*. Celui-ci code une ARNt thréonine ligase dont la fonction est majeure au sein de la machinerie de biosynthèse protéique. L'enzyme ThrS n'a aucun rôle dans la biosynthèse membranaire ni ne constitue une cible secondaire du CHIR-090. La substitution d'une Sérine en position 517 par une alanine était associée à une réduction de l'activité enzymatique de ThrS d'un facteur 20. Parallèlement une élévation de la CMI vis-à-vis du CHIR-090 était constatée, probablement en raison d'une diminution globale de la synthèse protéique de la bactérie. Les niveaux de résistance au CHIR-090 conférés par les mutations décrites dans les gènes *fabZ* et *thrS* s'associent de manière additive et indépendante. Ainsi, des mutations isolées au sein de *thrS* ou de *fabZ* élèvent la CMI du CHIR-090 de 8 à 50 fois respectivement, leur association élève la CMI du CHIR-090 d'un facteur 200. Cette observation reste néanmoins isolée dans la littérature.

Ainsi, chez les entérobactéries, la résistance aux inhibiteurs de LpxC repose davantage sur le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité cellulaire (Zeng *et al.*, 2013 ; Tomaras *et al.*, 2014) que sur les mécanismes de résistance classiques rencontrés vis-à-vis des antibiotiques conventionnels comme l'efflux ou la mutation de la cible.

b. Chez P. aeruginosa

Contrairement aux entérobactéries, l'efflux est le premier mécanisme de résistance observé chez *P. aeruginosa*. Les inhibiteurs de LpxC étant très hydrophobes, ils sont des substrats des pompes MexAB-OprM, MexEF-OprN et MexCD-OprJ (Caughlan *et al.*, 2012). La seconde stratégie mise en place par la bactérie consiste en une augmentation de l'expression de la

cible. Celle-ci résulte d'une mutation dans le site putatif de fixation du ribosome, localisée 11 paires de bases (pb) en amont du gène *lpxC* (Caughlan *et al.*, 2012). Cette mutation (C11A) se situe dans une séquence identifiée plus tard comme celle d'un petit ARN impliqué dans la régulation de l'expression de LpxC (Tomaras *et al.*, 2014). De rares mutations ont été mises en évidence au sein du site actif (Tomaras *et al.*, 2014) ; d'autres ont été identifiées au sein du gène *fabG* (fab : fatty acid biosynthesis) impliqué à l'instar de *fabZ* dans la biosynthèse des acides gras bactérien (Ren *et al.*, 2000 ; Hoang *et al.*, 2002 ; Caughlan *et al.*, 2012). Toutefois, l'efflux demeure le principal mécanisme de résistance mis en jeu dans la résistance aux inhibiteurs de LpxC chez *P. aeruginosa*.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Notre travail a consisté en l'évaluation d'inhibiteurs de l'enzyme LpxC dérivés du CHIR-090, composé de référence dans la littérature. Dans un premier temps, leur efficacité a été étudiée sur une gamme de souches cliniques comprenant des entérobactéries et des espèces non fermentantes responsables d'infections nosocomiales et dotées de phénotypes de résistance variés. Nous avons parallèlement étudié l'activité antibiotique de ces inhibiteurs vis-à-vis de *Y. pestis*, une entérobactérie classée parmi les agents de la menace bioterroriste, capable d'acquérir des plasmides de résistance aux antibiotiques habituellement recommandés dans le traitement de l'infection qu'elle occasionne : la peste.

Après avoir démontré l'efficacité des inhibiteurs *in vitro*, le composé le plus actif était retenu et son activité appréciée *in vivo*, dans un modèle murin de peste bubonique, infection généralement fatale en l'absence de traitement efficace.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

La synthèse des composés, l'analyse structurale des interactions enzyme/inhibiteurs (cristallographie et RMN) ainsi que les mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées dans le laboratoire de Biochimie de l'Université de Duke par l'équipe du Pr Zhou (Lee *et al.*, 2016). Notre travail s'est porté sur l'évaluation de l'activité antibiotique des composés *in vitro* et *in vivo*.

I. EXPERIENCES IN VITRO

1. Souches bactériennes

369 souches bactériennes à Gram négatif issues de prélèvements cliniques ont été collectées de manière prospective au sein du Laboratoire de Bactériologie du CHU de Lille. Leur identification était confirmée par spectrométrie de masse (Brüker Daltonics, Wissembourg, France). Un antibiogramme a été réalisé selon les recommandations du CA-SFM (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) permettant de catégoriser le niveau de résistance de chaque souche selon les définitions internationales précisées en annexe 2 page 94 (Magiorakos *et al.*, 2012). Quatre souches multirésistantes ont été utilisées pour la réalisation de courbes de bactéricidie : 2 souches MDR (*E. coli* producteur de BLSE CTX-M-15 et *K. pneumoniae* producteur de carbapénémase KPC-2) et 2 souches XDR (*P. aeruginosa* et *A. baumannii* producteurs de carbapénémases respectivement VIM-1 et OXA-23). Des mutants d'*Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* surexprimant les pompes à efflux AcrAB-TolC, MexAB-oprM/MexCD-OprJ et AdeABC ainsi que leurs souches parentales ont été étudiés. (Dumas *et al.*, 2006 ; Ghisalberti *et al.*, 2005 ; Hamzepour

et al., 1995 ; Marchand *et al.*, 2004). L'ensemble des micro-organismes étudiés ont été conservés à -80°C en bouillon Mueller Hinton (MH) supplémenté avec 10% de glycérol. Les souches de références *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) et *A. baumannii* (ATCC 17978) ont été employées en guise de témoin. Des souches virulentes représentatives des 3 biovars de *Yersinia pestis*, Orientalis, Medievalis et Antiqua ont été utilisées et manipulées dans le laboratoire de type NSB3 du laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHU de Lille ou dans celui de l'Institut Pasteur de Lille.

2. Antibiotiques et anti-LpxC

Tous les inhibiteurs de LpxC évalués (CHIR-090, LPC-011, LPC-058, LPC-087, LPC-069) ont été synthétisés par le laboratoire de Chimie de l'Université de Duke et sont représentés figure 20. Des poudres titrées de céfotaxime, ceftazidime, imipénème, ciprofloxacine et amikacine (Sigma-Aldrich, Lyon, France) ont été reconstituées selon les recommandations du fournisseur. Les solutions stock d'antibiotiques et d'anti-LpxC solubilisées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) étaient conservées à -80 °C jusqu'à utilisation. Pour les tests *in vivo*, compte tenu de la toxicité du DMSO, des solutions de cyclodextrine HBP (Hydroxypropyl beta-cyclodextrin, Laboratoire Roquette, Lestrem, France) à 20% en concentration finale ont été utilisées pour solubiliser les LPC-058 et LPC-069.

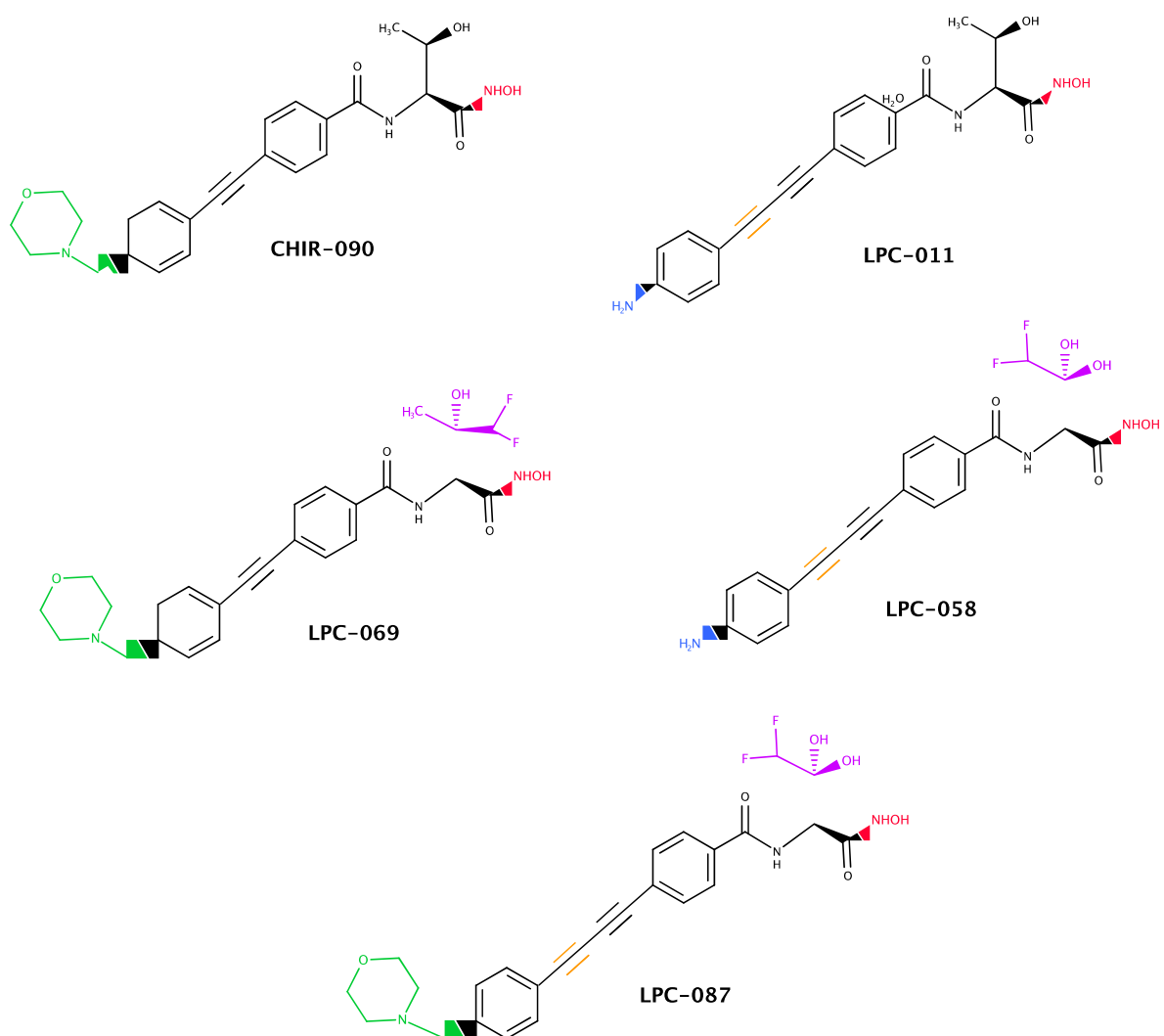


Figure 20: Structure chimique du CHIR-090 et de ses dérivés évalués dans ce travail de thèse. Le groupe hydroxamate dédié à la chélation de l'ion zinc de l'enzyme apparaît en rouge. Les différentes substitutions fluorées des groupes interagissant avec le site actif sont figurées en violet. La double liaison acétylène est surlignée en orange. Le groupe morpholine et la fonction amine situés à l'extrémité du bras hydrophobe sont respectivement rehaussés en vert et bleu.

3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI des inhibiteurs de LpxC ont été déterminées en milieu gélosé selon les recommandations du NCCLS (NCCLS 2000). Des concentrations croissantes d'inhibiteurs de 0,008 mg/L à 64 mg/L ont été ajoutées à de la gélose en surfusion. 10^4 UFC de chaque souche ont été déposées grâce à un appareil de Steers, trois souches ATCC (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 17978) étaient associées à chaque expérience en guise de témoin. La CMI des antibiotiques conventionnels était déterminée en milieu liquide selon des gammes de 0,008 à 1024 mg/L. La valeur retenue était la concentration d'antibiotique la plus faible inhibant toute croissance bactérienne visible.

4. Etude de la cinétique de bactéricidie

La cinétique de bactéricidie du LPC-058 a été évaluée vis-à-vis de souches multirésistantes de *E. coli* productrices de BLSE (CTX-M-15), de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* productrices de carbapénémases respectivement KPC-2, VIM-1 et OXA-23. Un inoculum bactérien de 5.10^5 UFC/mL en phase exponentielle de croissance de chaque souche était incubé en absence (témoin) ou en présence de différentes concentrations de LPC-058 seul (1 à 8 fois la CMI) ou en association (0,25 à 1 fois la CMI) à des concentrations sub-inhibitrices de céfotaxime, ceftazidime, d'imipénème, de ciprofloxacine ou d'amikacine, possiblement atteignables *in vivo*. Les suspensions étaient incubées à 37°C sous agitation, pendant 24 heures. A différents temps (0, 3, 6, 9 et 24 h) des aliquots de chaque suspension étaient prélevés, dilués de manière sériée et ensemencés en triplicate sur gélose au pourpre de bromocrésol (BCP - Biomérieux, Marcy L'Etoile, France). Les cinétiques de bactéricidie des LPC-058 et LPC-069 à des concentrations variant de 1 à 8 fois la CMI ont été également

appréciées vis-à-vis de *Y. pestis* CO92 et comparées à celle de la doxycycline à une concentration de 0,5 mg /L (soit la valeur de la CMI) dans le milieu de culture. Les suspensions étaient incubées à 28°C sous agitation pendant 24 heures. Des aliquots étaient prélevés à 0, 3, 6, 9 et 24 heures, dilués et ensemencés sur géloses au sang (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France). Les bactéries survivantes étaient dénombrées sur chacune des 3 boîtes au terme de 24 heures d'incubation à 37 °C ou 48 heures d'incubation à 28°C pour *Y. pestis*. Le nombre moyen de bactéries était exprimé en \log_{10} UFC/mL. La bactéricidie était définie comme une diminution de 3 \log_{10} UFC/mL du nombre de bactéries par rapport à l'inoculum de départ. La synergie et l'indifférence étaient définies par une diminution de l'inoculum (\log_{10} UFC/mL) respectivement $\geq 2 \log_{10}$ et $< 2 \log_{10}$ de l'association par rapport à la molécule seule après 24 h d'incubation. Chaque expérience était reproduite au moins deux fois. La limite de détection était $\leq 1,3 \log_{10}$ UFC/mL.

5. Détermination de la fréquence spontanée de mutation

La fréquence de mutation vis-à-vis du LPC-058 a été déterminée sur des souches sauvages de *E. coli* ATCC 27922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Y. pestis* KIM6. Les bactéries étaient cultivées en bouillon MH en agitation à 37 °C jusqu'en phase exponentielle puis centrifugées et concentrées 100 fois. 200 μ L de chaque suspension était étalés sur des géloses MH supplémentées en LPC-058 de 2 à 8 fois la CMI. Des dilutions sériées de ces suspensions étaient parallèlement réalisées, étalées sur géloses BCP (*E. coli* et *P. aeruginosa*) ou au sang (*Y. pestis*). Un dénombrement des colonies de *E. coli* et *P. aeruginosa* était réalisé après 24 h d'incubation à 37 °C, les colonies de *Y. pestis* étaient dénombrées après 48 h d'incubation à 28°C. La fréquence de mutation était calculée en divisant le nombre de colonies identifiées sur gélose supplémentées par l'inoculum initial.

6. Sélection de mutants résistants par la méthode des passages successifs

Des gammes croissantes de concentrations de LPC-058 et LPC-069 étaient réalisées en milieu liquide. Une culture liquide contenant $5 \cdot 10^5$ UFC/mL de *E. coli* ATCC 27922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Y. pestis* KIM6 était mise en contact avec une série de dilutions de raison deux, variant de 0,008 à 8 mg/L de LPC-058 ou de LPC-069. Après 24 h d'incubation à 37 °C (*E. coli* et *P. aeruginosa*) et 28°C (*Y. pestis*), la CMI initiale était déterminée et nommée passage 0. De ce passage, 20 µL (*E. coli* et *P. aeruginosa*) ou 50 µL (*Y. pestis*) du dernier tube présentant une croissance bactérienne visible (0,5 x CMI) était prélevé et mis en présence de la même série de dilution d'échelle géométrique du même composé. La CMI de la souche mutante vis-à-vis du composé sélectionnant était déterminée. Ces transferts ont été effectués pendant 12 jours successifs en suivant le même protocole. Les suspensions bactériennes utilisées pour chaque passage étaient parallèlement conservées en bouillons glycérolés à -80°C.

7. Séquençage des gènes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de LpxC

L'ADN des suspensions bactériennes obtenues au terme du 12^{ème} passage en présence de LPC-058 et de LPC-069 ainsi que celui des souches parentales a été extrait selon le protocole Nucleospin® (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Des réactions d'amplifications géniques (PCR) puis de séquençage ciblant les gènes *lpxC* et sa région promotrice, *fabZ*, *fabG* (*P. aeruginosa*) et *thrS* ont été réalisées au moyen des amorces présentées tableau 2. Les séquences étaient analysées avec le logiciel ApE.

Tableau 2: Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour les réactions d'amplification et de séquençage des gènes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de LpxC.

Gène	Espèce	Amorce	Séquence	Taille	T°C hybridation
<i>fabZ</i>	<i>Ec</i>	FfabZ Ec1	CAAGCGTCTGAAATCGCTT	757 pb	55 °C
		RfabZ Ec1	GACAACGTGAGATTTTCAGTACG		
	<i>Yp</i>	FfabZ Yp1	AACTGCCGCTCTAGTGATGA	852 pb	55 °C
		RfabZ Yp1	GCCCAATATAAACACCAGCGC		
	<i>Pa</i>	FfabZ Pa1	CCTGGCTGCCGTGACCTCAA	626 pb	55 °C
		RfabZ Pa1	TCCAATTCCGCCCCGACGAT		
<i>fabG</i>	<i>Pa</i>	FfabG Pa1	TTCCACGGCCACTTCGATA	515 pb	55 °C
		RfabG Pa1	ACACCAACCTGAACAGTCTCT		
		FfabG Pa2	TTGGTTTGCCCGGCATTG	554 pb	55 °C
		RfabG Pa2	GCGCGAAGGGCATCAA		
<i>thrS</i>	<i>Ec</i>	FthrS Ec1	TCTTTGTATGTGATCTTTCGTGTGGGTC	776 pb	55 °C
		RthrS Ec1	CGTTTCGCGGCTTCTTCCAGG		
		FthrS Ec2	CGTGCGACAGCAACAACAAAA	685 pb	55 °C
		RthrS Ec2	CCCACATTTTCGTCTGCTGCCA		
		FthrS Ec3	CTTCGAGAAGATCGTCGTCAAACCTCTCC	729 pb	55 °C
		RthrS Ec3	CGCGCCGTTTGAACCTCGTTTT		
	<i>Yp</i>	FthrS Yp1	GAGGGTCACCACTGCAGATAAGGAATT	658 pb	55 °C
		RthrS Yp1	TGTCGCCACGCCAATAAGCAC		
		FthrS Yp2	TTGATATGTGCCGTGGTCCGC	736 pb	55 °C
		RthrS Yp2	GGGCGGGTAGAGAGTTTGACGACA		
		FthrS Yp3	GAAGAGCAAGTCCGTGATGAAGTAAACA G	804 pb	55 °C
		RthrS Yp3	ATTAGGACGCGCCGGTTGAACT		
	<i>Pa</i>	FthrS Pa1	CGACGCTTACTGGCACATCC	773 pb	55 °C
		RthrS Pa1	GATGCGCTGGATGTAGGCCG		
		FthrS Pa2	CAACGCATCTACGGCACCCGC	819 pb	57 °C
		RthrS Pa2	GTTCGGTTCGTACTGCAGGGTG		
		FthrS Pa3	ACTGCCTCGGCCGTAAC	549 pb	55 °C
		RthrS Pa3	GCTCGCTTATCCTGTCTCA		
<i>lpxC</i>	<i>Ec</i>	FlpxC Ec1	CAAACCTGCGAAAGAGCCG	678 pb	55 °C
		RlpxC Ec1	CGCTGGTTGCTGGAATCA		
		FlpxC Ec2	GAAGATGGCGATAAGTGGGCTGAA	554 pb	55 °C
		RlpxC Ec2	AGAGAGTGCCAGATTTGCCAGTCG		
	<i>Yp</i>	FlpxC Yp1	TTATTTGGACATCCCGGCGTTTT	679 pb	55 °C
		RlpxC Yp1	GGCCGAGAAATCTAAGCAATAACGC		
		FlpxC Yp2	AGTACACAGCGTTATTGCTTAGATTTCTCG GC	487 pb	55 °C
		RlpxC Yp2	TTCTGTTCGTTTCGCTGTCTGGCTAC		
	<i>Pa</i>	FlpxC Pa1	TGAACCCGCAGGATGACC	604 pb	55 °C
		RlpxC Pa1	GCTTGTCGCCCTCTTCCA		
FlpxC Pa2		CCAAGAAGTTCATCCGCATCAAGC	570 pb	55 °C	
RlpxC Pa2		GTGGCCTCAAATATGGAAAGGAGA			

II. EXPERIENCES IN VIVO

1. Animaux

Toutes les expériences animales ont été menées dans le respect de la directive 86/609/CEE avec des souris femelles OF1 âgées de 8 à 10 semaines (Charles River, France), au sein de l'animalerie centrale SOPF (specific and opportunistic pathogen free) ou de l'animalerie de confinement NSB3 de l'Institut Pasteur de Lille.

2. Détermination des paramètres pharmacocinétiques du LPC-058 et du LPC-069

Une évaluation préalable de la stabilité métabolique du LPC-058 et du LPC-069 a été effectuée en présence de microsomes hépatiques de souris afin de vérifier la stabilité de ces molécules face aux réactions d'oxydation (réaction de phase I hépatique). Cette étude a été effectuée par le pôle de recherche interdisciplinaire pour le médicament (PRIM) de la faculté de Pharmacie de Lille. Dans le cadre de l'étude pharmacocinétique, 30 souris ont reçu par voie intraveineuse une dose unique de 20 mg/kg de LPC-058 ou de 40 mg/kg de LPC-069 solubilisés dans la cyclodextrine HBP à 10 mM. Après injection, le sang de trois souris anesthésiées par isoflurane a été ponctionné par voie intracardiaque à 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240 et 480 minutes. Les concentrations plasmatiques de LPC-058 et de LPC-069 ont été quantifiées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), déterminant ainsi la demi-vie, la clairance, le volume de distribution et l'aire sous la courbe de chaque molécule. Ces dosages ont également été réalisés par le PRIM.

3. Etude des effets indésirables de la molécule de LPC-058 et LPC-069 en administrations répétées

Des groupes de 10 souris ont reçu pendant 5 jours, par voie intra-veineuse (IV), soit 10 mg/kg q8h, 20 mg/kg q12h ou 40 mg/kg q12h de LPC-058, soit 20 mg/kg q12h, 40 mg/kg, 100 mg/kg ou 200 mg/kg q8h de LPC-069, soit l'excipient seul (cyclodextrine HBP) pour le groupe témoin. Les souris ont été surveillées quotidiennement pendant la durée du traitement. A ce terme, les animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane puis sacrifiés pour procéder aux analyses sanguines biologiques et anatomopathologiques comparatives. Sur le plan biologique, une numération-formule sanguine (automate Sysmex XS 800xi, Laboratoire Sysmex, Villepinte, France), les dosages de la natrémie, la kaliémie, la chlorémie, de la protidémie, de l'urémie, de la bilirubinémie, et les enzymes hépatiques glutamate pyruvate transaminase, phosphatases alcalines, γ -glutamyl transférase (automate COBAS 8000, Roche diagnostics, Meylan, France) ont été réalisés et analysés pour apprécier le retentissement du LPC-058 et LPC-069 sur les fonctions hématopoïétique, rénale et hépatique. Des coupes anatomopathologiques du foie, des poumons, du rein, du cerveau et du colon ont été également analysées chez les souris traitées et témoins. Enfin, un examen bactériologique des selles a été réalisé à différents temps du traitement afin d'évaluer le retentissement de chaque traitement sur la flore digestive des souris.

4. Etude de l'effet protecteur du traitement par LPC-058 et LPC-069 dans un modèle de peste bubonique

Des groupes de 15 souris ont été inoculés par voie intradermique en haut de la cuisse droite avec 100 CFU de la souche de *Y. pestis* CO92 préalablement incubée à 21°C. Dix-huit heures

après l'infection, les souris recevaient ou non (groupe témoin) un traitement par anti-LpxC pendant 5 jours. Plusieurs posologies ont été évaluées : 10 mg/kg q8 h IV, 20mg/kg q12h IV et 40 mg/kg q12h IV de LPC-058, 40 mg/kg q8h IV, 200 mg/kg q8h IV de LPC-069. A titre comparatif, d'autres souris étaient traitées par de la doxycycline, molécule de référence dans le traitement de la peste, à la posologie de 50 mg/kg q12h. Les souris étaient surveillées deux à trois fois par jour pendant la durée du traitement, puis quotidiennement 5 à 15 jours supplémentaires après l'arrêt du traitement. Une courbe de survie a été établie sur cette période de 10 jours à l'issue de laquelle les animaux survivants ont été sacrifiés. Le sang, la peau, le ganglion drainant le site de l'injection et la rate des souris survivantes ont été prélevés, homogénéisés dans 3 mL de TPS, puisensemencés sur gélose au sang. Après incubation 48 h à 28°C, les colonies ont été dénombrées et exprimées en \log_{10} UFC/organe. La limite de détection était de $\leq 1,3 \log_{10}$ UFC/mL.

5. Analyse statistique

Les moyennes des valeurs des paramètres sanguins obtenus dans l'étude de la survenue d'effets indésirables ont été comparées par un test de Mann et Whitney. Les courbes de survie des animaux témoins et traités ont été comparées par un test du log-rank. Les différences étaient considérées comme significatives pour une valeur de $p < 0,05$. Le logiciel GraphPad Prism version 6.0 a été utilisé pour effectuer l'ensemble des analyses.

RESULTATS

I. APPORT DE LA RMN DANS LA MISE AU POINT DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LpxC

Cette étude est à l'origine de l'élaboration de nouveaux composés dont l'activité antibiotique a été étudiée dans ce travail de thèse. Cette analyse fondamentale des interactions enzyme-inhibiteur a permis de comprendre leur dynamique et d'optimiser en conséquence la structure chimique des dérivés du LPC-011, l'une des molécules les plus actives exposée préalablement (III.3 p 41).

1. Résumé de l'article

Dans la littérature, l'analyse des interactions protéiques complexes repose souvent sur des données cristallographiques statiques. Cette technique a été notamment employée pour l'étude des interactions de l'enzyme LpxC avec des analogues du substrat et avec des inhibiteurs synthétiques (Mochalkin *et al.*, 2008 ; Barb *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2011 ; Liang *et al.*, 2011 ; Cole *et al.*, 2011). L'objectif de ce travail est d'associer à ces interactions la notion de dynamique conformationnelle et d'introduire ce principe dans la mise au point de nouveaux inhibiteurs de LpxC. Dans ce contexte, la RMN est un outil de choix qui permet d'accéder à des conformations alternatives des molécules en solution et complète l'approche cristallographique solide. Ainsi, l'analyse des interactions LpxC/LPC-011, plus particulièrement des interactions de la fonction thréonyle-hydroxamate du LPC-011 avec le site actif de l'enzyme par ces deux techniques a permis d'objectiver un état conformationnel majeur confirmé par la cristallographie et deux rotamères mineurs en RMN. L'amplitude décrite par ces trois conformations dessine les contours d'une « poche dynamique », structure plus vaste autour du carbone en position β (C β) du groupe thréonyle-hydroxamate, offrant

d'autres interactions avec le site actif. Ce constat a conduit à la mise au point de deux dérivés dotés d'une triple substitution du C β (LPC-037 et LPC-040) associée à un pouvoir d'inhibition enzymatique accru (comparativement au LPC-011). De la même manière, deux autres « poches » d'interactions virtuelles avec le site catalytique ont été mises en évidence en faisant varier la substitution du carbone en position γ (C γ) du groupe thréonyle-hydroxamate. Ces résultats ont conduit à la substitution du C γ du LPC-037 par deux (LPC-058) et trois atomes de fluor (LPC-083). Sur le plan enzymatique, le LPC-058 était nettement plus actif que le LPC-083 et présentait une constante d'inhibition (K_i) quatre et sept fois moindre que les LPC-037 et LPC-011 respectivement. Parallèlement, son activité antibiotique était marquée par des valeurs de CMI jusqu'à 25 et 100 fois inférieures à celles du LPC-011 et du CHIR-090 respectivement. Le LPC-058 est également le premier composé actif vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii*, espèce impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales. Cette étude démontre en outre l'intérêt de la RMN dans l'analyse de la dynamique des interactions enzyme/ligand et ouvre des applications thérapeutiques.

2. Article

Ce travail a fait l'objet d'une publication présentée en annexe 3 p 96 :

Lee C-J, Liang X, Wu Q, Najeeb J, Zhao J, Gopaldaswamy R, **Titecat M**, Sebbane F, Lemaître N, Toone EJ, Zhou P. Drug design from the cryptic inhibitor envelope. Nat Commun. 25 févr 2016;7:10638.

II. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE DES INHIBITEURS DE LPXC VIS-A-VIS DE SOUCHES RESPONSABLES D'INFECTIONS NOSOCOMIALES

Lors de sa mise au point, l'activité antibiotique du LPC-058 a été évaluée vis-à-vis d'un nombre limité d'espèces à Gram négatif représentatives des pathogènes rencontrés en Bactériologie médicale. Au delà de valeurs de CMI plus faibles que celles du composé princeps (CHIR-090) et de son dérivé le plus actif (LPC-011), le LPC-058 est le premier inhibiteur actif sur *A. baumannii*. Le premier objectif de notre travail était ici d'évaluer l'activité du LPC-058 vis-à-vis d'une gamme plus large de souches à Gram négatif, comprenant des souches multi- et ultra-résistantes, productrices de BLSE et de carbapénémases, et de la comparer à celle de trois autres dérivés : le CHIR-090 (molécule de référence), le LPC-011 qui diffère du LPC-058 par l'absence de substitution difluorée du groupe phényl-hydroxamate, et le LPC-087 semblable au LPC-058 dans sa portion proximale mais qui s'en distingue par l'ajout d'un cycle morpholine à l'extrémité distale. Le second objectif était d'apprécier l'activité du composé le plus efficace en association avec des antibiotiques conventionnels sur des souches ultra-résistantes.

1. Résumé de l'article

Les CMI des quatre inhibiteurs ont été déterminées vis-à-vis de 369 souches d'origine clinique (234 entérobactéries et 135 souches non fermentantes). Dans le cas des entérobactéries, les valeurs des CMI₉₀ variaient entre 0,12 mg/L (LPC-058) et 2 mg/L (CHIR-090). La CMI₉₀ du LPC-087 était comparable à celle du CHIR-090 vis-à-vis de *P. aeruginosa* mais était quatre à huit fois plus élevée que celle des LPC-011 et LPC-058 respectivement.

L'activité globale de ces molécules vis-à-vis des entérobactéries et de *P. aeruginosa* s'ordonnait de manière croissante : CHIR-090 < LPC-087 < LPC-011 < LPC-058. Elle n'était pas influencée par le phénotype MDR ou XDR des souches testées. En revanche, le LPC-087 et le CHIR-090 étaient plus sensibles à l'efflux que le LPC-011 et le LPC-058. Les deux composés présentant des substitutions fluorées étaient actifs sur *A. baumannii* (LPC-058 et LPC-087) alors que seuls les composés dont la portion biphenyle-diacétylène n'était pas substituée étaient actifs sur *B. cepacia* (LPC-058 et LPC-011). Le LPC-058 était le plus efficace au regard des valeurs basses de CMI observées et de son large spectre d'activité. Nous avons ensuite analysé la cinétique de bactéricidie de ce composé sur des souches MDR et XDR, productrices de BLSE ou de carbapénémases. Celui-ci était bactéricide vis-à-vis de souches de *E. coli* et *K. pneumoniae* MDR, de *P. aeruginosa* XDR mais bactériostatique vis-à-vis d'*A. baumannii* XDR. L'association du LPC-058 à des concentrations sub-inhibitrices de β -lactamines, d'aminosides et de fluoroquinolones était synergique sur ces mêmes souches.

2. Article

Ce travail a fait l'objet d'une publication présentée en annexe 4 p 139 :

Titecat M, Liang X, Lee C-J, Charlet A, Hocquet D, Lambert T, et al. High susceptibility of MDR and XDR Gram-negative pathogens to biphenyl-diacetylene-based difluoromethyl-allo-threonyl-hydroxamate LpxC inhibitors. J Antimicrob Chemother. 20 juin 2016;dkw210.

III. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE DES INHIBITEURS DE LPXC VIS-A-VIS DE *YERSINIA PESTIS*

1. In vitro

a. Détermination des CMI des inhibiteurs de LpxC vis-à-vis de *Y. pestis*

Nous avons tout d'abord évalué le LPC-058, le plus efficace vis-à-vis des souches nosocomiales multirésistantes précédemment étudiées, et l'avons comparé au CHIR-090 *in vitro* vis-à-vis de souches représentatives des 3 biovars de *Y. pestis* (Antiqua, Medievalis et Orientalis). Le LPC-058 présentait des CMI jusqu'à 32 fois moindres que le CHIR-090 (tableau 3). En vue d'une administration *in vivo*, nous avons réitéré la détermination de ces CMI à 28°C (température de croissance optimale de la souche) et 37°C (température du mammifère), en l'absence et en présence d'albumine de sérum bovin (ASB) dans le milieu de culture afin d'évaluer sommairement une éventuelle fixation protéique de la molécule. Ces CMI étaient 4 fois plus basses à 37°C qu'à 28°C mais s'élevaient significativement (jusqu'à 64 fois) en présence de ASB, à température équivalente (tableau 4). La même démarche expérimentale a été observée avec le LPC-087, un autre dérivé diphényl-diacétylène étudié précédemment, mais nous nous sommes heurtés au même phénomène (données personnelles). Nous nous sommes alors tournés vers une autre molécule, caractérisée par une structure proximale comparable à celle du LPC-058, une seule liaison acétylène et une extrémité distale semblable au CHIR-090 : le LPC-069 (figure 20 p 53). Le LPC-069 présentait des valeurs de CMI 2 à 4 fois moindres que celles du CHIR-090 mais environ 10 fois plus élevées que le LPC-058 sur l'ensemble des souches testées (tableau 3). Ces valeurs n'étaient pas ou peu influencées par la présence d'ASB dans le milieu, suscitant notre intérêt pour la poursuite de notre étude (tableau 4).

Tableau 3 : Valeurs des CMI du CHIR-090, du LPC-058 et du LPC-069 observées vis-à-vis de souches représentatives des biovars (b.v.) de *Y. pestis* et comparées à *E. coli*

Composé		<i>Y. pestis</i> ^a						<i>E. coli</i> ^b ATCC 27922
		b.v. Antiqua		b.v. Medievalis		b.v. Orientalis		
		Nairobi	JHUPRI	14-47	KIM6+	CO92	195/P	
CHIR-090	CMI (mg/L)	0.8	0.8	1.6	0.8	1.6	1.6	0.2
LPC-058	CMI (mg/L)	0.025	0.05	0.1	0.05	0.05	0.05	0.025
LPC-069	CMI (mg/L)	0.2	0.4	0.8	0.4	0.8	0.4	0.1
Ratio ^c		x 4	x 2	X 2	x 3	x 2	x 4	x 2

^a, *Y. pestis* était incubée à 28°C; ^b, *E. coli* était incubé à 37°C; ^c, les ratio ont été obtenus en divisant la CMI du LPC-069 par celle du CHIR-090

Tableau 4 : Valeurs des CMI des LPC-058 et LPC-069 déterminées sur la souche *Y. pestis* CO92 en milieu liquide à 28°C et à 37°C en présence et en l'absence de ASB (2% final). Les ratios des CMI du LPC-069 / CMI du LPC-058 (a) ainsi que le ratio des CMI à 28°C / CMI à 37°C (b) ont été déterminés.

Milieu	Température	CMI (mg/L)		
		LPC-058	LPC-069	Ratio ^a
MH	28°C	0.1	0.8	x 8
	37°C	0.025	0.1	x 4
	Ratio ^b	x 4	x 8	
MH+ASB	28°C	1.6	1.6	x 1
	37°C	1.6	0.4	x 0.25
	Ratio ^b	x 1	x 0.25	

b. Détermination de la cinétique de bactéricidie des inhibiteurs de LpxC
vis-à-vis de *Y. pestis*

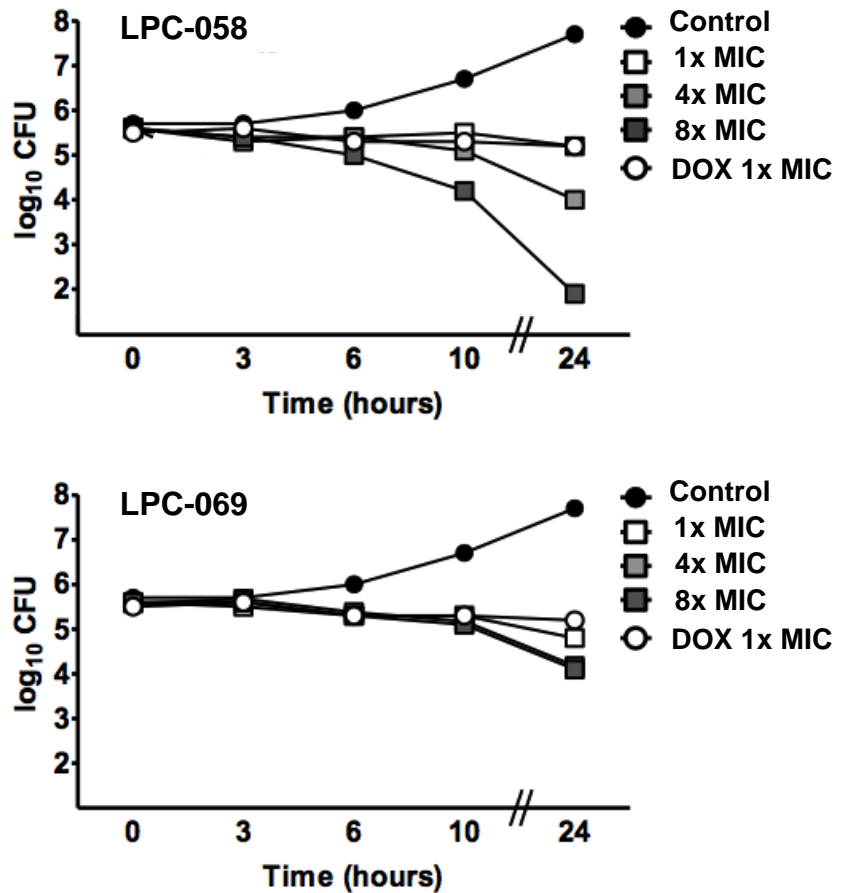


Figure 21: Cinétiques de bactéricidie des LPC-058 et LPC-069 déterminées en milieu liquide à 28°C et comparées à celle de la doxycycline (CMI = 0,5 mg/L), à partir d'un inoculum de 5.10^5 *Y. pestis* CO92

Contrairement à ce que nous avons observé vis-à-vis de *E. coli* et *P. aeruginosa*, le LPC-058 et le LPC-069 n'étaient pas bactéricides vis-à-vis de *Y. pestis*. La présence de l'un ou l'autre des composés, à des concentrations jusqu'à 8 fois équivalents à la CMI dans le milieu de culture (figure 21), était associée à une activité bactériostatique, comparable à celle observée avec la doxycycline, antibiotique bactériostatique recommandé dans le traitement de la peste, mais également à l'activité précédemment observée vis-à-vis d'*A. baumannii* (Annexe 4).

2. Propriétés pharmacologiques et tolérance des inhibiteurs de lpxC administrés

in vivo

a. Stabilité métabolique et étude pharmacocinétique des LPC-058 et LPC-069

Devant les propriétés différentes des LPC-058 et LPC-069 observées *in vitro*, nous avons poursuivi l'étude de leurs caractéristiques *in vivo*. Dans un premier temps, la stabilité des composés a été vérifiée en présence de microsomes hépatiques de souris et comparée à celle du CHIR-090. Le LPC-058 présentait une clairance et une demi-vie plus longues que les CHIR-090 et LPC-069 dont les caractéristiques étaient comparables. Puis, une analyse pharmacocinétique a été réalisée. Après injection par voie intra-veineuse (IV) d'une dose unique de chaque composé solubilisé dans 20% de cyclodextrine, des groupes de souris OF1 (Charles River, France) étaient prélevées à différents temps (T0, 10, 20, 30 min jusqu'à 8 heures). Les caractéristiques de chaque composé sont résumées dans le tableau 5. Le LPC-058 possédait une demi-vie plus longue associée à une concentration plasmatique initiale plus élevée que le LPC-069. Ce dernier présentait un volume de distribution 4 fois supérieur au LPC-058.

Tableau 5 : Données pharmacocinétiques du CHIR-090 et des LPC-058 et LPC-069 en présence de microsomes hépatiques et après injection par voie intra-veineuse d'une dose unique de 20 mg/kg de LPC-058 ou de 40 mg/kg de LPC-069 à deux groupes de 30 souris OF1.

Composé	Microsomes		Souris			
	Clairance ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$)	T _{1/2} (min)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	T _{1/2} (min)	Clairance plasmatique ($\text{mL}/\text{min}/\text{Kg}$)	Volume de distribution (L/kg)
CHIR-090	49	49	ND	ND	ND	ND
LPC-058	24	95	21,7	53	15	1,1
LPC-069	52	44	2.5	10	262	3,8

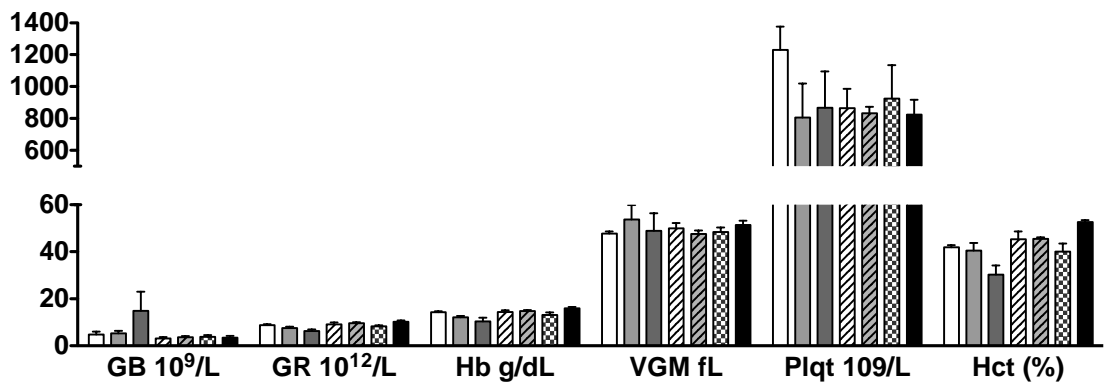
b. Etude des effets indésirables des inhibiteurs de LpxC en administrations répétées

Préalablement à l'étude de l'effet protecteur de ces composés *in vivo*, dans un modèle de traitement curatif de la peste de 5 jours, nous avons évalué la survenue d'éventuels effets indésirables à des posologies thérapeutiques. Ainsi, d'un point de vue clinique, les animaux traités par deux injections intraveineuses de 20 mg/Kg de LPC-058 présentaient dès le 3^{ème} jour de traitement des diarrhées sans répercussion biologique ou histologique notable. Seule une hypoprotidémie modérée était observée (42 g/L *versus* 50 g/L pour les témoins).

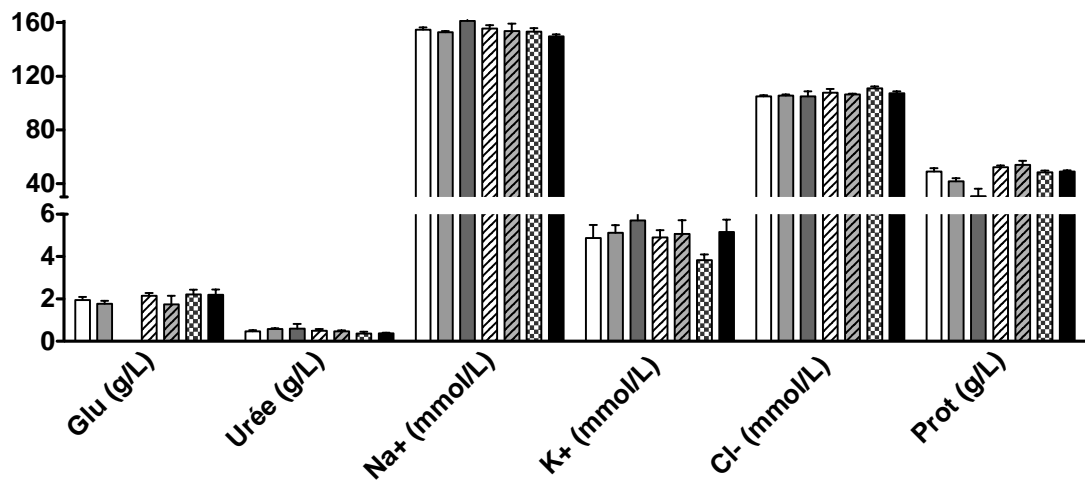
Cette même étude réitérée à la posologie de 40 mg/kg q12h a confirmé l'existence de manifestations diarrhéiques chez les animaux traités dont l'état général était nettement altéré (poil hérissé, dos courbé, absence de toilettage). Deux animaux traités sont décédés pendant la période de l'observation. L'analyse bactériologique des selles a mis en évidence un déséquilibre de la flore chez les animaux ayant reçu le LPC-058 avec une disparition des espèces à Gram négatif au profit d'espèces à Gram positif du genre *Enterococcus*, sans toutefois conduire à la prolifération d'espèces entéropathogènes. D'un point de vue biologique (figure 22), l'hyperleucocytose et l'anémie s'étaient significativement majorées ($p < 0,05$) sur l'hémogramme (figure 22.A). Le bilan biochimique révélait une cytolyse hépatique attestée par une augmentation d'un facteur 5 des TGP associée à une cholestase (élévation de la bilirubinémie totale d'un facteur 10). L'hypoprotidémie s'est aggravée sous ce traitement (31 g/L *versus* 50 g /L chez les témoins) et une hypernatrémie, probablement secondaire aux diarrhées, est apparue. Ces manifestations cliniques et biologiques ont été corroborées par l'analyse anatomopathologique qui mettait en évidence au niveau du foie des foyers cellulaires régénératifs traduisant une souffrance du parenchyme hépatique. Des lésions inflammatoires de la muqueuse colique et du parenchyme pulmonaire étaient également

observées et se traduisaient par une infiltration des cloisons alvéolaires et de la muqueuse colique par des cellules polynucléées (figure 23). L'administration de 10 mg/kg q 8h était mieux tolérée par les animaux dont les paramètres biologiques étaient comparables à ceux des animaux témoins. A l'inverse des effets observés avec le LPC-058, les animaux traités par LPC-069 20mg/kg q8h, 40 mg/kg q12h et q8h voire 200mg/kg q8h étaient indemnes de tout effet secondaire clinique, biologique ou anatomopathologique.

A.



B.



C.

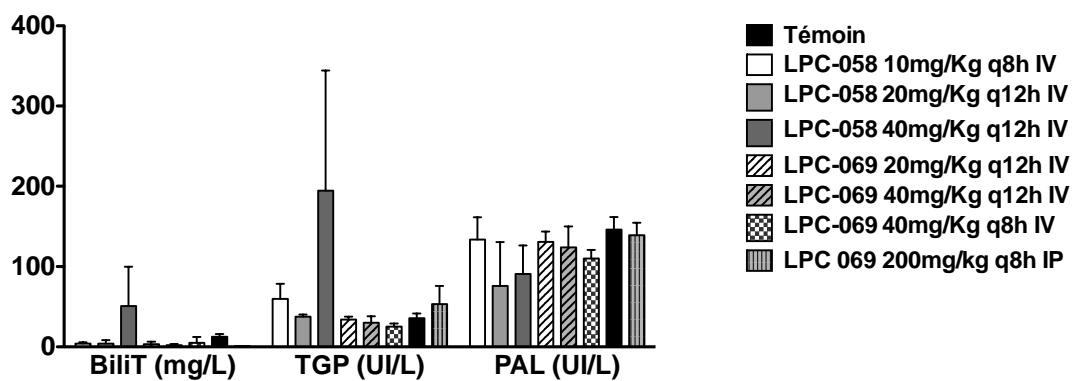


Figure 22 : Conséquences biologiques de l'administration répétée de LPC-058 et LPC-069 sur les fonctions hématopoïétiques (A), rénales (B) et hépatiques (C) de souris OF1 et comparé à un groupe témoin ayant reçu l'excipient seul.

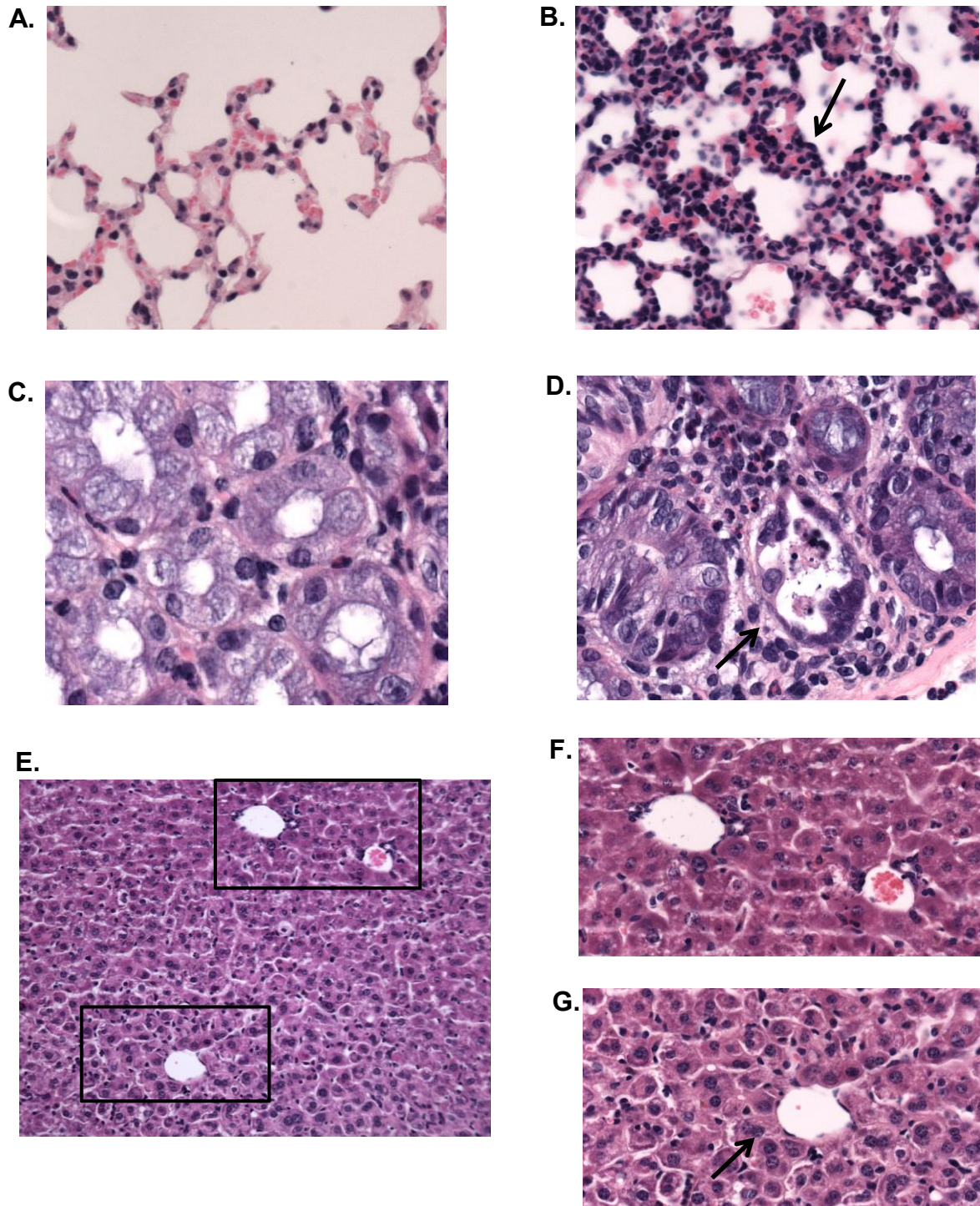


Figure 23 : Retentissement tissulaire de l'administration de LPC-058 à la dose de 40 mg/kg q12h IV. Coupes histologiques de poumon (A, B), de colon (C, D) et de foie (E, F, G) de souris témoins (A, C) et traitées (B, D, E, F, G). Un épaississement des cloisons alvéolaires (B) lié à un infiltrat de cellules polynucléées (flèche) est observé. Cette même infiltration est présente au niveau du chorion de la muqueuse colique (D) associée à une dilatation des cryptes (flèche) et une destruction de l'épithélium. Une souffrance du parenchyme hépatique est également notée. Elle se traduit par des foyers de régénération cellulaires prédominant en zone périveineuse (G) comparativement aux hépatocytes de la zone périportale (F).

3. Protection conférée par le LPC-058 et le LPC-069 dans un modèle de peste bubonique

Au regard des profils pharmacocinétiques différents des deux composés, l'efficacité des LPC-058 et LPC-069 a été évaluée dans un modèle murin de peste bubonique. Ainsi, des groupes de 15 souris ont été inoculées par voie intradermique avec 100 UFC de *Y. pestis* CO92. Le traitement a été initié 18 heures après inoculation par voie intra-veineuse avec 10 mg/kg q8h de LPC-058 ou 40 mg/kg q8h de LPC-069, en présence d'un inoculum moyen de 6 log₁₀ UFC dans le derme. Au terme de cinq jours de traitement, une survie significative des animaux traités était observée comparativement au groupe témoin (figure 24).

L'analyse des tissus prélevés chez les survivants 12 heures après l'arrêt du traitement montrait une charge bactérienne moindre dans le ganglion lymphatique des animaux traités par LPC-058 comparativement à ceux traités par LPC-069. Contrairement aux témoins, aucune souris traitée n'était bactériémique.

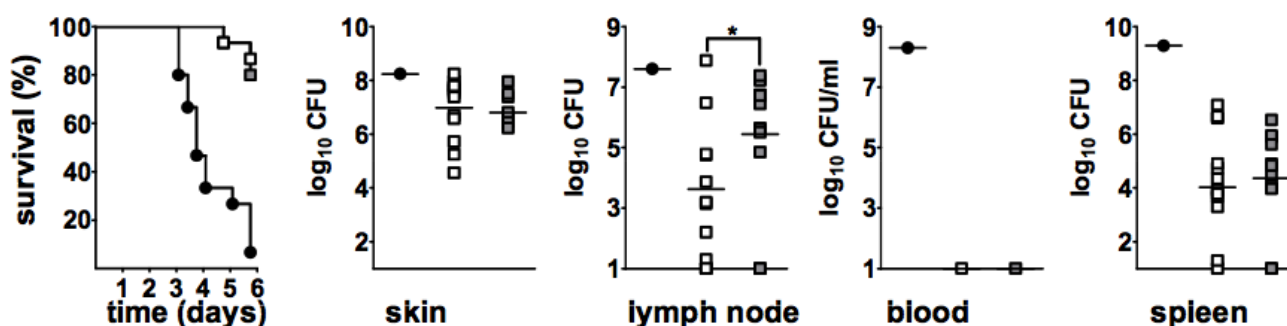


Figure 24 : Courbe de survie et dénombrement de la charge bactérienne de 3 groupes de 15 souris OF1 : le groupe témoin (rond noir), les groupes traités pendant 5 jours par 10 mg/kg q8h de LPC-058 (carrés blancs) ou 40 mg/kg q8h de LPC-069 (carrés gris). Les charges bactériennes dans la peau, le ganglion lymphatique, le sang et la rate des animaux survivants 12h après la dernière injection ont été déterminées.

Dans tous les cas, la persistance d'un inoculum bactérien dans les organes laissait présager d'un fort taux de rechute à l'arrêt du traitement. En effet, le LPC-058 et le LPC-069 aux posologies respectives de 10 mg/kg q8h et 40 mg/kg q8h permettaient au mieux de ralentir la colonisation d'organes cibles comme la peau, le ganglion lymphatique ou la rate (figure 25).

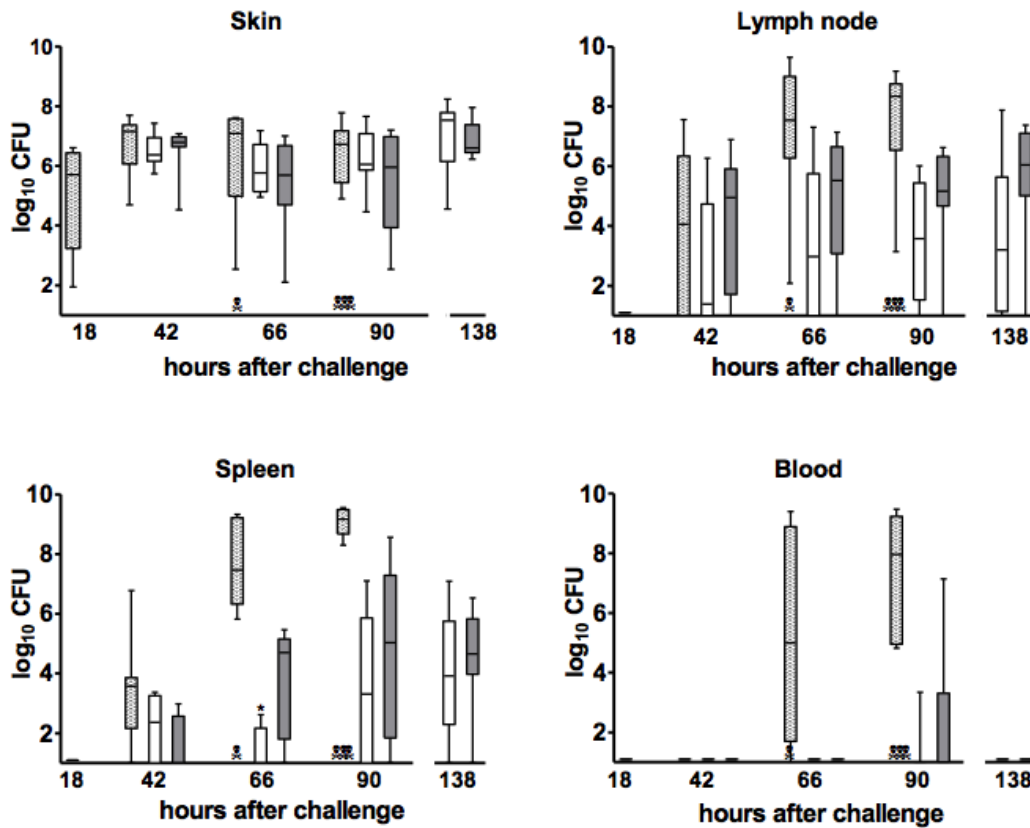


Figure 25 : Cinétique de colonisation de la peau, du ganglion lymphatique, de la rate et du sang dans un modèle de peste bubonique de 3 groupes de souris : Témoins (hachuré), traité par LPC-058 à 10 mg/kg q8h IV (blanc) et par LPC-069 à 40 mg/kg q8h IV (gris).

Nous avons par conséquent envisagé une augmentation des posologies administrées aux animaux en vue d'une guérison. Ceci n'était pas envisageable avec le LPC-058 compte-tenu des effets indésirables que nous avons observés. Le LPC-069 pouvant être administré à fortes doses sans effets secondaires, nous l'avons employé à la posologie de 200 mg/kg q8h. Une

guérison complète des animaux était observée, sans rechute 15 jours après l'arrêt du traitement. Les organes prélevés chez les souris survivantes étaient par ailleurs stériles. L'efficacité du LPC-069 était comparable à celle de la doxycycline, molécule de référence (figure 26).

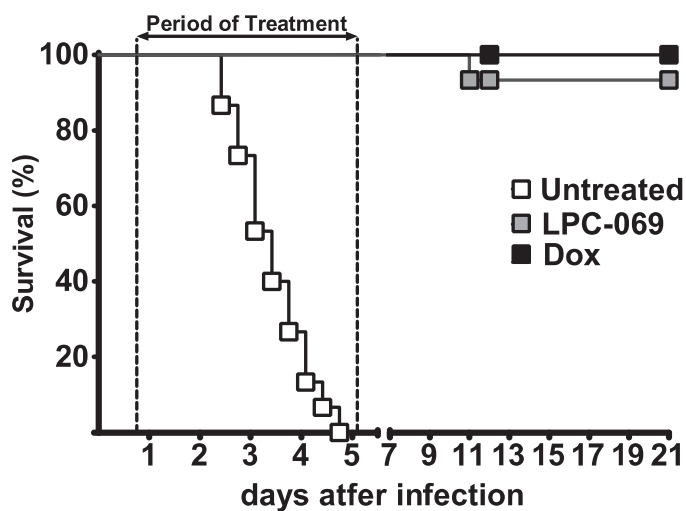


Figure 26 : Etude de la protection conférée par le LPC-069 à la posologie de 200 mg/kg q8h, comparée à celle de la doxycycline (Dox) à 50 mg/kg q12h toutes deux administrées 18 heures après inoculation intra-dermique de 100 UFC de *Y. pestis* CO92.

IV. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX INHIBITEURS DE LPXC

Dans la littérature, la résistance aux inhibiteurs de LpxC est un phénomène rare, sa fréquence est inférieure à 10^{-9} chez *E. coli* en présence de CHIR-090 (Zeng *et al.*, 2013). Chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, elle résulte de mutations au sein de gènes impliqués dans le métabolisme des phospholipides bactériens, tandis que chez *P. aeruginosa*, la résistance est en premier lieu la conséquence de mécanismes d'efflux. Nous avons initié une première approche de la résistance développée vis-à-vis des deux composés les plus actifs identifiés dans ce travail : le LPC-058 et le LPC-069.

1. Détermination de la fréquence spontanée de mutation

Nous avons déterminé la fréquence de mutation spontanée de trois souches de référence, de phénotype sauvage, vis-à-vis du LPC-058 : *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27953 et *Y. pestis* KIM6+. Les valeurs des CMI du LPC-058 sont reportées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Valeurs des CMI du LPC-058 déterminées sur des souches de référence de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Y. pestis*.

Souche	LPC-058 CMI (mg/L)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,032
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27953	0,5
<i>Y. pestis</i> KIM6+	0,064

De manière générale, les fréquences de mutation du LPC-058 étaient basses, ces valeurs étaient inférieures à $2.31 \cdot 10^{-10}$ pour *E. coli*, variaient de $4 \cdot 10^{-8}$ à $1.04 \cdot 10^{-10}$ pour *P. aeruginosa*

à des concentrations de 2 à 8 fois la CMI dans le milieu (tableau 7). Nous n'avons pas été en mesure de déterminer la fréquence de mutation de *Y. pestis* pour des concentrations de LPC-058 de 2 à 4 fois la CMI dans le milieu de culture. Nous avons observé un aspect de « nappe » sur les géloses qui résultait probablement de l'effet bactériostatique de la molécule sur *Y. pestis*.

Tableau 7 : Fréquences de mutation de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27953 et *Y. pestis* KIM6+ déterminées pour différentes concentrations de LPC-058 en milieu gélosé.

	LPC-058
<i>E. coli</i> ATCC 25922	
2x CMI	$\leq 2,31 \cdot 10^{-10}$
4x CMI	$\leq 2,31 \cdot 10^{-10}$
8x CMI	$\leq 2,31 \cdot 10^{-10}$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27953	
2x CMI	$4,47 \cdot 10^{-8}$
4x CMI	$1,35 \cdot 10^{-9}$
8x CMI	$1,04 \cdot 10^{-10}$
<i>Y. pestis</i> KIM6+	
2x CMI	ND
4x CMI	ND
8x CMI	$\leq 2,93 \cdot 10^{-9}$

2. Sélection de mutants résistants en milieu liquide

Compte tenu des difficultés rencontrées au cours des expériences de sélection de mutants résistants en milieu gélosé parmi lesquelles : l'instabilité des composés lors de cultures prolongées au delà de 24h, les difficultés à individualiser des clones isolés de *Y. pestis*, la

nécessité de passages itératifs sur des milieux de concentrations croissantes en inhibiteurs de LpxC, la sélection de mutants résistants en milieu liquide était alors une alternative. Cette méthode a l'avantage d'être moins coûteuse en antibiotiques et permet d'apprécier de manière cinétique l'évolution de la résistance d'une population bactérienne donnée. Dans ce cadre, nous avons étudié l'évolution de la résistance au LPC-058 et au LPC-069 des trois souches sauvages de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Y. pestis*. Les valeurs de CMI obtenues au cours de ces différents passages de 24 h en présence de LPC-058 ou de LPC-069 sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Evolution des CMI de *E. coli* ATCC 27922, *P. aeruginosa* ATCC 27953 et *Y. pestis* KIM6+ vis-à-vis de LPC-058 et LPC-069 au cours de 12 passages successifs en milieu liquide.

Passage n°	CMI LPC-058 (mg/L)			CMI LPC-069 (mg/L)		
	<i>E. coli</i> ATCC 27922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27953	<i>Y. pestis</i> KIM6+	<i>E. coli</i> ATCC 27922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27953	<i>Y. pestis</i> KIM6+
0	0,03	0,5	0,06	0,12	2	0,5
1	0,5	0,5	0,12	1	4	1
2	2	1	0,25	2	8	1
3	4	1	0,5	4	8	1
4	4	2	0,5	4	8	1
5	8	2	0,5	16	8	2
6	8	4	1	32	16	2
7	16	4	1	32	16	2
8	16	8	1	32	16	2
9	16	8	2	32	16	4
10	16	8	2	32	32	4
11	16	16	2	32	32	8
12	32	16	2	32	32	8

3. Analyse du support génétique de la résistance au LPC-058 et au LPC-069

Nous avons procédé à des PCR ciblées sur les mutants obtenus à la 12^{ème} et dernière étape. Les gènes retenus étaient ceux dont le rôle avait été démontré dans la littérature : *lpxC* et sa région promotrice, *fabZ* (entérobactéries) et *fabG* (*P. aeruginosa*) impliqués dans le métabolisme des acides gras bactériens puis *thrS* codant une ARNt thréonine ligase. Les résultats de ces séquençages sont consignés dans le tableau 9.

Tableau 9: Mutations mises en évidence chez les mutants de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Y. pestis* obtenus au terme d'une sélection de 12 passages en milieu liquide.

Cible	<i>E. coli</i> P12		<i>P. aeruginosa</i> P12		<i>Y. pestis</i> P12	
	LPC-058	LPC-069	LPC-058	LPC-069	LPC-058	LPC-069
<i>fabZ</i>	282C→G A94G	67T→C F23L 287T→C : I96T	250G→T G84C	⊙	⊙	289G→T D97Y 359A→G E120G
<i>fabG</i>			⊙	⊙		
<i>lpxC</i>	111C → T Mutation silencieuse aa 37 =V	110T → G V37G	⊙	⊙	⊙	⊙
<i>thrS</i>	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙

Des mutations au sein de *fabZ* ont été détectées systématiquement chez *E. coli* et sélectivement chez *P. aeruginosa* et *Y. pestis* exposés respectivement au LPC-058 et au LPC-069. Contrairement à ce qui avait été décrit par Ren *et al.*, (2000), nous n'avons pas mis en

évidence de mutation au sein du gène *fabG* chez *P. aeruginosa*. Une seule mutation au sein du gène cible *lpxC* était identifiée (*E. coli* P12 avec le LPC-069). La région intergénique en amont était indemne chez l'ensemble des clones testés. De même, aucune mutation de *thrS* n'a été observée.

DISCUSSION

DISCUSSION

L'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques au sein des bactéries à Gram négatif sont devenues des enjeux de santé publique nationaux et internationaux, tant à l'échelle communautaire que nosocomiale. Dans ce contexte, le développement de nouvelles molécules antibiotiques actives contre de nouvelles cibles bactériennes est primordial. A ce titre, le lipide A, garant de la stabilité de la membrane externe bactérienne revêt un intérêt majeur. Son schéma de biosynthèse s'appuie sur l'action consécutive de neuf enzymes parmi lesquelles, LpxC, qui en catalyse la première étape irréversible. Cette métallo-enzyme est hautement conservée au sein des espèces à Gram négatif et son inhibition délétère pour la bactérie (Normark *et al.* 1969). C'est pourquoi les inhibiteurs de LpxC ont été proposés comme une nouvelle classe d'antibiotiques potentiels. La structure commune de ces derniers comprend 2 parties : l'une hydrophobe s'insinuant dans le canal hydrophobe de l'enzyme, l'autre interagissant spécifiquement avec le site catalytique. Le premier inhibiteur décrit en 1996 était le L-161,240. Sa structure alliait à un noyau hydrophobe phényloxazoline un groupement hydroxamate dédié à la chélation de l'ion zinc du site actif. En 2005, le CHIR-090 offre, en plus du groupe hydroxamate, une expansion diphényle-acétylène. Sa portion hydrophobe plus allongée améliore l'affinité de la molécule pour l'enzyme ainsi que ses propriétés inhibitrices, il permet également d'élargir à *P. aeruginosa* un spectre d'activité initialement restreint aux entérobactéries. (McClerren *et al.*, 2005 ; Barb *et al.*, 2007 ; Faruk Mansoor *et al.*, 2011). Toutefois, le CHIR-090 était limité par sa structure rigide peu adaptée à la conformation étroite du canal hydrophobe rencontrée chez certaines espèces environnementales telles *R. leguminosarum* (Barb *et al.*, 2007). La portion diphényle-acétylène du CHIR-090 a été secondairement prolongée par l'ajout d'une liaison acétylène caractérisant alors le LPC-011. Ce « diphényle-diacétylène » possédait une structure plus

souple avec pour conséquence des propriétés inhibitrices accrues et un spectre d'activité antibactérien élargi (Lee *et al.*, 2011). Nous avons ainsi pu constater une activité modérée du LPC-011 sur *B. cepacia* sans pour autant observer d'efficacité vis-à-vis d'*A. baumannii*. Dans ce travail, une approche dynamique par la résonance magnétique nucléaire a permis d'optimiser les interactions enzymes/inhibiteurs au niveau du site catalytique et d'envisager d'autres substitutions en regard de cette portion. L'ajout de deux radicaux fluorés (LPC-058, LPC-087 et LPC-069) a amélioré significativement les propriétés inhibitrices et antibiotiques des composés, notamment vis-à-vis d'*A. baumannii*. Cet élargissement du spectre d'activité reposerait sur une meilleure diffusion cellulaire apportée par les atomes de fluor comme il a été démontré par le passé lors de la mise au point des fluoroquinolones (Domalaga *et al.*, 1986). Des différences ont été néanmoins observées entre ces trois composés fluorés. Celles-ci se traduisaient par des valeurs de CMI plus basses du LPC-058 comparativement au LPC-087 et LPC-069, tous deux dotés d'un cycle morpholine distal rigidifiant l'axe hydrophobe du composé, contrastant avec la nature flexible de la portion hydrophobe du LPC-058 (figure 20 p 53). Ainsi, le LPC-058 semble offrir une structure optimale en regard du site catalytique et du canal hydrophobe de l'enzyme.

Ces inhibiteurs de LpxC, par leur caractère hydrophobe, n'en demeurent pas moins des substrats des pompes à efflux bactériennes (Li *et al.*, 2015), notamment des pompes de type RND (Resistance-Nodulation-Division) exprimées par *P. aeruginosa* (Caughlan *et al.*, 2012 ; Tomaras *et al.*, 2014). Nous avons remarqué que cette susceptibilité à l'efflux était également plus marquée pour les composés substitués par un cycle morpholine (LPC-087 et LPC-069) que pour ceux dotés d'une portion hydrophobe flexible biphenyle-diacétylène et substituée une fonction amine distale (LPC-011 et LPC-058). Cette sensibilité aux pompes à efflux peut être responsable de l'indifférence de *S. maltophilia* et *A. xylosoxidans* à nos composés. Cependant, la détermination des CMI en présence de cyanure de m-chlorophényl hydrazone

carbonyle (CCCP), agent découplant, n'a permis de diminuer les valeurs de ces CMI que d'une à deux dilutions, et ceci uniquement vis-à-vis de *S. maltophilia* (données personnelles). Des différences de séquences primaires de LpxC (75.5% et 77% de similarité respectivement entre *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia* et *E. coli* (figure 10 p 33) et leurs conséquences conformationnelles pourraient être à l'origine d'une moindre affinité pour les inhibiteurs. La détermination de constantes d'inhibition, la modélisation tridimensionnelle des enzymes LpxC de *A. xylosoxidans* et *S. maltophilia* en présence de ces inhibiteurs permettrait de mieux appréhender les propriétés de ces composés. Enfin, il est possible que la structure du LPS de ces deux espèces rende la membrane externe moins fluide et plus imperméable aux inhibiteurs. En effet, chez *Y. pestis*, la composition du LPS de la bactérie et la structure de son lipide A varient en fonctions des conditions de température, de concentrations ioniques du milieu dans lequel elle se trouve. La structure hexa-acylée de son lipide A et le remplacement des résidus phosphates par des molécules d'arabinoses à 28°C rend la membrane externe moins fluide. Ceci se traduit par une élévation des CMI à 28°C comparativement à celles observées à 37°C, car à cette température, le lipide A est tétra-acylé et ne contient pas d'arabinose (Rebeil *et al.*, 2004). Enfin, concernant *A. xylosoxidans* et *S. maltophilia*, des difficultés d'accès à la cible de ces molécules pourraient être également évoquées, mais peu de données existent sur la structure précise du LPS de ces deux espèces, pathogènes opportunistes dont le potentiel épidémique reste modéré (Liang *et al.*, 2013).

Par une étude menée sur des souches d'entérobactéries, de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii* isolées d'infections nosocomiales, nous avons démontré que l'efficacité des inhibiteurs de LpxC était indépendante du niveau de résistance de ces bactéries aux antibiotiques classiques. Les valeurs de CMI étaient en effet comparables qu'il s'agisse de souches de phénotype sensible, MDR ou XDR. Le degré d'efficacité de ces inhibiteurs était davantage « espèce-dépendant » avec une activité bactéricide observée sur la majorité des

entérobactéries et *P. aeruginosa*, y compris sur des souches productrices de BLSE et de carbapénémases, contrastant avec une activité bactériostatique vis-à-vis d'*A. baumannii* et *Y. pestis*. Outre les considérations relatives à la séquence primaire de la cible ou à l'implication des mécanismes d'efflux évoqués précédemment, les LPS d'*A. baumannii* et de *Y. pestis* possèdent des propriétés originales qui pourraient expliquer l'effet bactériostatique observé. En présence d'antibiotiques visant à déstabiliser sa membrane externe, *A. baumannii* est capable de s'adapter via des mutations dans les gènes *lpxA*, *lpxC* et *lpxD* ayant pour conséquences un arrêt de la biosynthèse du lipide A (Moffat *et al.*, 2010). Le caractère « facultatif » de ce constituant membranaire chez *A. baumannii* est sans doute responsable de la moindre efficacité des inhibiteurs sur cette espèce. *Y. pestis* est également capable de modifier la composition de son LPS et d'adapter la structure de son lipide A aux variations de température, de concentrations ioniques du milieu dans lequel elle se trouve (Rebeil *et al.*, 2004). Ce phénomène peut altérer la bonne diffusion des inhibiteurs de LpxC et expliquerait le caractère bactériostatique de ces molécules à 28°C.

Toutefois, quel que soit le profil d'activité observé en monothérapie, une synergie franche était mise en évidence en associant le LPC-058 aux C3G, à l'imipénème, à l'amikacine ou à la ciprofloxacine. Cette synergie était effective quelle que soit la souche étudiée (*E. coli* BLSE, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* producteurs de carbapénémases), en présence de concentrations sub-inhibitrices de LPC-058, alors que ces souches présentaient de très hauts niveaux de résistance aux antibiotiques conventionnels.

Enfin, les résultats intéressant la résistance aux inhibiteurs de LpxC sont préliminaires. Nous avons démontré que la fréquence spontanée de mutation de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Y. pestis* en présence de LPC-058 était faible, laissant envisager une administration possible du composé en monothérapie. Puis nous avons essayé d'induire la résistance de ces trois espèces

au LPC-058 et au LPC-069. Nous avons privilégié pour ce faire la sélection en milieu liquide par la technique des passages successifs, moins « coûteuse » en inhibiteur de LpxC dont la quantité (quelques mg) était un facteur limitant. Ce processus a mis en évidence une élévation lente et progressive des CMI dont les valeurs obtenues au terme du 12^{ème} passage n'excédaient pas 32 mg/L pour *E. coli* et *P. aeruginosa* et 2 mg/L ou 8 mg/L pour *Y. pestis* en présence de LPC-058 ou LPC-069 respectivement. Ces valeurs contrastent avec celles observées vis-à-vis de certains antibiotiques conventionnels (par exemple, 256 mg/L pour l'imipénème). Cette difficulté à sélectionner des mutants hautement résistants aux inhibiteurs de LpxC témoigne possiblement du coût métabolique de cette résistance pour la bactérie. Nous avons ensuite procédé au séquençage des cibles identifiées dans la résistance aux anti-LpxC : le gène *lpxC* et sa région promotrice, les gènes *fabZ* et *fabG* impliqués dans le métabolisme des acides gras bactériens et *thrS* dans le métabolisme protéique. A l'instar de ce qui a été démontré chez *E. coli* avec le CHIR-090 et les phényl-pyridones, les mutations au sein de *fabZ* sont les plus fréquemment retrouvées dans notre travail (Zeng *et al.*, 2013 ; Caughlan *et al.*, 2012). Dans la littérature, ces mutants de *E. coli* ont un lipide A caractérisé par des chaînes d'acides gras plus courtes. Chez *Y. pestis*, membre de la famille des *Enterobacteriaceae*, les modifications du LPS sont essentielles à la colonisation de la bactérie dans le tractus digestif de la puce (Aoyagi *et al.*, 2015) ainsi qu'à l'échappement du système immunitaire du mammifère (Knirel et Anisimov, 2012). Les mutations mises en évidence chez *Y. pestis*, identiques à celles observées chez les mutants résistants d'*E. coli*, pourraient ainsi avoir des conséquences sur la croissance et la virulence de ces souches.

Préalablement aux expériences *in vivo*, nous avons été confrontés aux limites de solubilité de ces composés en milieu aqueux. Ceux-ci avaient été dissous dans le DMSO (5%) pour les expériences *in vitro*. Afin de nous affranchir de cette molécule toxique *in vivo*, nous avons utilisé la cyclodextrine, « molécule-piège » dérivée de l'amidon, capable d'accueillir des

molécules actives et de former des « complexes d'inclusion ». Cet adjuvant est largement employé en pharmacologie pour ses propriétés solvantes en milieu aqueux et de transport vers des organes cibles (Kurkov et Loftsson, 2013). Le composé que nous avons employé s'est avéré performant avec le LPC-069, toutefois, il est possible qu'il n'ait pas été optimal avec le LPC-058, expliquant pour partie les effets indésirables observés avec cet inhibiteur.

Ces effets indésirables mis en évidence avec le LPC-058 étaient principalement digestifs avec des diarrhées dont l'intensité était corrélée à la dose employée. Dès le 3^{ème} jour de traitement par le LPC-058, l'analyse des selles révélait une disparition complète des espèces à Gram négatif au profit des espèces à Gram positif. Ce déséquilibre était moins prononcé avec le LPC-069, probablement grâce aux modifications structurales qui lui ont été apportées : une seule liaison acétylène, un groupe morpholine distal remplaçant le groupe aniline reconnu pour ses propriétés toxiques (Fabian *et al.*, 2016). Ces déséquilibres de la flore digestive sont fréquemment observés chez le rongeur exposé aux antibiotiques (Morris, 1995). A titre d'exemple, la pénicilline bien tolérée chez l'homme est pourvoyeuse d'entérocolite mortelle chez le rongeur. Cette limite du modèle murin justifie la réalisation d'expériences de toxicité sur des espèces animales différentes dans les études pharmacologiques pré-cliniques.

Nous avons ensuite apprécié l'efficacité de ces molécules dans l'une des infections les plus virulentes pour l'homme : la peste. Il s'agit de la première étude *in vivo* employant des inhibiteurs de LpxC dans un modèle d'infection établie, qui plus est, avec un pathogène de classe 3. Des études précédentes menées par Brown *et al.*, et Tomaras *et al.*, ont utilisé des inhibiteurs de types alkyl-acide hydroxamiques ou phényl-pyridones afin de les évaluer dans des modèles d'infections systémiques à *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* et de déterminer la dose efficace médiane (DE₅₀) ou la dose protectrice médiane (DP₅₀) des composés en les administrant entre 30 minutes et 4 heures après l'inoculation (Brown *et al.*, 2012 ; Tomaras *et*

al., 2014). Dans cette étude, nous avons évalué l'effet curatif des inhibiteurs dans le modèle de peste bubonique développé dans notre laboratoire et instauré le traitement 18 h après inoculation intra-dermique de *Y. pestis*, soit en présence de 6 log₁₀ UFC au niveau du point d'injection. Les premières expériences de protection ont été menées avec le LPC-058 qui présentait la demi-vie la plus longue. En dépit d'une protection significative liée au contrôle de la bactériémie des rongeurs, une rechute était observée à l'arrêt du traitement, probablement liée à l'absence de stérilisation du ganglion lymphatique et à la distribution plutôt vasculaire de la molécule (Vd 1,1 L/kg). Une augmentation des posologies ne pouvait être envisagée avec le LPC-058 compte-tenu des effets indésirables observés. *A contrario*, l'administration de fortes doses de LPC-069 (200 mg/kg q8h) a permis de guérir les animaux et de stériliser les organes sans effet secondaire malgré des valeurs de CMI plus élevées que celles du LPC-058, et une demi-vie plus courte (10 min). Cette dernière est néanmoins comparable à celle d'autres antibiotiques administrés chez le rongeur (Andes et Craig, 2002). L'efficacité du LPC-069 repose probablement sur une meilleure diffusion tissulaire, comme l'atteste un volume de distribution quatre fois supérieur à celui du LPC-058 et une moindre liaison protéique. Finalement, dans ce modèle, le LPC-069 était aussi efficace que la doxycycline, molécule recommandée dans le traitement de la peste.

CONCLUSIONS

Les inhibiteurs de LpxC évalués dans ce travail, dérivés du CHIR-090, sont une nouvelle classe d'antibiotiques actifs sur une nouvelle cible bactérienne, le lipide A, un composé essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Nos travaux ont montré que ces composés étaient actifs sur une large gamme d'entérobactéries et d'espèces non fermentantes et qu'ils n'étaient pas affectés par les mécanismes de résistance aux autres classes d'antibiotiques. Nous avons également observé une synergie de ces inhibiteurs en association à d'autres classes d'antibiotiques (β -lactamines, fluoroquinolones et aminosides) sur des souches ultra-résistantes de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et d'entérobactéries productrices de BLSE et de carbapénémases. Enfin, nous avons apporté la preuve de concept de l'efficacité des dérivés du CHIR-090 dans un modèle murin de peste bubonique, laissant augurer de résultats prometteurs dans d'autres infections à BGN moins virulentes.

PERSPECTIVES

Nous avons démontré que les inhibiteurs du CHIR-090 étaient utilisables dans le traitement curatif de la peste bubonique. Néanmoins, des travaux d'optimisation de la structure chimique des composés doivent être envisagés afin d'élargir leur activité à d'autres espèces à Gram négatif non fermentantes, d'améliorer leur solubilité en milieu aqueux ainsi que leurs propriétés pharmacocinétiques.

Nous avons sélectionné des mutants de *Y. pestis* résistants aux dérivés diacétylènes du CHIR-090 et présentant des mutations de *fabZ* à l'instar de ce qui était observé chez *E. coli* dans la littérature. L'implication de ces mutations dans la résistance aux inhibiteurs de LpxC devra être confirmée par des expériences de mutagénèses dirigées et de complémentations. La

structure du LPS de *Y. pestis* est variable selon les conditions de température contrairement à celle de *E. coli*. Aussi, envisageons-nous de séquencer le génome des souches résistantes de *Y. pestis* afin d'identifier d'autres gènes impliqués dans la résistance. L'impact des mutations des différents gènes sur la composition du LPS sera évalué par spectrométrie de masse, leurs conséquences sur la morphologie bactérienne seront appréciées par microscopie électronique. Le LPS jouant un rôle fondamental dans l'adaptation de *Y. pestis* aux différentes conditions environnementales rencontrées dans son cycle infectieux, nous apprécierons les conséquences biologiques des mutations sur la croissance extracellulaire de *Y. pestis* en milieu liquide, à différentes températures et en présence de sérum humain. De même, la vitesse de réplication intra-cellulaire dans les phagocytes sera comparée à la souche parentale. Enfin, la capacité des mutants à coloniser le tube digestif de la puce et à provoquer une infection chez le rongeur sera évaluée. Finalement, la caractérisation des gènes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de LpxC devrait améliorer la connaissance des mécanismes de régulation de la biosynthèse du LPS chez *Y. pestis*, un facteur de virulence majeur de cette espèce.

ANNEXES

ANNEXE 1

TABLE DES ACIDES AMINÉS

NOM	ABREVIATIONS	
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Acide glutamique	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

ANNEXE 2

Critères employés pour la classification MDR, XDR ou PDR des souches cliniques évaluées dans ce travail (d'après Magiorakos *et al.*,)

Tableau 10 : Critères retenus pour les entérobactéries (extrait de Magiorakos *et al.*, 2011)

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)	Species with intrinsic resistance to antimicrobial agents or categories (51) ^a
Aminoglycosides	Gentamicin		<i>Providencia rettgeri</i> (<i>P. rettgeri</i>), <i>Providencia stuartii</i> (<i>P. stuartii</i>)
	Tobramycin		<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Amikacin		
	Netilmicin		<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Anti-MRSA cephalosporins	Ceftaroline (approved only for <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>)		
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid		<i>Escherichia hermannii</i> (<i>E. hermannii</i>)
	Piperacillin-tazobactam		<i>E. hermannii</i>
Carbapenems	Ertapenem		
	Imipenem		
	Meropenem		
	Doripenem		
Non-extended spectrum cephalosporins: 1st and 2nd generation cephalosporins	Cefazolin		<i>Citrobacter freundii</i> (<i>C. freundii</i>), <i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>E. aerogenes</i>), <i>Enterobacter cloacae</i> (<i>E. cloacae</i>), <i>Hafnia alvei</i> (<i>H. alvei</i>), <i>Morganella morganii</i> (<i>M. morganii</i>), <i>Proteus penneri</i> (<i>P. penneri</i>), <i>Proteus vulgaris</i> (<i>P. vulgaris</i>), <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>Serratia marcescens</i> (<i>S. marcescens</i>)
	Cefuroxime		<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. marcescens</i>
Extended-spectrum cephalosporins: 3rd and 4th generation cephalosporins	Cefotaxime or ceftriaxone		
	Ceftazidime		
	Cefepime		
Cephameycins	Cefoxitin		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
	Cefotetan		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin		
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole		
Glycylcyclines	Tigecycline		<i>M. morganii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> (<i>P. mirabilis</i>), <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Monobactams	Aztreonam		
Penicillins	Ampicillin		<i>Citrobacter koseri</i> (<i>C. koseri</i>), <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>Klebsiellae</i> spp., <i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Penicillins + β -lactamase inhibitors	Amoxicillin-clavulanic acid		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>M. morganii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
	Ampicillin-sulbactam		<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>S. marcescens</i>
Phenicol	Chloramphenicol		
Phosphonic acids	Fosfomicin		
Polymyxins	Colistin		<i>M. morganii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)
Aminoglycosides	Gentamicin	
	Tobramycin	
	Amikacin	
	Netilmicin	
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	
	Meropenem	
	Doripenem	
Antipseudomonal cephalosporins	Ceftazidime	
	Cefepime	
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid	
	Piperacillin-tazobactam	
Monobactams	Aztreonam	
Phosphonic acids	Fosfomicin	
Polymyxins	Colistin	
	Polymyxin B	

Criteria for defining MDR, XDR and PDR in *Pseudomonas aeruginosa*
MDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories.
XDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories.
PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed.
http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx.

Tableau 11: Critères retenus pour *P. aeruginosa* (extrait de Magiorakos *et al.*, 2011)

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)
Aminoglycosides	Gentamicin	
	Tobramycin	
	Amikacin	
	Netilmicin	
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	
	Meropenem	
	Doripenem	
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Piperacillin-tazobactam	
	Ticarcillin-clavulanic acid	
Extended-spectrum cephalosporins	Cefotaxime	
	Ceftriaxone	
	Ceftazidime	
	Cefepime	
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole	
Penicillins + β -lactamase inhibitors	Ampicillin-sulbactam	
Polymyxins	Colistin	
	Polymyxin B	
Tetracyclines	Tetracycline	
	Doxycycline	
	Minocycline	

Criteria for defining MDR, XDR and PDR in *Acinetobacter* spp.
MDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories.
XDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories.
PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed.
http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx.

Tableau 12 : Critères retenus pour *A. baumannii* (extrait de Magiorakos *et al.*, 2011)

ANNEXE 3

Title:

Drug Design from the Cryptic Inhibitor Envelope

Authors:

Chul-Jin Lee^{1,†}, Xiaofei Liang^{2,†}, Qinglin Wu^{1,†}, Javaria Najeeb^{1,†}, Jinshi Zhao¹, Ramesh Gopaldaswamy², Marie Titecat³⁻⁷, Florent Sebbane³⁻⁷, Nadine Lemaitre³⁻⁷, Eric J. Toone^{1,2}, Pei Zhou^{1,2,*}

Affiliations:

¹Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA

²Department of Chemistry, Duke University, Durham, NC 27708, USA

³INSERM U1019; ⁴CNRS UMR8204; ⁵Institut Pasteur de Lille; ⁶Université de Lille;

⁷CHRU de Lille, Lille, France

*Correspondence to: peizhou@biochem.duke.edu

†These authors contributed equally to this work.

Summary

Conformational dynamics plays an important role in enzyme catalysis, allosteric regulation of protein functions, and assembly of macromolecular complexes. Despite these well-established roles, such information has yet to be exploited for rational drug design. Using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, we show that inhibitors of LpxC, an essential enzyme of the lipid A biosynthetic pathway in Gram-negative bacteria and a validated novel antibiotic target, access alternative, minor population states in solution in addition to the predominant ligand conformation visible in crystal structures. These conformations collectively delineate an inhibitor envelope accessible by small molecules in solution. Rational design exploiting the cryptic inhibitor envelope led to the development of potent antibiotics with inhibition constants in the single-digit picomolar range. The principle of such an “inhibitor envelope” approach may be broadly applicable to lead optimization campaigns to yield better therapeutics.

Main

The availability of high-resolution crystal structures of protein-inhibitor complexes has revolutionized the drug development process, enabling the design of therapeutics based on visual inspection of receptor-ligand interactions. However, high-resolution structures do not necessarily enable a successful lead optimization campaign, as the static structural models often fail to capture the conformational flexibility of the receptors and their bound inhibitors^{1,2}. In contrast, the discovery of ring flipping of buried aromatic residues of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) by solution NMR³ has heralded the widespread observation of conformational dynamics in macromolecules and its contribution to enzyme catalysis⁴⁻⁷, allosteric regulation⁸, nucleic acid function⁹, and ligand binding¹⁰. Despite these extensive demonstrations, the utilization of such information in drug development has remained an unmet challenge.

We used solution NMR to investigate the conformational states of small-molecule inhibitors bound to LpxC, an essential metalloamidase of the lipid A biosynthetic pathway in Gram-negative bacteria (Extended Data Fig. 1)^{11,12}. *Aquifex aeolicus* LpxC (AaLpxC) was chosen for investigation due to its exceptional thermostability, which has enabled both NMR and crystallographic studies¹³⁻¹⁶. *Pseudomonas aeruginosa* LpxC (PaLpxC) was exploited when the co-crystal structures of the AaLpxC-inhibitor complex could not be obtained.

We first investigated the conformations of CHIR-090 and LPC-011 bound to AaLpxC, two inhibitors that share the threonyl hydroxamate head group, but differ in their tail groups (Extended Data Fig. 1, Extended Data Table 1). CHIR-090 features a substituted biphenyl acetylene tail group that occupies the substrate-binding passage of LpxC¹⁴. Replacing the tail group of CHIR-090 with a substituted biphenyl diacetylene group generated LPC-011 with improved antibiotic activity^{16,17}. Crystal structure of AaLpxC in complex with LPC-011 (Fig. 1a, Extended Data Table 2) revealed a single conformation of the threonyl-hydroxamate

head group in the active site, featuring a *trans* χ_1 configuration with the threonyl C γ_2 methyl group packing against an invariant phenylalanine, F180, and the O γ_1 hydroxyl group forming a hydrogen bond with the catalytically important lysine K227.

In order to determine whether the threonyl head group could access alternative ligand conformations in solution, we synthesized isotopically-labeled CHIR-090 and LPC-011 and measured χ_1 -dependent scalar couplings $^3J_{NC\gamma_2}$ and $^3J_{C'\gamma_2}$. A $^3J_{NC\gamma_2}$ value of ~ 1.9 Hz is consistent with a *trans* $NC\gamma_2$ relationship between the amide nitrogen and the C γ_2 methyl of the threonyl group, corresponding to a χ_1 angle of -60° , whereas a value of ~ 0.2 Hz reflects a *gauche* $NC\gamma_2$ relationship, corresponding to χ_1 angles of 180° or 60° . An intermediate value suggests a population-weighted average between *trans* $NC\gamma_2$ and *gauche* $NC\gamma_2$ states¹⁸. A similar relation is noted for the $^3J_{C'\gamma_2}$ coupling¹⁸, and simultaneous measurements of $^3J_{NC\gamma_2}$ and $^3J_{C'\gamma_2}$ couplings enable the determination of populations of all three states¹⁹. LPC-011 displayed a $^3J_{NC\gamma_2}$ coupling of 0.59 ± 0.06 Hz and a $^3J_{C'\gamma_2}$ coupling of 0.78 ± 0.03 Hz, corresponding to a predominant *trans* χ_1 configuration with a population of 0.64 ± 0.03 . Such an observation is consistent with the ligand conformation observed in the AaLpxC/LPC-011 crystal structure (Fig. 1a). However, the measurements also revealed that the threonyl sidechain of LPC-011 can readily access alternative conformational states with a population of 0.23 ± 0.03 for the *gauche*- χ_1 conformation and a population of 0.13 ± 0.01 for the *gauche*+ χ_1 conformation (Fig. 1b, Extended Data Table 3). Measurements of CHIR-090 yielded a similar result, with a $^3J_{NC\gamma_2}$ coupling of 0.44 ± 0.06 Hz and a $^3J_{C'\gamma_2}$ coupling of 0.67 ± 0.05 Hz, corresponding to χ_1 populations of 0.77 ± 0.04 for the *trans* configuration, 0.14 ± 0.04 for the *gauche*- configuration and 0.09 ± 0.02 for the *gauche*+ configuration (Fig. 1b, Extended Data Table 3). Modeling of the threonyl sidechain in the second-most-populated, *gauche*- χ_1 state indicated that the C γ_2 methyl group would experience vdW

interactions with the hydrophobic component of the K227 sidechain, with the O γ 1 hydroxyl group oriented towards solvent (Fig. 1c). These rotamers collectively portray an inhibitor envelope that can accommodate three substitutions at the C β position of the threonyl head group (Fig. 1c). In order to test this prediction, we merged the two most-populated conformations of the threonyl head group and generated C β -di-methyl substituted compounds with the third C β -substitution containing either a hydroxyl group (LPC-037) or an amino group (LPC-040) (Extended Data Table 1). Structural analysis of LPC-040 in complex with PaLpxC revealed the anticipated ligand conformation (Fig. 1d; Extended Data Table 2), with the two C β -substituted methyl groups forming hydrophobic interactions with F180 (F191PaLpxC) and the stem of K227 (K238PaLpxC) and the amino group directed towards solvent accessible space. Both CHIR-090 and LPC-011 displayed slow binding kinetics towards *E. coli* LpxC (Extended Data Fig. 2), with K i^* values for the stable enzyme-inhibitor complex (EI*) of 153 ± 8 pM and 26 ± 1 pM, respectively. The C β -triply-substituted compounds LPC-037 and LPC-040 showed enhanced LpxC inhibition, with K i^* values of 14 ± 1 pM and 12 ± 1 pM, respectively (Fig. 1e; Extended Data Table 4).

We then investigated the inhibitor envelope at the γ -position by examining LPC-023 bearing an isoleucine-hydroxamate head group (Extended Data Table 1). Isoleucine shares a basic molecular scaffold with threonine, and its C γ 1-C δ 1 group can be viewed as a substitution of the O γ 1 group of threonine. The AaLpxC-LPC023 crystals contained two copies of the LpxC-inhibitor complexes in the asymmetric unit (Extended Data Table 2). The second protomer (chain B) displayed a distorted active site with the catalytically important H253 flipped out of the active site in a configuration that had not been observed in any of the previously reported LpxC structures. We reasoned that this could reflect a crystallization artifact and consequently focused the analysis on the first protomer (chain A). In this protomer, the ligand isoleucine head group displayed a *trans* χ 1 configuration, consistent with

the predominant rotameric state observed in the threonyl group of CHIR-090 and LPC-011. The C δ 1 methyl group adopted a *gauche*⁺ χ ² conformation with regard to the C α atom, potentially forming vdW interactions with the nearby imidazole ring of H253.

We again inspected whether the isoleucine analog can access alternative χ ² states in solution using the isotopically-labeled compound. The isoleucine C δ 1 chemical shift is sensitive to its χ ² angle²⁰. For *gauche*⁺ and *trans* χ ² rotamers, isoleucine C δ 1 nuclei display downfield shifted chemical shifts of >14.8 ppm, whereas upfield shifted C δ 1 chemical shifts of <9.3 ppm indicate a *gauche*⁻ χ ² conformation (Fig. 2b). The LpxC-bound LPC-023 displayed a C δ 1 chemical shift of 15.2 ppm, indicating that the χ ² conformation resides entirely in the *trans* or *gauche*⁺ states or interconverts between the two, but has no detectable population in the *gauche*⁻ state. A *trans* configuration between C α and C δ 1 would yield a large scalar coupling of ~3.7 Hz, whereas a *gauche* configuration would yield a small coupling of ~1.5 Hz (Fig. 2b)²⁰. Our measurements yielded ³J_{C α C δ 1} coupling of 2.05 ± 0.04 Hz, corresponding to 75% population in the *gauche*⁺ χ ² state with the C δ 1 methyl group located adjacent to H253 and 25% population in the *trans* χ ² state with the same group oriented towards K227 (Fig. 2b, Extended Data Table 5). Although the predominant *gauche*⁺ χ ² state is consistent with the crystallographically observed inhibitor conformation, our NMR measurements support the notion that both the *gauche*⁺ and *trans* χ ² rotamers are populated, whereas the *gauche*⁻ χ ² rotamer is energetically occluded in solution.

The delineation of two additional pockets that can accommodate methyl-sized functional groups to interact with sidechains of the catalytically important histidine and lysine residues suggests fluorine as an attractive functional group for substitution. Fluorine has a slightly smaller size than the methyl group²¹ and is strongly electronegative²². This renders

the fluorine group well-suited for forming electrostatic interactions with a protonated histidine imidazolium and a positively charged lysine terminal ammonium group.

Based on this analysis, we introduced difluoro substitution to the pro-*R* methyl group of LPC-037 to yield LPC-058. Structural analysis of LPC-058 with PaLpxC once again revealed the anticipated ligand conformation (Fig. 2c; Extended Data Table 2), with the β -methyl group occupying the hydrophobic pocket next to F180 (F191PaLpxC) for vdW contacts, the β -hydroxyl group residing in the solvent pocket, and finally with the difluoro-methyl group oriented towards H253 (H264PaLpxC) and K227 (K238PaLpxC) for electrostatic interactions (Fig. 2c).

LPC-058 is an exceptionally potent inhibitor. It displayed slow binding kinetics toward *E. coli* LpxC (Extended Data Fig. 3) with an inhibition constant (K_i^*) of 3.7 pM for the stable EI* complex, featuring a 7-fold enhancement of potency over LPC-011 and a 44-fold enhancement over CHIR-090 (Fig. 3a). LPC-058 also displayed uniformly improved antibiotic activity (Fig. 3b, Extended Data Table 6): enhancements of 2- to 4-fold over LPC-011 and 5- to 55-fold over CHIR-090 were observed for *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Morganella morganii*. More pronounced improvements (5- to 25-fold over LPC-011 and 32- to >128-folds over CHIR-090) were observed for *Proteus mirabilis*, *Chlamydia trachomatis*, and *Acinetobacter baumannii*. The broad spectrum antibiotic activity of LPC-058 highlights the therapeutic potential of LpxC inhibitors as effective antibiotics against a wide range of Gram-negative infections.

With inclusion of three additional heavy atoms, LPC-058 designed from the cryptic inhibitor envelope dramatically enhanced the inhibitory effect and antibiotic activity over its parent compound LPC-011 and over CHIR-090. Although some features of the LpxC inhibitor envelope, such as the solvent accessible pocket at the C β position of the threonyl

head group, might be envisaged¹⁴, the precise definition of *two* accessory pockets at the O γ 1-position of the threonyl head group could not have been predicted by structural analysis alone. In fact, the most widely employed functional substitution of a pro-*R* methyl of LPC-037 is the trifluoromethyl group (CF₃), not the difluoromethyl group (CF₂) utilized in LPC-058. However, the trifluoromethyl substituted compound LPC-083 compromised the inhibitory effect ($K_i^* = 125 \pm 4$ pM) over the parent compound LPC-037 ($K_i^* = 14 \pm 1$ pM) by nearly 9-fold (Extended Data Table 4). Its inhibition constant was worse than LPC-011 by 5-fold (Fig. 3a), and it was a less potent antibiotic against *E. coli* (MIC=0.1 μ g/mL) than LPC-011 (MIC=0.04 μ g/mL), which would have argued away from development of the synthetically more challenging difluoromethyl-*allo*-threonyl compound LPC-058 designed from the cryptic inhibitor envelope.

The work presented here highlights the benefits of drug design from the “invisible”, but dynamically accessible inhibitor envelope in solution. The concept presented here should be broadly applicable to lead optimization campaigns for small molecules, peptides, and peptidomimetics to yield more effective therapeutics.

Methods:

Chemical Synthesis

Details of chemical synthesis and characterization are described in the supplementary information.

Crystallography structural analysis

Protein samples of AaLpxC and PaLpxC were prepared as described previously 16. Prior to crystallization trials, a 4-fold molar excess of each compound, dissolved in DMSO, was mixed with 8 mg/mL AaLpxC (1-275, C181A) in 100 mM potassium chloride, 2 mM DTT, and 25 mM HEPES (pH 7.0) or 12 mg/mL PaLpxC (1-299, C40S) in 50 mM sodium chloride, 2 mM TCEP, and 25 mM HEPES (pH 7.0), respectively. For PaLpxC, 10 mM zinc sulfate was added as a crystallization additive. The protein-inhibitor mixture was incubated for 30 min at room temperature to obtain a homogenous sample. All of the LpxC-inhibitor complex crystals were obtained by the sitting-drop vapor diffusion method at 20°C. Initial crystallization screening yielded microcrystals for the AaLpxC/LPC-011 complex in a reservoir solution containing 0.1 M HEPES (pH 7.0) and 15% PEG 8000 and for the AaLpxC/LPC-023 complex in a reservoir solution containing 0.18 M ammonium chloride, 11.8% PEG3350, and 4% 1,3-propanediol. The microcrystals were used to prepare seeding stocks by the Seed-Bead™ protocol (Hampton Research, HR2-320). Diffraction quality crystals were obtained by the streak seeding method. The final crystallization reservoirs contained 0.05 M ammonium acetate and 10% PEG3350 for the AaLpxC/LPC-011 complex and 0.18 M ammonium chloride, 11.8% PEG3350, and 10% 1,3-propanediol for the AaLpxC/LPC-023 complex, respectively. High quality crystals of the PaLpxC/LPC-040 and PaLpxC/LPC-058 complexes were obtained in precipitant solutions containing 0.1 M sodium acetate trihydrate (pH 4.8–5.1) and 2.4–2.6 M ammonium nitrate. Crystals were cryoprotected

using the corresponding mother liquor solutions containing 30% MPD for the AaLpxC/LPC-011 complex, 30% ethylene glycol for the AaLpxC/LPC-023 complex, and 10% glycerol for the PaLpxC/inhibitor complexes, respectively, before flash-freezing for data collection.

Datasets of the PaLpxC/LPC-040 and PaLpxC/LPC-058 complexes were collected in-house using a Rigaku MicroMax-007 HF rotating anode generator and R-Axis IV++ detector. Datasets of the AaLpxC/LPC-011 and AaLpxC/LPC-023 were collected at the SER-CAT 22-ID beamline at the Advanced Photon Source (APS) at Argonne National Laboratory. The collected X-ray diffraction data were processed using HKL2000 23 or XDS 24. The crystal structures of LpxC-inhibitor complexes were solved by molecular replacement with the program PHASER 25 using PDB entries 3P3C and 3P3E for the AaLpxC-inhibitor complexes and the PaLpxC-inhibitor complexes, respectively. Restraints of the inhibitors were generated by using eLBOW 26 and edited manually. Iterative model building and refinement was carried out using COOT 27 and PHENIX 28. The 2mFo-DFc omit maps 29 were generated using PHENIX 28.

Solution NMR measurements

Deuterated AaLpxC was expressed and purified as described previously 13. The AaLpxC-inhibitor complexes were prepared by adding individual inhibitors to the purified protein in the presence of 5% deuterated dimethylsulfoxide (d-DMSO) in a 1:2 protein-inhibitor molar ratio, and incubated initially at room temperature and then at 45°C to form the complex. Samples were concentrated and exchanged into three NMR buffers: (1) 25 mM sodium phosphate pH 6.0, 100 mM KCl, 5% d-DMSO, 100% D₂O; (2) 25 mM sodium phosphate pH 7.0, 100 mM KCl, 5% d-DMSO, 100% D₂O; (3) 25 mM deuterated Tris pH 8.5, 100 mM KCl, 5% d-DMSO, 100% D₂O. The NMR sample concentration was ~1 mM.

The scalar couplings of $^3J_{C'C}$ and $^3J_{NC}$ for the AaLpxC/CHIR-090 and AaLpxC/LPC-011 complexes were measured on a Bruker 700MHz NMR spectrometer at 45°C, using J-modulated 1H - ^{13}C constant-time HSQC experiments 30,31. The reference and scalar coupling-modulated CT-HSQC spectra were recorded in an interleaved manner with a constant-time delay (2T) set to 57.4 ms, and the maximum evolution time for the indirect (^{13}C) dimension set 12.1 ms. Data were processed using NMRPIPE 32 with eight-fold zero-filling in the indirect dimension. The peak intensities were measured by SPARKY 33, and the $^3J_{C'C}$ and $^3J_{NC}$ couplings were calculated from the ratio of the peak intensities between the reference spectrum (I_{ref}) and the J-modulated spectrum (I_{mod}) according to equation S1:

$$\frac{I_{mod}}{I_{ref}} = \cos(2\pi JT) \quad \text{Eq. [S1]}$$

Rotameric populations were calculated based on the three-site jump model 19 using values derived from self-consistent parameterization of 3J couplings 18.

The scalar coupling $^3J_{C\alpha C}$ for the AaLpxC/LPC-023 complex was measured on an Agilent 800MHz NMR spectrometer at 37°C using a J-modulated constant time ^{13}C HSQC experiment using selective Ile- $C\alpha$ inversion pulses. The $^3J_{C\alpha C\delta}$ coupling was calculated from the ratio of the peak intensities between the reference spectrum (I_{ref}) and the J-modulated spectrum (I_{mod}) according to equation S1. Since the $C\delta 1$ chemical shift of 15.2 ppm of LPC-023 excludes the *gauche*- $\chi 2$ rotamer 20, populations of the remaining rotamers were calculated from $^3J_{C\alpha C\delta 1}$ based on the two-site jump model between the *gauche*+ and *trans* rotameric states 20.

Enzymatic Assays

The radiolabeled substrate for the LpxC enzymatic assays, [α - 32 P] UDP-3-*O*-[(*R*)-3-hydroxymyristoyl]-*N*-acetylglucosamine, and the unlabeled carrier substrate were prepared as previously described 34. The assays were performed in a buffer consisting of 25 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mg/mL BSA, 2 mM DTT and 5 μ M substrate at 30°C. Serial two-fold dilutions of each inhibitor were prepared in DMSO and added to the reaction mixture with a 10-fold dilution. The assays were initiated by addition of purified LpxC protein into the reaction mix with 1:4 dilution to the final concentration as specified.

The KM value was determined by varying substrate concentrations from 0.4 to 50 μ M with 0.2 nM of LpxC. To study the slow, tight binding inhibition, LpxC activity was assessed in the presence of varying inhibitor concentrations. The product conversions were determined from 15 seconds up to 2 hours after addition of 0.2 nM enzyme. The following time-dependent equation was used to fit the data:

$$[P] = v_s t + \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} [1 - e^{-k_{obs} t}] + c \quad \text{Eq. [S2],}$$

with v_s representing the steady state rate, v_i the initial rate, k_{obs} the rate of transition from the initial encounter complex to the final complex, and c the baseline.

The K_i^* was determined by analyzing the rate of product accumulation after formation of the stable EI^* complex with an assay time window from 45 minutes to 2 hours. IC50 curves for individual compounds were determined in the presence of 20 pM of the enzyme and varying inhibitor concentrations. The Morrison's quadratic equation was used to fit the fractional activity data to determine K_i^{*app} :

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[E]_T + [I]_T + K_i^{*app} - \sqrt{([E]_T + [I]_T + K_i^{*app})^2 - 4[E]_T[I]_T}}{2[E]_T} \quad \text{Eq. [S3],}$$

where [E]T and [I]T represent the total enzyme and inhibitor concentrations, respectively. The inhibition constant K_i^* is converted from K_i^{*app} according to the following relationship:

$$K_i^* = K_i^{*app} / (1 + \frac{[S]}{K_M}) \quad \text{Eq. [S4]}$$

Measurements of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC assay protocol was adapted from methods described in National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) to using 96-well plates 35. Bacteria were grown in the Mueller-Hinton medium at 37°C in the presence of varying concentrations of inhibitors and 5% DMSO. In order to obtain more accurate readings of the MICs, three series of two-fold dilutions of inhibitors were used. The starting concentrations of the three series are different by factors of 1.33, and 1.67, respectively. MICs were reported as the lowest compound concentration that inhibited bacterial growth.

References:

- 1 Thanos, C. D., Randal, M. & Wells, J. A. Potent small-molecule binding to a dynamic hot spot on IL-2. *J Am Chem Soc* **125**, 15280-15281, doi:10.1021/ja0382617 (2003).
- 2 Carlson, H. A. & McCammon, J. A. Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Mol Pharmacol* **57**, 213-218 (2000).
- 3 Wagner, G. & Wuthrich, K. Dynamic model of globular protein conformations based on NMR studies in solution. *Nature* **275**, 247-248 (1978).
- 4 Eisenmesser, E. Z. *et al.* Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature* **438**, 117-121, doi:10.1038/nature04105 (2005).
- 5 Whittier, S. K., Hengge, A. C. & Loria, J. P. Conformational motions regulate phosphoryl transfer in related protein tyrosine phosphatases. *Science* **341**, 899-903, doi:10.1126/science.1241735 (2013).
- 6 Bhabha, G. *et al.* A dynamic knockout reveals that conformational fluctuations influence the chemical step of enzyme catalysis. *Science* **332**, 234-238, doi:10.1126/science.1198542 (2011).
- 7 Boehr, D. D., McElheny, D., Dyson, H. J. & Wright, P. E. The dynamic energy landscape of dihydrofolate reductase catalysis. *Science* **313**, 1638-1642, doi:10.1126/science.1130258 (2006).
- 8 Tzeng, S. R. & Kalodimos, C. G. Dynamic activation of an allosteric regulatory protein. *Nature* **462**, 368-372, doi:10.1038/nature08560 (2009).
- 9 Kimsey, I. J., Petzold, K., Sathyamoorthy, B., Stein, Z. W. & Al-Hashimi, H. M. Visualizing transient Watson-Crick-like mispairs in DNA and RNA duplexes. *Nature* **519**, 315-320, doi:10.1038/nature14227 (2015).

- 10 Frederick, K. K., Marlow, M. S., Valentine, K. G. & Wand, A. J. Conformational entropy in molecular recognition by proteins. *Nature* **448**, 325-329, doi:10.1038/nature05959 (2007).
- 11 Barb, A. W. & Zhou, P. Mechanism and inhibition of LpxC: an essential zinc-dependent deacetylase of bacterial lipid A synthesis. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **9**, 9-15 (2008).
- 12 Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635-700 (2002).
- 13 Coggins, B. E. *et al.* Structure of the LpxC deacetylase with a bound substrate-analog inhibitor. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 645-651 (2003).
- 14 Barb, A. W., Jiang, L., Raetz, C. R. & Zhou, P. Structure of the deacetylase LpxC bound to the antibiotic CHIR-090: Time-dependent inhibition and specificity in ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 18433-18438 (2007).
- 15 Whittington, D. A., Rusche, K. M., Shin, H., Fierke, C. A. & Christianson, D. W. Crystal structure of LpxC, a zinc-dependent deacetylase essential for endotoxin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8146-8150 (2003).
- 16 Lee, C. J. *et al.* Species-specific and inhibitor-dependent conformations of LpxC: implications for antibiotic design. *Chem. Biol.* **18**, 38-47, doi:10.1016/j.chembiol.2010.11.011 (2011).
- 17 Liang, X. *et al.* Syntheses, structures and antibiotic activities of LpxC inhibitors based on the diacetylene scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 852-860, doi:10.1016/j.bmc.2010.12.017 (2011).
- 18 Perez, C., Lohr, F., Ruterjans, H. & Schmidt, J. M. Self-consistent Karplus parametrization of 3J couplings depending on the polypeptide side-chain torsion χ_1 . *J Am Chem Soc* **123**, 7081-7093 (2001).

- 19 Hennig, M. *et al.* Side-chain conformations in an unfolded protein: chi1 distributions in denatured hen lysozyme determined by heteronuclear ¹³C, ¹⁵N NMR spectroscopy. *J Mol Biol* **288**, 705-723, doi:10.1006/jmbi.1999.2722 (1999).
- 20 Hansen, D. F., Neudecker, P. & Kay, L. E. Determination of isoleucine side-chain conformations in ground and excited states of proteins from chemical shifts. *J Am Chem Soc* **132**, 7589-7591, doi:10.1021/ja102090z (2010).
- 21 Meng, H., Clark, G. A. & Kumar, K. in *Fluorine in medicinal chemistry and chemical biology* (ed I. Ojima) Ch. 16, 411-446 (Blackwell Publishing Ltd, 2009).
- 22 Wang, J. *et al.* Fluorine in pharmaceutical industry: fluorine-containing drugs introduced to the market in the last decade (2001-2011). *Chem Rev* **114**, 2432-2506, doi:10.1021/cr4002879 (2014).
- 23 Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326 (1997).
- 24 Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125-132, doi:10.1107/S09074444909047337 (2010).
- 25 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658-674 (2007).
- 26 Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W. & Adams, P. D. electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **65**, 1074-1080, doi:10.1107/S09074444909029436 (2009).
- 27 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132 (2004).

- 28 Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213-221, doi:10.1107/S0907444909052925 (2010).
- 29 Terwilliger, T. C. *et al.* Iterative-build OMIT maps: map improvement by iterative model building and refinement without model bias. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **64**, 515-524, doi:10.1107/S0907444908004319 (2008).
- 30 Grzesiek, S., Vuister, G. W. & Bax, A. A simple and sensitive experiment for measurement of JCC couplings between backbone carbonyl and methyl carbons in isotopically enriched proteins. *J Biomol NMR* **3**, 487-493 (1993).
- 31 Vuister, G. W., Wang, A. C. & Bax, A. Measurement of Three-Bond Nitrogen-Carbon J Couplings in Proteins Uniformly Enriched in ¹⁵N and ¹³C. *J Am Chem Soc* **115**, 5334-5335 (1993).
- 32 Delaglio, F. *et al.* NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* **6**, 277-293 (1995).
- 33 Goddard, T. D. & Kneller, D. G. (Univeristy of California, San Francisco, 2008).
- 34 Jackman, J. E., Raetz, C. R. H. & Fierke, C. A. Site-directed mutagenesis of the bacterial metalloamidase UDP-(3-O- acyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC). Identification of the zinc binding site. *Biochemistry* **40**, 514-523 (2001).
- 35 (ed National Committee for Clinical Laboratory Standards) (1997).

Acknowledgments:

Diffraction data of LpxC-inhibitor complexes were collected at the Duke Macromolecular X-ray Crystallography Shared Resource and at the Southeast Regional Collaborative Access Team (SER-CAT) 22-ID beamline at the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, supported by the US Department of Energy, Office of Science and the Office of Basic Energy Sciences under Contract number W-31-109-Eng-38. NMR data were collected at the Duke University NMR Center. This work was supported by National Institutes of Health grants AI055588 and AI094475, and the Duke Bridge Fund awarded to P.Z.

The authors would like to acknowledge Dr. Bidong D. Nguyen and Dr. Raphael Valdivia for providing the MCC (minimal chlamydiacidal concentration) measurements of LpxC inhibitors against *Chlamydia trachomatis*, and Dr. Xin Chen for insightful discussions on compound synthesis.

Author information

Affiliations:

Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA

Chul-Jin Lee, Qinglin Wu, Javaria Najeeb, Jinshi Zhao, Eric J. Toone, Pei Zhou

Department of Chemistry, Duke University, Durham, NC 27708, USA

Xiaofei Liang, Ramesh Gopaldaswamy, Eric J. Toone, Pei Zhou

INSERM U1019; 4CNRS UMR8204; 5Institut Pasteur de Lille; 6Université de Lille; 7CHRU de Lille, Lille, France

Marie Titecat, Florent Sebbane, Nadine Lemaitre

Contributions

P.Z. conceived the project. C-J.L. and J.N. determined crystal structures of LpxC-inhibitor complexes; X.L. and R.G. synthesized LpxC inhibitors under the direction of E.J.T.; Q.W. performed NMR studies; J.Z. carried out enzymatic assays; and J.Z., C-J. L., M.T., F.S. and N.L. determined the antibiotic activities of LpxC inhibitors. P.Z. wrote the manuscript with critical inputs from all authors.

Competing financial interests

P.Z. and E.J.T. declare a competing financial interest: a patent on designed LpxC inhibitors was awarded to P.Z. and E.J.T.

Corresponding authors

*Correspondence to: peizhou@biochem.duke.edu

The coordinates for the X-ray structures have been deposited to the Protein Data Bank (PDB) with accession codes of AAAA, BBBB, CCCC, and DDDD for the AaLpxC/LPC-011, PaLpxC/LPC-040, AaLpxC/LPC-023, and PaLpxC/LPC-058 complexes, respectively.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 | Dynamic access of minor conformational states of LpxC inhibitors containing the threonyl head group.

a, Crystal structure of the AaLpxC/LPC-011 complex, showing a single *trans* χ_1 rotamer of the threonyl sidechain of the inhibitor. AaLpxC is shown in the cartoon model and catalytically important residues in the stick model. LPC-011 is shown in the stick model, with the purple mesh representing the inhibitor omit map ($2mFo-DFc$) contoured at 1.0σ . **b**, NMR measurements of scalar couplings ($^3J_{NC\gamma_2}$ and $^3J_{C'\gamma_2}$) of the threonyl-head-group-containing LpxC inhibitors CHIR-090 (orange) and LPC-011 (blue) reveal a dynamic distribution of all three rotameric χ_1 states. **c**, Combining the two most-populated ligand states creates a dynamically accessible inhibitor envelope around the $C\beta$ atom of the threonyl head group. **d**, The $C\beta$ -triply-substituted compound LPC-040 occupies all three pockets within the inhibitor envelope. PaLpxC is shown in the cartoon model, with catalytically important residues shown in the stick model. Residue numbering reflects the corresponding residues in AaLpxC, with PaLpxC residue numbers shown in parentheses. LPC-040 is shown in the stick model, with the purple mesh representing the inhibitor omit map ($2mFo-DFc$) contoured at 1.0σ . **e**, Inhibition constants (K_i^*) of LpxC inhibitors. Chemical substitutions at the $C\beta$ -position of the inhibitors and their observed (LPC-011 and LPC-040) and predicted (LPC-037) binding modes within the inhibitor envelope are labeled.

Figure 2 | Expanded inhibitor envelope enables the design of a potent inhibitor, LPC-058.

a, Crystal structure of AaLpxC in complex with LPC-023, an isoleucine derivative, reveals a *gauche+* χ_2 rotamer conformation of the inhibitor. AaLpxC is shown in the cartoon model and catalytically important residues in the stick model. LPC-023 is shown in the stick model, with the purple mesh representing the inhibitor omit map ($2mFo-DFc$) contoured at 1.0σ . **b**, Combined measurements of the $C\delta_1$ chemical shift and the $^3J_{C\alpha C\delta_1}$ coupling of

LPC-023 in the protein-bound complex reveals a dynamic equilibrium between *gauche+* and *trans* χ_2 rotameric states, with the *gauche+* state being the predominant conformation (~75% population) and the *trans* state being the minor conformation (~25%). **c**, Design and structural validation of LPC-058 that optimally occupies the inhibitor envelope. PaLpxC is shown in the cartoon model and catalytically important residues are shown in the stick model. Residue numbering reflects the corresponding residues of AaLpxC, with PaLpxC numbers shown in parentheses. LPC-058 is shown in the stick model, with the purple mesh representing the inhibitor omit map ($2mF_o-DF_c$) contoured at 1.1σ .

Figure 3 | LPC-058 is a superior inhibitor compared to the parent compounds LPC-011 and CHIR-090. **a**, Inhibition constants of CHIR-090, LPC-011, LPC-058, and LPC-083. The head group of each compound and its conformation within the inhibitor envelope is denoted. **b**, LPC-058 is a potent antibiotic and displays enhanced activity over LPC-011 against a diverse array of Gram-negative pathogens. MIC enhancement over 4-fold is labeled. Tested bacterial species include *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Salmonella typhimurium* (St), *Vibrio cholerae* (Vc), *Klebsiella pneumoniae* (Kp), *Enterobacter cloacae* (Ent), *Morganella morganii* (Mm), *Proteus mirabilis* (Pm), *Chlamydia trachomatis* (Ct), and *Acinetobacter baumannii* (Ab).

Figures

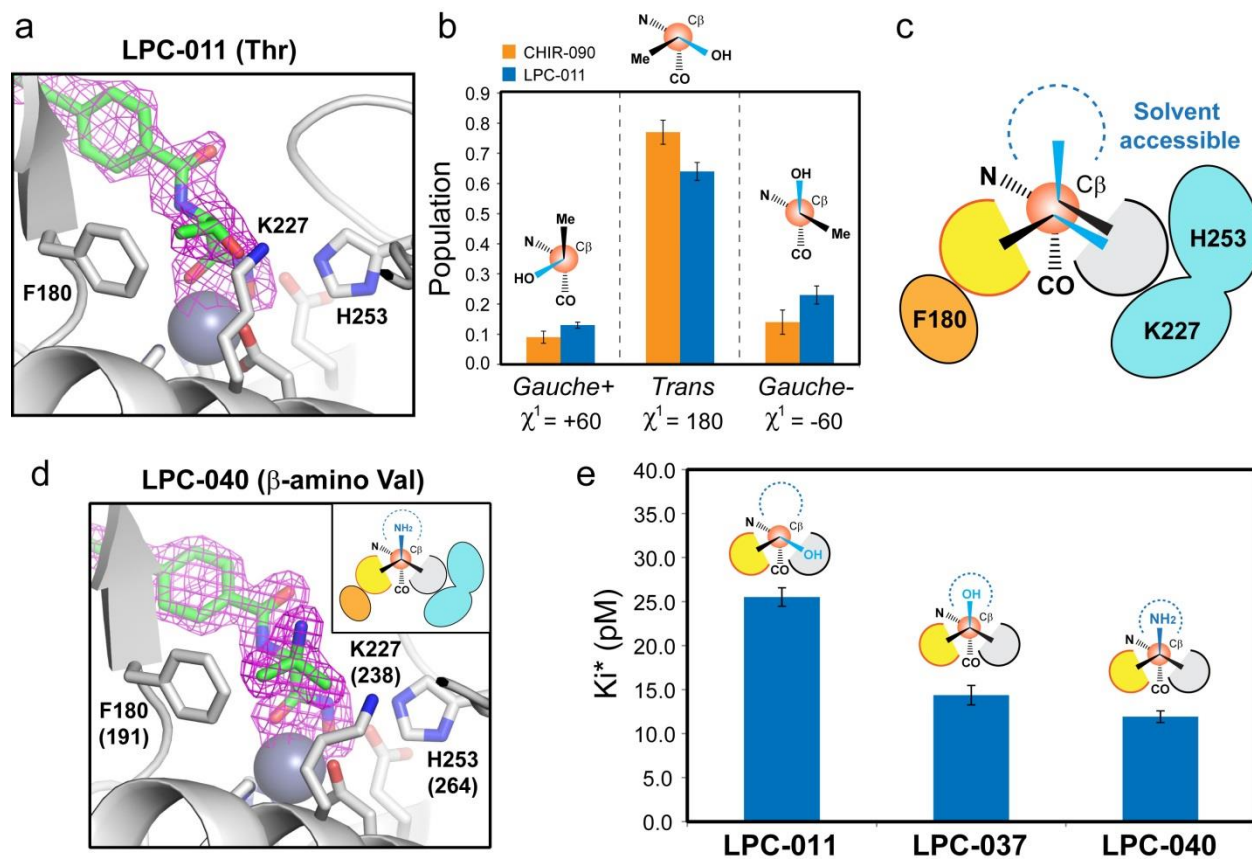


Figure 1.

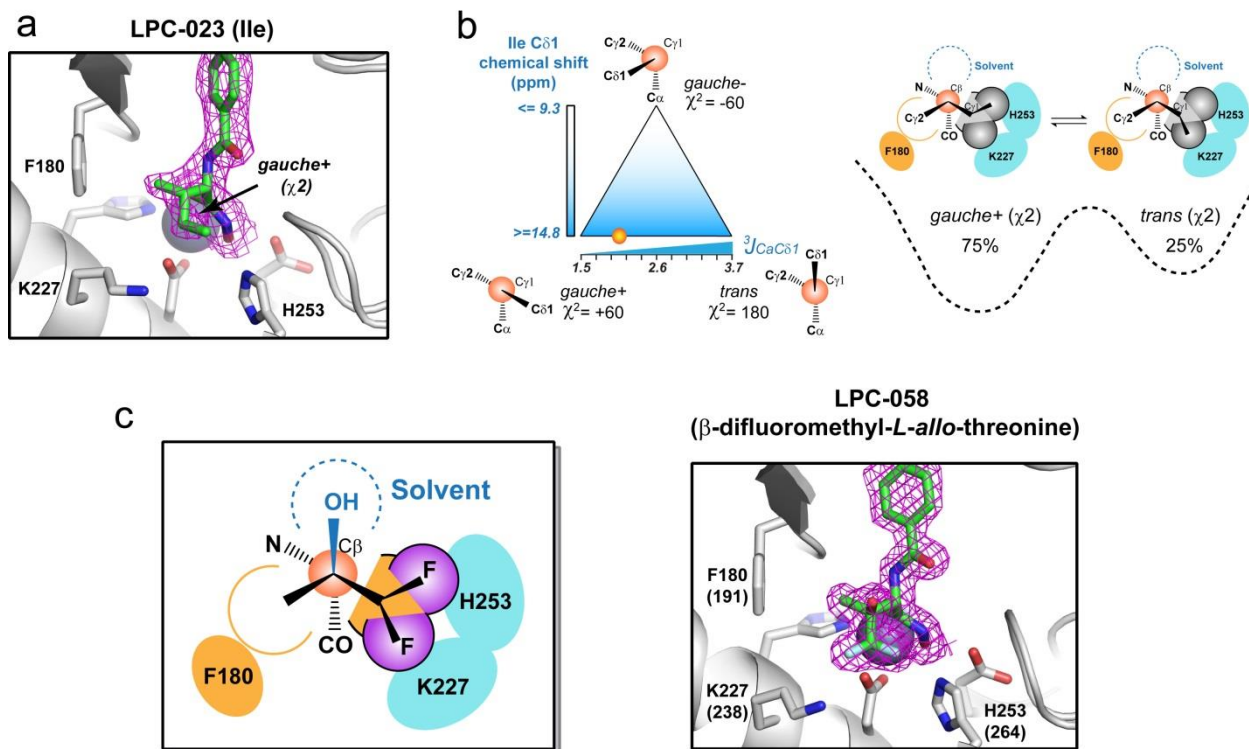


Figure 2.

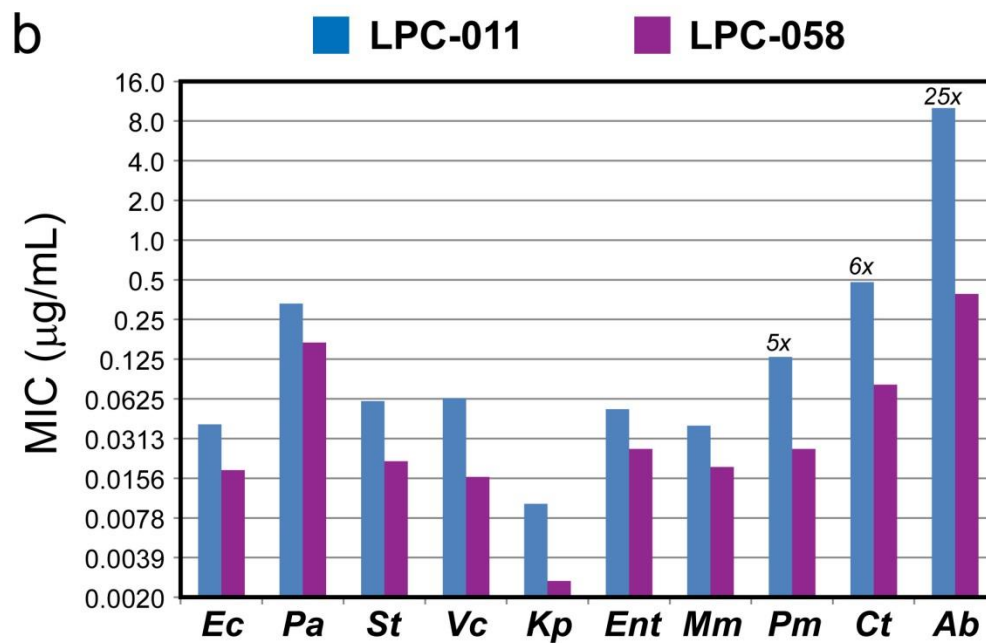
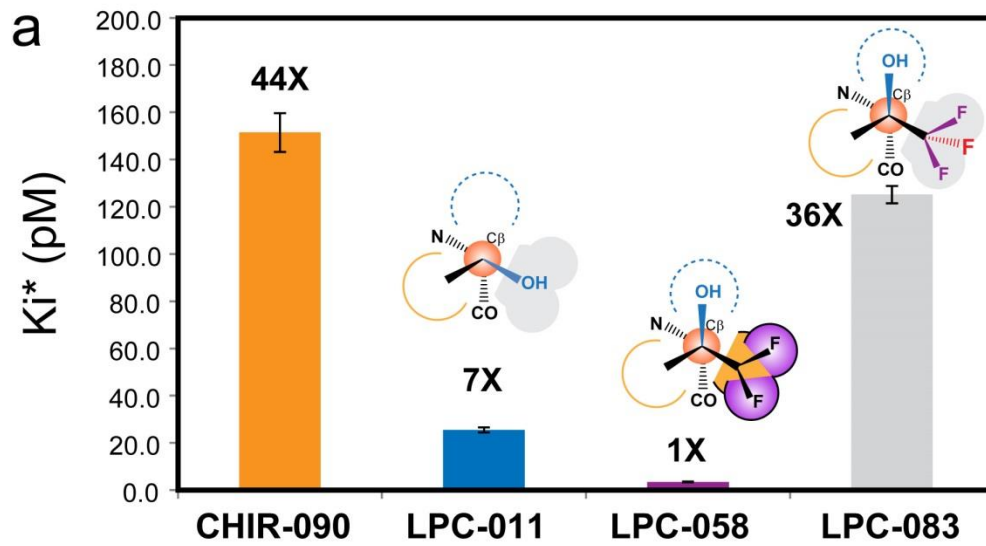


Figure 3.

Extended Data Figures and Tables

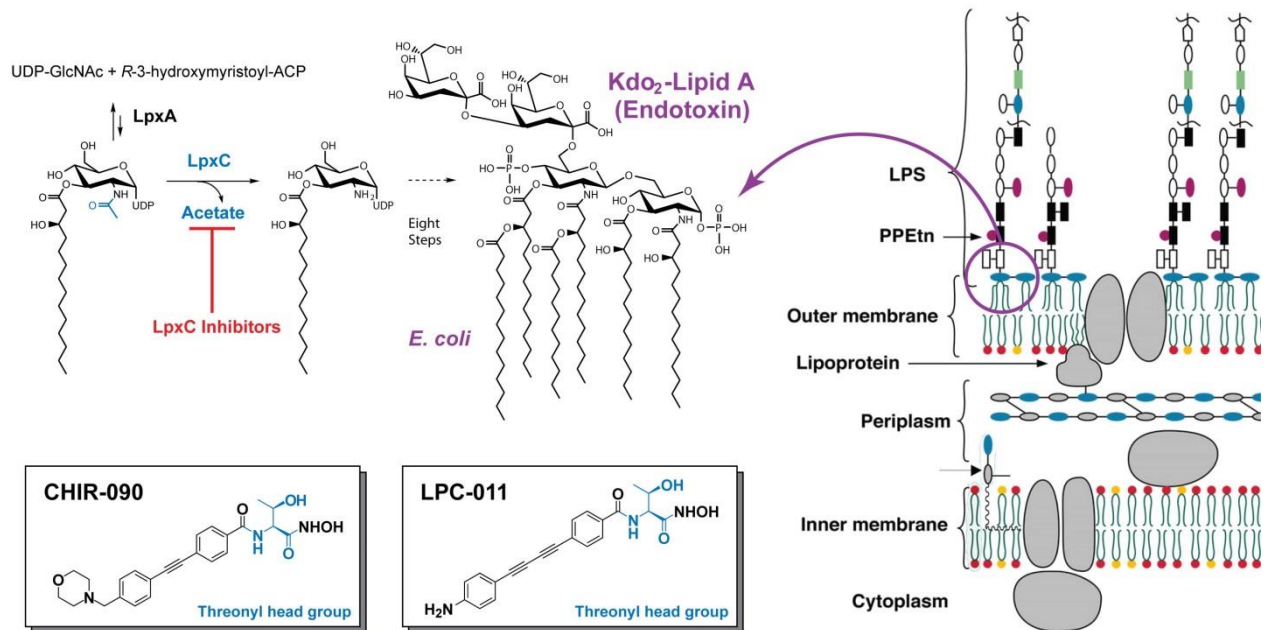


Figure 1 | LpxC-targeting antibiotics disrupt the biosynthesis of lipid A. Lipid A is the hydrophobic anchor of lipopolysaccharide (LPS) and the predominant lipid species in the outer leaflet of the outer membrane of Gram-negative bacteria.

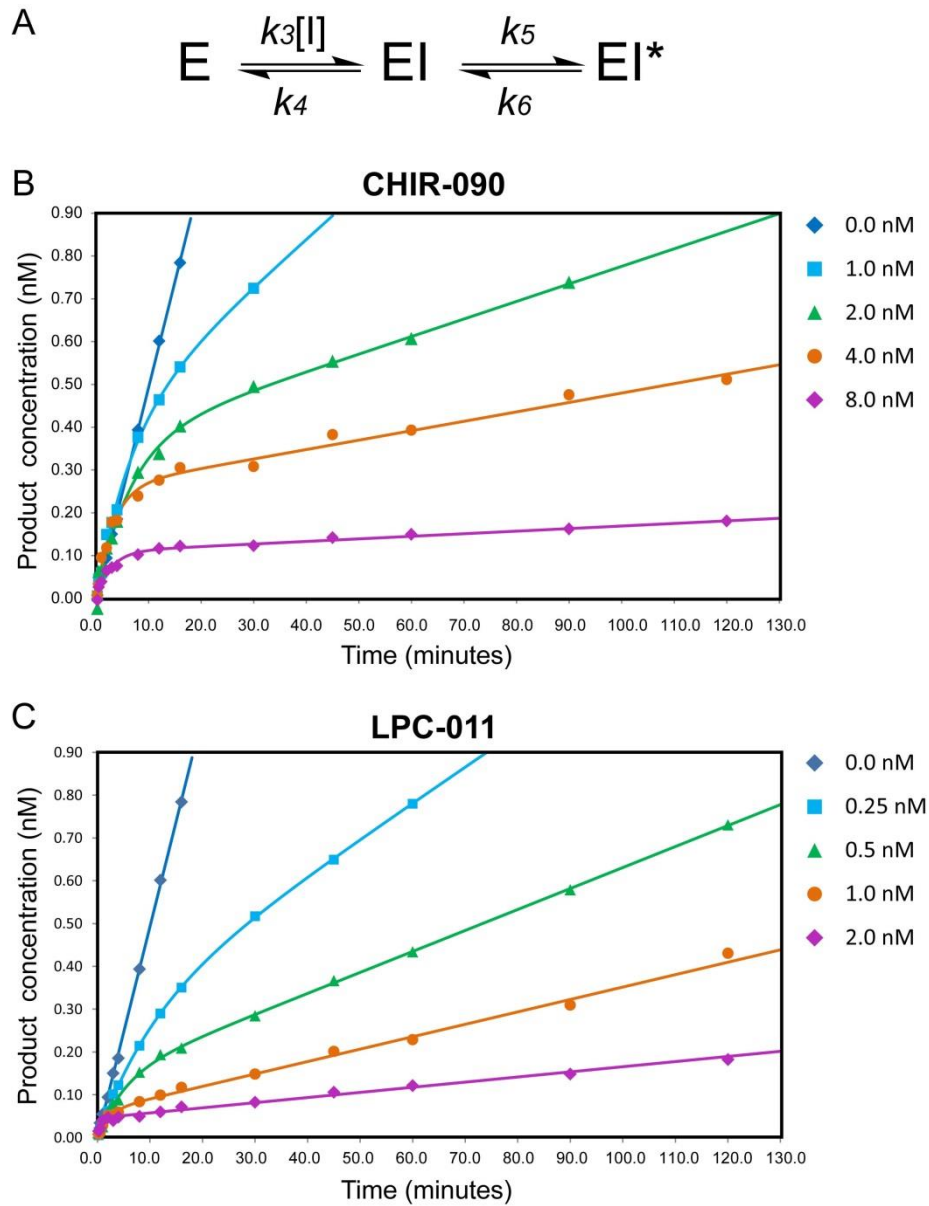


Figure 2 | Time-dependent inhibition of EcLpxC by CHIR-090 and LPC-011. **a**, Two-step slow-binding kinetics of LpxC inhibitors. Panels **b** and **c** show nonlinear LpxC product accumulation in the presence of varying concentrations of CHIR-090 and LPC-011, respectively, reflecting the transition from the initial enzyme-inhibitor encounter complex (EI) to the stable complex (EI*).

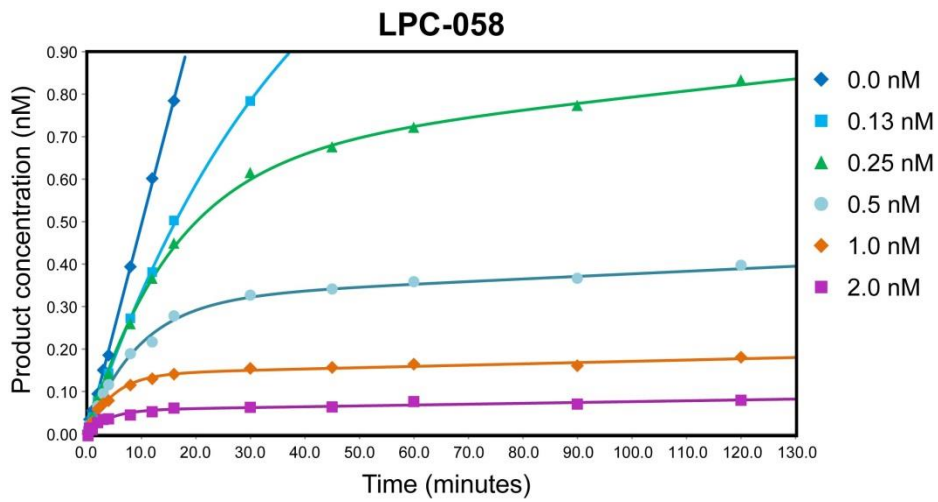


Figure 3 | Time-dependent inhibition of EcLpxC by LPC-058. EcLpxC displays nonlinear product accumulation in the presence of varying concentrations of LPC-058, reflecting the transition from the initial enzyme-inhibitor encounter complex (EI) to the stable complex (EI*).

Table 1: Chemical structures of LpxC inhibitors

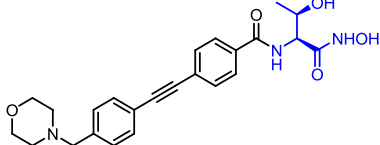
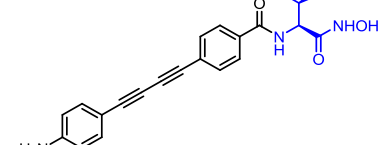
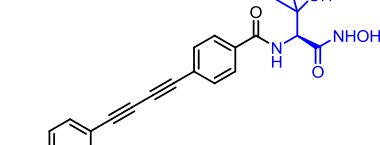
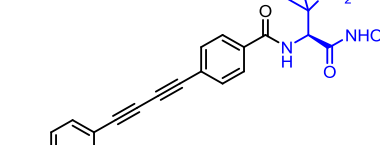
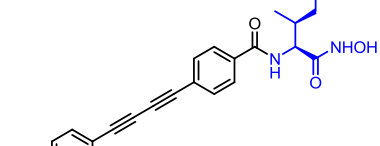
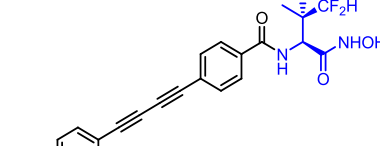
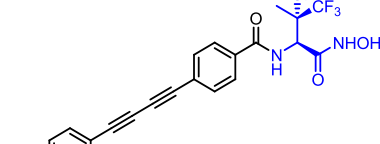
Name	Structure	Name	Structure
CHIR-090 (Thr)		LPC-011 (Thr)	
LPC-037 (β-hydroxy-Val)		LPC-040 (β-amino-Val)	
LPC-023 (Ile)		LPC-058	
LPC-083			

Table 2. Data collection and refinement statistics*

Data Collection	AaLpxC/LPC-011	PaLpxC/LPC-040	AaLpxC/LPC-023	PaLpxC/LPC-058
Resolution range	67.94 - 2.01 (2.08 - 2.01)	50.00 - 1.63 (1.66 - 1.63)	50.00 - 1.84 (1.87 - 1.84)	28.32 - 1.59 (1.68 - 1.59)
Space group	P 21 21 21	P 21 21 21	P 1	P 21 21 21
Cell dimensions				
a, b, c (Å)	54.8, 74.8, 135.9	52.4, 74.0, 88.6	45.7 50.4 61.7	52.8, 73.9, 88.2
α, β, γ	90, 90, 90	90, 90, 90	80.3, 71.7, 88.9	90, 90, 90
Unique reflections	36885 (3708)	46824 (2314)	43313 (2124)	47165 (6421)
Redundancy	14.4 (11.1)	6.3 (6.6)	4.4 (4.4)	5.0 (4.8)
Completeness (%)	97.2 (92.1)	99.7 (99.6)	97.6 (95.9)	98.1 (95.3)
Mean (I/ σ I)	21.67 (5.05)	16.56 (4.25)	24.5 (3.2)	15.01 (2.45)
Wilson B-factor	16.52	21.80	27.20	21.26
R-merge (%)	11.9 (51.3)	5.4 (40.3)	5.3 (31.1)	4.7 (42.4)
Refinement				
Resolution range	67.94 - 2.01 (2.08 - 2.01)	17.81 - 1.63 (1.689 - 1.63)	34.81 - 1.89 (1.96 - 1.89)	28.32 - 1.59 (1.65 - 1.59)
R-work/R-free	0.156/0.186	0.170/0.203	0.153/0.189	0.179/0.210
Number of non-hydrogen atoms	4840	2742	4644	2690
macromolecules	4370	2332	4319	2328
ligands	70	147	61	101
water	400	263	264	261
Protein residues	536	296	536	296
RMS(bonds)	0.002	0.009	0.008	0.004
RMS(angles)	0.69	1.16	1.13	0.80
Ramachandran				
Favored (%)	96.8	97.4	96.8	97.7
Outliers (%)	0.0	0.0	0.2	0
Clashscore	2.37	2.28	2.75	1.05
Average B-factor	21.90	26.60	35.10	26.50
macromolecules	20.80	24.80	34.70	25.50
ligands	29.30	37.20	37.40	31.80
solvent	31.90	36.60	41.50	33.70

*: Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

Table 3. Scalar couplings ($^3J_{C'CH_2}$ and $^3J_{NCH_2}$) and rotameric populations of CHIR-090 and LPC-011

Compounds	$^3J_{C'CH_2}$ (Hz)	$^3J_{NCH_2}$ (Hz)	$^1P_{trans}$	$^1P_{gauche-}$	$^1P_{gauche+}$
CHIR-090	0.67 ± 0.05	0.44 ± 0.06	0.77 ± 0.04	0.14 ± 0.04	0.09 ± 0.02
LPC-011	0.78 ± 0.03	0.59 ± 0.06	0.64 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.13 ± 0.01

Table 4: K_i^* values of LpxC inhibitors

Compounds	CHIR-090	LPC-011	LPC-037	LPC-040	LPC-058	LPC-083
K_i^* (pM)	152 ± 8	26 ± 1	14 ± 1	12 ± 1	3.5 ± 0.2	125 ± 4

Table 5. Scalar couplings ($^3J_{CCH_2}$ and $^3J_{CCH_2C}$) and rotameric populations of LPC-023

pH	$C_{\alpha 1}$ Shift (ppm)	$^3J_{CCH_2}$ (Hz)	$^2P_{trans}$	$^2P_{gauche+}$
7.0	15.2	2.05 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.75 ± 0.02

Table 6. MIC values of LpxC inhibitors

Bacterial Strains	CHIR-090 MIC ($\mu\text{g/mL}$)	LPC-011 MIC ($\mu\text{g/mL}$)	LPC-058 MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Enhancement (MICLPC-011/ MICLPC-058)	Enhancement (MICCHIR-090/ MICLPC-058)
<i>E. coli</i> W3110	0.13	0.04	0.018	2.2	7.2
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0.83	0.33	0.167	2.0	5.0
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	0.25	0.06	0.021	2.8	12
<i>Vibrio cholerae</i> P4 (P27459DctxAB::KmR, SmR)	0.50	0.063	0.016	3.9	31
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10031	0.033	0.01	0.0026	3.8	13
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.31	0.052	0.026	2.0	12
<i>Morganella morganii</i>	1.04	0.039	0.019	2.0	55
<i>Proteus mirabilis</i>	0.83	0.13	0.026	5.0	32
<i>Chlamydia trachomatis</i> *	8	0.48	0.08	6.0	100
<i>Acinetobacter baumannii</i> 17978	>50	10	0.39	25	>128

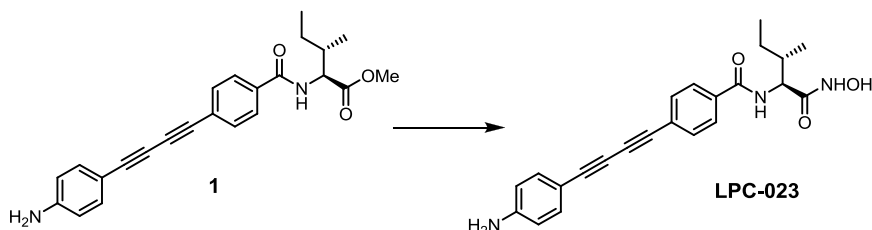
*Minimal chlamydiacidal concentration (MCC)

Supplemental Information

Compound Synthesis

The synthesis of CHIR-090, isotope labeled CHIR-090, and LPC-011 was reported previously 1,2. Synthesis of the remaining compounds is outlined below.

Synthesis of LPC-023:

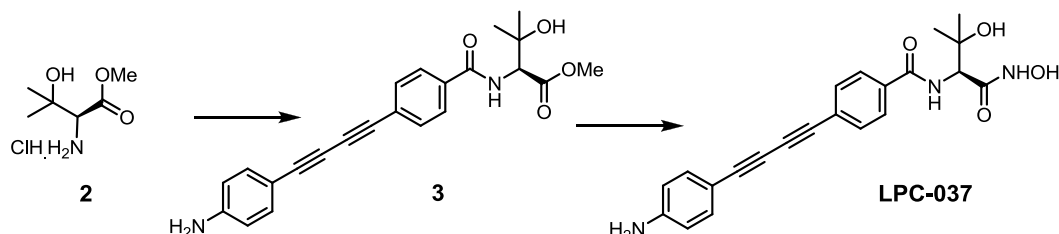


Compound **1**: Methyl (2S, 3R)-2-({4'-[4'-(4'-aminophenyl)buta-1',3'-diyn-1'-yl]phenyl} formamido)-3'-methylpentanoate. To a stirred mixture of 4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyn-1-yl)benzoic acid **3** (100 mg, 0.38 mmol) and L-Isoleucine methyl ester hydrochloride (98 mg, 0.54 mmol, 1.40 equiv) in anhydrous DMF (5 mL) was added N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (103 mg 0.54 mmol, 1.40 equiv), 1-hydroxybenzotriazole (73 mg, 0.54 mmol, 1.40 equiv) at room temperature. The mixture was cooled with an ice-bath, and diisopropylethylamine (0.27 mL, 1.53 mmol, 4 equiv) was added. The reaction mixture was stirred under argon and at 0°C for 1h, and then was allowed to warm to temperature with the stirring continued for additional 14h. The resulting yellow solution was condensed to dryness with a rotary evaporator, and the residue was treated with water (20 mL) and extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined extracts were washed with brine (20 mL), and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of the solvent afforded the crude products, which was purified by flash chromatography (eluting with 1-2% MeOH in DCM) to afford **1** (134 mg, 91% yield) as yellow solid. NMR: ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 0.82-0.89 (m, 6H), 1.19-1.27 (m, 1H), 1.46-1.49 (m, 1H), 1.92-1.95 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 4.32 (t, *J*=15.3 Hz, 1H), 5.84 (s, 2H), 6.53 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.24 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.63 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.88 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 8.72 (d, *J*=7.5 Hz, 1H); ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 11.55, 16.19, 25.91, 36.28, 52.34, 58.12, 71.77, 77.35, 80.82, 86.40, 105.80, 114.26, 124.87, 128.74, 132.59, 134.71, 151.57, 166.73, 172.87; LC-MS: [M+H]⁺ 389.

Compound **LPC-023**: (2S,3R)-2-({4'-[4'-(4'-aminophenyl)buta-1',3'-diyn-1'-yl]phenyl} formamido)-N-hydroxy-3-methylpentanamide. To an ice-cold solution of **1** (100 mg, 0.26 mmol) dissolved in anhydrous MeOH (1 mL) and THF (1 mL) was added hydroxylamine hydrochloride (93 mg, 1.34 mmol, 5.0 equiv) followed by 25% sodium methoxide in methanol solution (0.49 mL, 2.03 mmol, 7.5 equiv). The reaction mixture was stirred under argon and at 0°C for 2h, and then was allowed to warm to ambient temperature with the stirring continued overnight (14h). The resulting yellow suspension was condensed to dryness with a rotary evaporator, and the residue was treated with water (30 mL), extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined extracts were washed with brine (20 mL), and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by CombiFlash silica gel chromatography (eluting with 2-5% MeOH in DCM) to afford the product (60 mg, 60% yield) as yellow solid. NMR: ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 0.78-0.85 (m, 6H), 1.12-1.16 (m, 1H), 1.46-1.53 (m, 1H), 1.88-1.93 (m, 1H), 4.14 (t, *J*=18.3

Hz, 1H), 5.84 (s, 2H), 6.53 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.88 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 8.55 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.88 (s, 1H), 10.74 (s, 1H); ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 11.17, 16.00, 25.56, 35.97, 56.13, 71.80, 77.22, 80.86, 86.32, 105.82, 114.26, 124.63, 128.64, 132.54, 134.70, 135.04, 151.55, 166.03, 168.36; HRMS: calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ 389.1739; found 389.1731 M^+ .

Synthesis of LPC-037



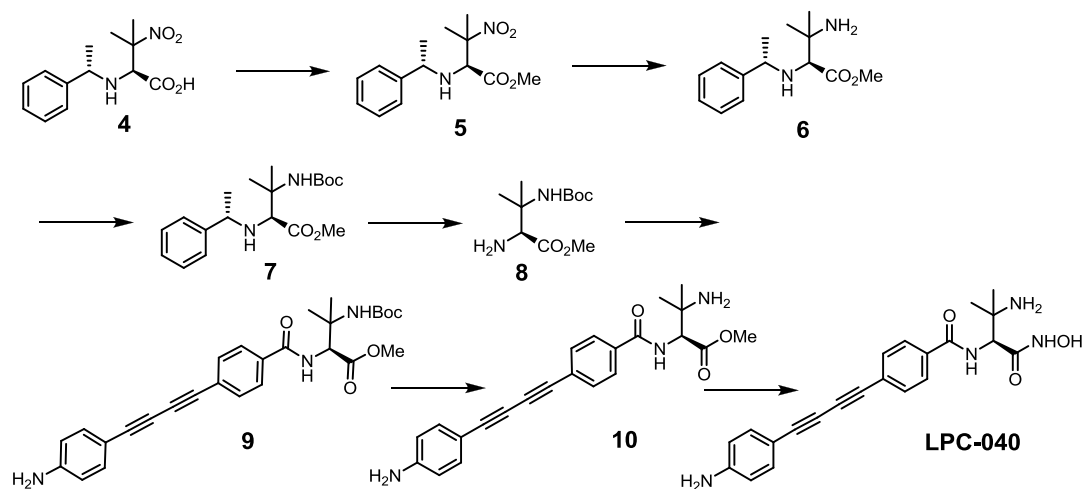
Compound 2: Methyl (S)-(+)-2-amino-3-hydroxy-3-methylbutanoate. To an ice-cold anhydrous MeOH (8 mL) was added dropwise thionyl chloride (0.54 mL, 7.51 mmol, 2.0 equiv), and the solution was stirred at rt for 5 min. (S)-(+)-2-amino-3-methylbutanoic acid (500 mg, 3.76 mmol) was then added to the solution in one portion, and then the reaction mixture was heated at 70°C for 2h. LC-MS analysis showed the completion of the reaction. After the resulting mixture was cooled to ambient temperature, the solvents were evaporated to dryness and then pumped under high vacuum for 4h, obtaining the crude **2** (619 mg, 90% yield) as white solid. NMR: ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 1.25 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.92 (s, 1H); ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ 23.71, 27.43, 52.50, 61.81, 69.19, 167.97; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 148.2.

Compound 3: (S)-Methyl 2-(4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diynyl)benzamido)-3-hydroxy-3-methylbutanoate. To a stirred mixture of compound 4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyn-1-yl)benzoic acid **3** (200 mg, 0.76 mmol) and compound **2** (300 mg, 0.91 mmol, 1.20 equiv) in anhydrous DMF (5 mL) was added EDC.HCl (204 mg 1.07 mmol, 1.20 equiv), HOBt (145mg, 1.87 mmol, 1.20 equiv) at rt. The reaction mixture was cooled with an ice-bath, and diisopropylethylamine (1.06 mL, 7.12 mmol, 8.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred under argon at 0°C for 1h, and then was allowed to warm to ambient temperature with the stirring continued for additional 14h. The resulting yellow solution was condensed to dryness with a rotary evaporator, and the residue was treated with water (50 mL). The mixture was extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined extracts were washed with water (30 mL), brine (30 mL) and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Evaporation of the solvent was afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with 0-6% MeOH in DCM) to afford **6** (240 mg, 80% yield) as red solid. NMR: ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 1.32 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 4.64 (s, 1H), 6.61 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.83 (d, $J=8.7$ Hz, 2H); ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ 26.11, 26.41, 51.48, 61.60, 70.83, 71.38, 76.78, 79.01, 84.67, 108.30, 114.24, 126.14, 127.54, 132.16, 133.86, 150.21, 168.08, 177.11; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 391.

Compound LPC-037: (2S)-2-({4'-[4'-(4'-aminophenyl)buta-1',3'-diyn-1'-yl]phenyl}formamido)-N,3'-dihydroxy-3'-methylbutanamide. To an ice-cold solution of compound **3** (120 mg, 0.31 mmol) dissolved in anhydrous MeOH (1 mL) and THF (1 mL) was added hydroxylamine hydrochloride (107 mg, 1.54 mmol 5.0 equiv), followed by 25% sodium methoxide in methanol solution (0.54 mL, 2.30 mmol, 7.5 equiv). The reaction was stirred under argon and at 0°C for 2h, and then was allowed to warm to room temperature with

stirring continued overnight (14h). The resulting yellow suspension was condensed to dryness with a rotary evaporator, and the residue was treated with water (20 mL). The mixture was extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent afforded the crude product, which was purified by CombiFlash silica gel chromatography (eluting with MeOH in DCM 0-7%) to give the product as yield solid (86.5 mg, yield 72.0%). NMR: ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.27 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 4.50 (s, 1H), 6.61 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.24 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.58 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.85 (d, *J*=8.4 Hz, 2H); ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 25.78, 26.07, 58.80, 70.74, 71.54, 76.68, 78.95, 84.60, 108.28, 114.21, 126.09, 127.55, 132.12, 133.82, 150.24, 167.83, 168.07; HRMS: calculated for C₂₂H₂₁N₃O₄H⁺ 392.1610; found 392.1607 [M+H]⁺.

Synthesis of LPC-040



Compound **4**: (S)-3-Methyl-3-nitro-2-((S)-1-phenylethylamino)butanoic acid. 2-nitropropane (18.5 mL, 0.206 mmol, 1.02 equiv) and water (200 mL) were placed under argon in a 500 mL flask with stirring. Potassium hydroxide (13.60 g, 0.24 mmol, and 1.20 equiv) was added all at once. The flask was placed in a regulated oil bath and heated to 45°C. (S)-(-)- α -methylbenzylamine (25.0 g, 0.206 mmol, 1.02 equiv) was added very quickly (very fast CO₂ absorption). The reaction mixture was maintained at 44-46°C with vigorous stirring, as glyoxylic acid (50% aq, 18.60 g, 0.202 mmol) was added slowly dropwise (60 min, slowest for the last one-third) via a syringe. The reaction mixture became cloudy, then clear, and when the solid began forming again the addition was slowed down. After completion of the addition, the reaction was stirred for an additional 3 h under argon at 35 °C, and stirred swiftly as 3M aq hydrochloric acid (152 mL, 0.46 mmol) was added dropwise (over 30 min). The resulting thick off-white suspension was stirred overnight (12 h) at rt. The cooled suspension was filtered with suction, and the filter cake was rinsed with dilute aqueous HCl (0.2M, 0.5 L), water (0.5 L) and diethyl ether (0.125 L). The solid in the filter cake was dried by suction, and then dried under high vacuum for 3h at 50°C to get a slightly off-white power (27 g, 50% yield).

Purification of 3-methyl-3-nitro-(2(S)-(1(S)-phenylethyl-amino))-butyric acid **4**. 3M HCl (63 mL), water (0.72 L) and acetic acid (88 mL) were placed in an Erlenmeyer flask and stirred well as it as immersed in a 60°C bath and warmed to 40-50°C (internal). When the solution was up to the temperature, 3-methyl-3-nitro-(2(s)-(1(s)-phenylethyl-amino))-butyric acid, dissolved in warm DMSO (dry, 40 mL) and acetic acid (25 mL), was added dropwise to the warm acid DMSO solution in the Erlenmeyer flask. The suspension was then filtered under

vacuum and the filter cake was washed with ethyl ether (125 mL) and dried in vacuo. The solids then transferred to room temperature and dried under full vacuum for 12h (85% yield).

Second purification of 3-methyl-3-nitro-(2(S)-(1(S)-phenylethyl-amino))-butyric acid **4**. A solution of dilute aqueous hydrochloric acid (3.0M, 40 mL), water (500 mL) and acetic acid (80 mL) was placed in a 1L Erlenmeyer flask and stirred well as it was immersed in a 45-60°C bath and warmed to 40 °C (internal). A solution of 3-methyl-3-nitro-(2(s)-(1(s)-phenylethyl-amino))-butyric acid (5.10 g) in warm anhydrous DMSO (40 mL) and acetic acid (25 mL) was added dropwise to the Erlenmeyer flask. Upon complete addition, the suspension was stirred and placed in a 0°C bath to cool room temperature. The suspension was then filtered by suction and rinsed with dilute aqueous hydrochloric acid (0.2M, 500 mL), water (1 L), isopropanol (40 mL) and diethyl ether (125 mL). The filter cake was dried under vacuum for 14h. After that, the solid was dried at 50 °C under high vacuum for 3h to yield **4** as white powder (5.00 g, 98%). NMR 1H (300 MHz, DMSO-d6) δ 1.21 (d, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 3.62 (q, $J=12.6$ Hz, 1H), 7.17-7.31 (m, 5H); 13C (75 MHz, DMSO-d6) δ 22.48, 24.05, 25.60, 57.14, 65.50, 98.69, 127.62, 127.81, 128.91, 144.85, 173.06; LC-MS: [M+H]⁺+267.

Compound **5**: Methyl (2S)-3-methyl-3-nitro-2-([(1'S)-1'-phenylethyl]amino)butanoate. In an oven-dried 100 mL flask with a stir bar was charged with **4** (3.00 g, 11.3 mmol) and cesium carbonate (3.85 g, 11.82 mmol, 1.05 equiv) under argon with rapid stirring. Dimethylformamide (10 mL) was added rapidly and stirred for 10 min. After the reaction mixture was cooled to 0°C, iodomethane (0.81 g, 13.00 mmol, 1.15 equiv) was added dropwise over 15 min. The reaction mixture was stirred under argon and at 0°C for 1h, and was allowed to warm to ambient temperature with stirring continued for 12h. The reaction was washed with EtOAc and water into a separate funnel containing EtOAc (100 mL), water (20 mL) and 3.0 M aq hydrochloric acid. The organic layer was separated. And the aqueous layer was adjusted pH to 7-8 and extracted with EtOAc (2×100 mL). The combined organic phases were washed with 3% Li2SO4 (3×30 mL), half-saturated aq NaHCO3 (30 mL) and brine (30 mL) and dried over anhydrous Na2SO4. The solvent was concentrated to give amber oil (2.93 g, 93% yield). NMR: 1H (300 MHz, CDCl3) δ 1.33 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 2.06 (s, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 7.21-7.35 (m, 5H); 13C (75 MHz, CDCl3) δ 22.39, 24.02, 25.12, 52.55, 57.39, 65.20, 89.33, 127.43, 127.75, 128.64, 143.67, 172.67; LC-MS: [M+H]⁺+ 281.

Compound **6**: Methyl (2S)-3-amino-3-methyl-2-([(1'S)-1'-phenylethyl]amino)butanoate. Compound **5** (2.83 g, 10.0 mmol) dissolved in anhydrous THF (30 mL) and glacial acetic acid (45 mL) along with activated powdered molecular sieves 4Å (3.4 g) was stirred gently for 3h under argon. The flask was then immersed in 0°C bath and stirred well for 20 min. To the cold reaction mixture was added zinc dust (5.85 g, 90.0 mmol, 10.0 equiv). The mixture reaction was stirred at 0°C for 2h, and was allowed warm to ambient temperature with stirring continued for 16h. The mixture was then diluted with THF (40 mL), filtered through a celite pad and was washed with additional THF (100 mL). The filtrate was concentrated in vacuo to yield a slightly yellow oily solid. This material was dissolved in 3:1 chloroform/isopropanol (100 mL) and 0.25 EDTA solutions at pH 10.5-11 (60 mL). Additional 4M NaOH solution was added in portions to reach pH=10.5-11.0. The contents were thoroughly shaken, and the aqueous phase separated. The organic phase was then washed with 0.25 EDTA pH=10.5-11.0 (50 mL), brine (40 mL), dried (Na2SO4), filtered and evaporated under reduced pressure, followed with heptane (3×40 mL) and evaporation to yield a light-amber oil, which was purified by CombiFlash (eluting with MeOH in DCM 0-7%) to afford **6** as colorless oil (1.76g, 68% yield). NMR: 1H (300 MHz, CDCl3) δ 1.00 (s, 1H), 1.05 (s, 1H), 1.32 (d, $J=6.6$

Hz, 3H), 2.74 (s, 1H), 3.56 (q, $J=13.2$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 7.21-7.30 (m, 5H); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 25.68, 27.34, 27.90, 51.55, 51.81, 57.25, 68.54, 127.32, 128.58, 145.02, 176.05; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 251.

Compound 7: Methyl (2S)-3-[[tert-butoxy]carbonyl]amino-3-methyl-2-[[1[']S]-1[']-phenylethyl]amino}butanoate. The compound **6** (1.70 g, 6.8 mmol) was dissolved in anhydrous THF (20 mL) under argon, and diisopropylethylamine (1.30 mL, 7.5 mmol, 1.10 equiv) was added to this solution. tert-Butylpyrocarbonate (1.78 g, 8.2 mmol, 1.20 equiv) was added. After stirring at rt for 16h, the reaction mixture was dissolved in EtOAc (100 mL), and washed with 0.3 M HCl (20 mL), half saturated NaHCO_3 solution, 14% aq. NH_4OH (30mL), brine (50 mL) and dried (Na_2SO_4). Solvent was removed under reduced pressure to yield the BOC-diamino-ester residue, which was purified by CombiFlash (eluting with EtOAc in DCM 0-5%) to afford it as viscous oil (2.10 g, 88% yield). NMR: ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1.27-1.37 (m, 18H), 1.99 (br s, 1H), 3.16 (br s, 1H), 3.55 (q, $J=20.1$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 4.93 (br s, 1H), 7.22-7.30 (m, 5H); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 23.78, 24.17, 25.41, 28.59, 51.89, 54.37, 57.36, 66.07, 127.259, 127.47, 128.70, 144.72, 175.15; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 351.1.

Compound 8: Methyl (2S)-2-amino-3-[[tert-butoxy]carbonyl]amino-3-methylbutanoate. The compound **7** (0.50 g, 1.4 mmol) was dissolved in anhydrous THF (10 mL) in 50 mL flask and placed under argon. Palladium hydroxide catalyst (0.18 g, 20 wt%) was rapidly weighed and added to the flask. The flask was then evacuated and the contents were subjected to hydrogenation under atmospheric pressure of hydrogen. After 2h, LC-MS showed that the reaction was complete. The resulting mixture was filtered through a celite pad, and the filtrate was condensed to dryness. The residue was purified by CombiFlash (eluting with 0-5% MeOH in DCM) to afford **8** as white solid (330 mg, 95% yield). NMR: ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1.30 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 3.26 (br s, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.87 (s, 1H), 4.95 (s, 1H); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 24.15, 24.23, 28.55, 52.28, 54.77, 60.55, 79.77, 155.26, 173.41; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 247.3.

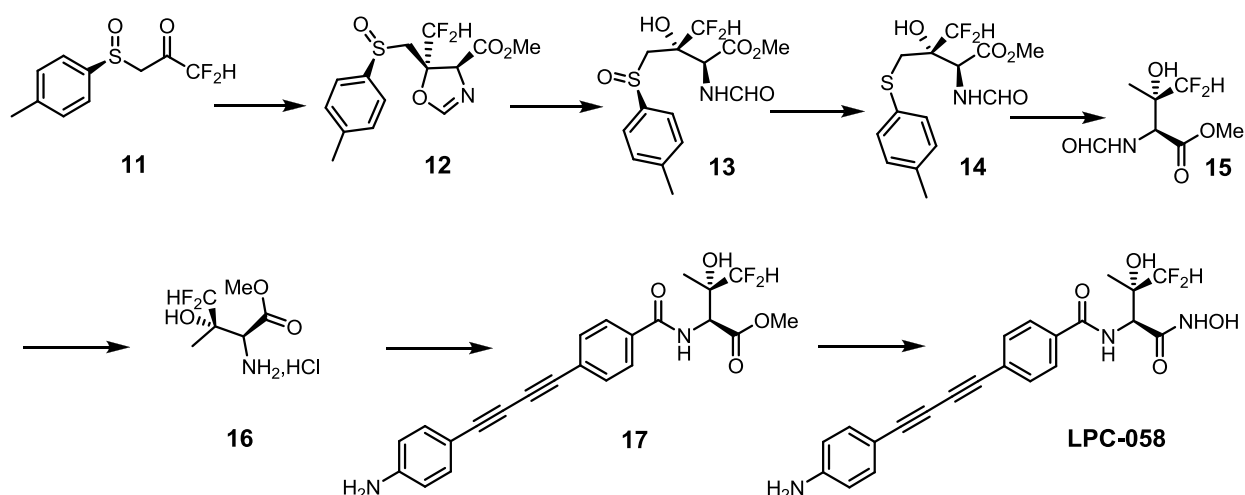
Compound 9: Methyl (2S)-2-({4[']-[4[']-(4[']-aminophenyl)buta-1['],3[']-diyn-1[']-yl]phenyl}formamido)-3[']-[[tert-butoxy]carbonyl]amino-3-methylbutanoate. To a stirred mixture of the compound 4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyn-1-yl)benzoic acid **3** (141mg, 0.54 mmol) and compound **8** (200 mg, 0.65 mmol, 1.20 equiv) in anhydrous DMF (5 mL) was added N-ethyl-N[']-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (124 mg 0.65 mmol, 1.20 equiv), 1-hydroxybenzotriazole (88 mg, 0.65 mmol, 1.20 equiv) at room temperature. The mixture was cooled with an ice-bath, and diisopropylethylamine (0.45 mL, 2.60 mmol, 5.00 equiv) was added. The reaction mixture was stirred under argon and at 0°C for 1h, and was allowed to warm to temperature with the stirring continued for additional 14h. The resulting yellow solution was condensed to dryness with a rotary evaporator. And the residue was treated with water (20 mL), extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined extracts were washed with brine (20 mL), and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Evaporation of the solvent was afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with 0-2% MeOH in DCM) to afford the product (210 mg, 79% yield) as yellow solid. NMR: ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 1.45 (m, 15H), 3.73 (s, 3H), 4.78 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=8.1$ Hz, 2H); ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ 24.00, 26.13, 27.66, 51.56, 53.90, 62.09, 70.92, 76.86, 79.09, 79.48, 84.71, 108.32, 114.25, 126.14, 127.40, 132.22, 133.62, 133.88, 150.17, 157.30, 167.46, 170.89; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 490.

Compound 10: Methyl (2S)-3-amino-2-({4[']-[4[']-(4[']-aminophenyl)buta-1['],3[']-diyn-1[']-yl]phenyl}formamido)-3-methylbutanoate. A flask containing compound **9** (200 mg, 0.41 mmol)

was treated with TFA/DCM (1/6 mL) and stirred at 0°C under argon for 2h, then allowed to warm to ambient temperature with the stirring continued for additional 10h. The reaction mixture was concentrated by rotary evaporation to give a yellow solid. The residue was treated with water (10 mL), 1N NaOH was added dropwise to the mixture solution until pH=11, then extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined extracts were washed with water (20 mL) and brine (20 mL), and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of the solvent afforded the crude products, which was purified by flash chromatography (eluting with 0-5% MeOH in DCM) to afford the product (144 mg, 90% yield) as yellow solid. NMR: ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.21 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 4.64 (s, 1H), 6.62 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.24 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.58 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.83 (d, *J*=8.4 Hz, 2H); ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 26.22, 26.71, 51.49, 52.00, 61.67, 70.72, 76.66, 78.95, 84.60, 108.25, 114.20, 126.08, 127.66, 132.07, 133.82, 150.26, 168.39, 171.48; LC-MS: [M+H]⁺+390.

Compound **LPC-040**: (2S)-3-amino-2-({4'-[4'-(4'-aminophenyl)buta-1',3'-diyn-1-yl]phenyl}formamido)-N-hydroxy-3-methylbutanamide. To an ice-cold solution of the compound **10** (130 mg, 0.33 mmol) dissolved in anhydrous MeOH (1.5 mL) and THF (1.5 ml) was added hydroxylamine hydrochloride (116.0 mg, 1.67 mmol 5.0 equiv), followed by 25% sodium methoxide in methanol solution (0.59 mL, 2.51 mmol, 7.5 equiv). The reaction was stirred under argon and at 0°C for 2h, was allowed to warm to room temperature with stirring continued overnight (18 hours). The resulting yellow suspension was concentrated to dryness with a rotary evaporator. And the residue was treated with water (20mL). The mixture was extracted with 1-butanol (3×30 ml), washed with brine (20 ml), and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of solvent afforded the crude products, which was purified by CombiFlash (eluting with MeOH in DCM 0-12%) to give it as white solid (89.0 mg, yield 68%). NMR: ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.28 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 4.52 (s, 1H), 6.62 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.24 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.87 (d, *J*=8.1 Hz, 2H); ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 25.21, 25.83, 53.36, 57.58, 70.72, 76.73, 78.93, 84.65, 108.26, 114.20, 126.17, 127.67, 132.07, 133.71, 133.81, 150.25, 167.53, 168.08; HRMS: calculated for C₂₃H₂₂N₃O₃H⁺ 391.1770; found 391.1767 [M+H]⁺.

Synthesis of LPC-058



Compound **11**: (*S*)-1,1-difluoro-3-(*p*-tolylsulfinyl)propan-2-one. To a solution of diisopropylamine (16.21 mmol) in anhydrous THF (30 mL) was added BuLi (1.70 in hexane, 9.15 mL, 15.56 mmol, 1.20 equiv) at -78°C . After 30 min, a solution of *S*(-)-methyl *p*-tolyl sulfoxide in anhydrous THF (10 mL) was added dropwise. Then the reaction mixture was stirred at -78°C for 30 min. Ethyl fluoroacetate (15.56 mmol, 1.20 equiv) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at -78°C for 2h under argon. Then the mixture was quenched with saturated NH_4Cl (100 mL), extracted with EtOAc (3×100 mL). The combined extracts were washed with water (100 mL), brine (100 mL) and dried (anhydrous Na_2SO_4). The crude product was purified by CombiFlash (eluting with EtOAc in hexane 0-50%) to give **11** as a white solid (88%). NMR: ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 2.40 (s, 3H), 3.87 (dd, $J=3.3, 13.2$ Hz, 1H), 3.94 (dd, $J=2.7, 13.8$ Hz, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 7.33 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.4$ Hz, 2H); ^{19}F (300 MHz, CDCl_3) δ -128.00, -132.84 (ABq, d, 2F, $\text{JHF}=9$ Hz, $\text{JFF}=58$ Hz); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 2 1.69, 63.86, (84.72, 87.19), 124.21, 130.51, 139.24, 142.83, (197.25, 197.52); LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 215.0.

Compound **12**: Methyl (4*S*,5*S*)-5-(difluoromethyl)-5-(((*S*)-*p*-tolylsulfinyl)methyl)-4,5-dihydro-oxazole-4-carboxylate. To a suspension of **11** (11.2 mmol) in anhydrous diethyl ether (50 mL) was added Cu_2O (0.16 g, 1.12 mmol, 0.10 equiv) at 0°C under argon. The reaction mixture was added with methyl isocynoacetate (2.21 g, 2.00 equiv) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0°C for 2h, and was allowed to warm to room temperature for 14h. The resulting mixture was concentrated to dryness. The crude product was purified by CombiFlash system (eluting with EtOAc in hexane 0-60%) to give the **12** as yellow oil (40-50% yield). NMR: ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 2.37 (s, 3H), 2.84-2.90 (m, 1H), 3.03 (d, $J=13.5$ Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 4.60 (dd, $J=10.8, 45.6$ Hz, 1H), 4.91 (s, 1H), 5.11 (ddd, $J=1.2, 10.8, 48.3$ Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.29 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J=8.1$ Hz, 2H); ^{19}F (300 MHz, CDCl_3) δ -133.40, -135.22 (ABq, d, 2F, $\text{JHF}=59$ Hz, $\text{JFF}=312$ Hz); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 21.61, 52.96, 60.47, (71.41, 71.49), 82.24, 84.62, (85.33, 85.57), 124.11, 130.48, 140.38, 142.52, 155.80, 169.20; LC-MS: [314.1 $\text{M}+\text{H}$] $^+$.

Compound **13**: Methyl (2*S*,3*S*)-4,4-difluoro-2-formamido-3-hydroxy-3-(((*S*)-*p*-tolylsulfinyl)methyl)butanoate. To a solution of **12** (1.20 g, 3.78 mmol) in CHCl_3 (1 mL) was added deionized water (30 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature under argon for 24h. Then the mixture was diluted with DCM (100 mL), washed with water (40 mL), brine (40 mL) and dried (anhydrous Na_2SO_4). The crude product was purified by CombiFlash (eluting with MeOH in DCM 0-5 %) to give **13** as white solid (yield 94%).

NMR: ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 2.37 (s, 3H), 3.12 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 4.50 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 5.01 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 5.40 (s, 1H), 7.28 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 8.20 (s, 1H); ^{19}F (300 MHz, CDCl_3) δ -129.38, -133.12 (ABq, d, 2F, $J_{\text{HF}}=58$ Hz, $J_{\text{FF}}=304$ Hz); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 21.61, 53.25, 55.48, 62.04, (74.40, 74.64), (83.53, 85.87), 124.37, 130.41, 140.08, 142.27, 162.19, 169.92; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 331.1.

Compound **14**: (2*S*,3*S*)-Methyl 4,4-difluoro-2-formamido-3-hydroxy-3-((*p*tolylthio)methyl) butanoate. To a solution of **13** (3.4 mmol) in acetone (20 mL) was added sodium iodide (1.18 g, 7.84 mmol, 2.4 equiv) at -10°C under argon. A solution of trifluoroacetic anhydride (0.75 mL in 2 mL acetone) was added dropwise over 8 min. The reaction mixture was stirred at -10°C for 9 min, and was concentrated to dryness. The residue was diluted with water (30 mL), extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were washed with water (30 mL), brine (30 mL) and dried (anhydrous Na_2SO_4). The crude product was purified by CombiFlash system (eluting with MeOH in DCM 0-3%) to give **14** as yellow oil (yield 88%). NMR: ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 2.29 (s, 3H), 3.27-3.28 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.77 (d, $J=4.5$ Hz, 1H), 4.33 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 5.01 (d, $J=9.3$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 8.20 (s, 1H); ^{19}F (300 MHz, CDCl_3) δ -131.14, -132.23 (ABq, d, 2F, $J_{\text{HF}}=58$ Hz, $J_{\text{FF}}=300$ Hz); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 21.24, 40.08, 53.16, 54.40, (75.01, 75.25), (82.64, 84.97), 130.18, 130.97, 132.14, 137.45, 161.73, 170.12; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 316.1.

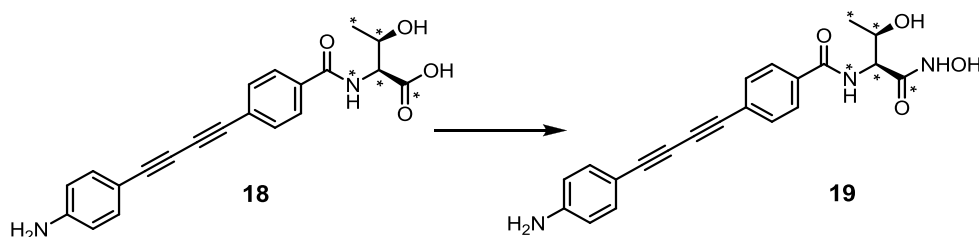
Compound **15**: (2*S*,3*S*)-Methyl 4,4-difluoro-2-formamido-3-hydroxy-3-methylbutanoate. To a solution of **14** (2.82 mmol) in acetate buffer (pH 5.2) and MeOH (1:2, 90 mL) was added Raney Ni (suspension in methanol, 54 mL) followed by addition of sodium hypophosphite monohydrate (3.18 g in deionized water 12 mL) immediately. The reaction mixture was stirred at room temperature for 14h under argon. The mixture was filtered through a celite pad and was washed with MeOH (200 mL). The filtrate was concentrated to dryness. The residue was treated with water (50 mL), extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were washed with water (30 mL), 10% NaHCO_3 (2×30 mL), brine (30 mL), and dried (anhydrous Na_2SO_4). The crude product was purified by CombiFlash (eluting with MeOH in DCM 0-5%) to give **15** as white solid (yield 87%). NMR: ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1.24 (d, $J=2.1$ Hz, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.17 (s, 1H), 4.32 (s, 1H), 4.41 (br, s, 1H), 4.74 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.17 (s, 1H); ^{19}F (300 MHz, CDCl_3) δ -129.73, -134.13 (ABq, d, 2F, $J_{\text{HF}}=59$ Hz, $J_{\text{FF}}=303$ Hz); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 21.04, 52.87, 55.38, (72.79, 73.04), (85.37, 87.70), 162.35, 170.63; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 194.2.

Compound **16**: (2*S*,3*S*)-Methyl 2-amino-4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate hydrochloride. Hydrochloric acid (0.188 mL, 2.26 mmol, 1.0 equiv) in methanol (1 mL) was added to a solution of **15** (2.26 mmol) in methanol (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 14h. Then the mixture was concentrated to dryness. The residue was treated with water (30 mL), adjusted pH to 10 with 10% NaHCO_3 , extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined extracts were washed with water (30 mL), brine (30 mL) and dried (anhydrous Na_2SO_4). Evaporation of the solvent was afforded **16** as white solid, which was carried to next step without further purification (yield 99%). NMR: ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1.06 (d, $J=2.4$ Hz, 3H), 3.57 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.26 (dd, $J=9.3, 13.8$ Hz, 1H), 4.52 (dd, $J=4.44$ (dd, $J=9.3, 14.1$ Hz, 1H)); ^{19}F (300 MHz, D_2O) δ -132.35, -134.49 (ABq, d, 2F, $J_{\text{HF}}=58$ Hz, $J_{\text{FF}}=299$ Hz); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 19.78, 19.84, 52.46, 57.49, (72.25, 72.48), (85.34, 87.66), 147.05; LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 166.0.

Compound **17**: (2*S*,3*S*)-Methyl 2-(4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyn-1-yl)benzamido)-4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate. To a solution of 4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyn-1-yl)benzoic acid **3** (0.30 g, 1.25 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) was added amine acid **16** (0.54 g, 1.31 mmol, 1.05 equiv), EDC.HCl (0.26 g, 1.38 mmol, 1.2 equiv), HOBT (0.19 g, 1.38 mmol, 1.2 equiv) at room temperature under argon. The mixture was cooled to 0°C, DIEA (0.81 mL, 4.60 mmol, 4.00 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at 0°C for 2h, then was allowed to warm to room temperature for 14h. The yellow solution was then concentrated to dryness. The residue was treated with water (30 mL), extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined extracts were washed with water (50 mL), brine (50 mL), and dried (anhydrous Na₂SO₄). The crude product was purified by CombiFlash (eluting with MeOH in DCM 0-2.5 %) to give **17** as yellow solid (0.423 g, yield 80%). NMR: ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.37 (d, J=2.1 Hz, 3 H), 3.76 (s, 3H), 4.267 (dd, J=9.3, 19.5 Hz, 1H), 4.42 (dd, J=9.3, 19.8 Hz, 1H), 4.81 (s, 1H), 6.61 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.24 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.56 (d, J=8.1 Hz, 2H), 7.82 (d, J=8.1 Hz, 2H); ¹⁹F (400 MHz, CD₃OD) δ -131.06, -137.61 (ABq, d, 2F, JHF=60 Hz, JFF=30 Hz); ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 20.51, 51.69, 70.91, (71.94, 72.19), 76.86, 79.08, 84.73, (85.50, 87.83), 108.34, 114.27, 126.19, 127.20, 127.57, 132.18, 133.60, 133.89, 150.16, 168.18, 170.60; LC-MS:[M+H]⁺ 437.1. HRMS C₂₃H₂₀F₂N₂O₄ caclated 426.1391 found: 426.1392.

Compound **LPC-058**: 4-((4-Aminophenyl)buta-1,3-diyn-1-yl)-*N*-((2*S*,3*S*)-4,4-difluoro-3-hydroxy-1-(hydroxyamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)benzamide. To an ice-cold solution of **17** (0.40 g, 0.94 mmol) dissolved in anhydrous MeOH (2 mL) and THF (2 mL) was added hydroxylamine hydrochloride (0.33 g, 4.69 mmol, 5.0 equiv) followed by 25% sodium methoxide in methanol solution (1.60 mL, 7.05 mmol, 7.5 equiv). The reaction mixture was stirred under argon and at 0°C for 2h, and allowed to warm to ambient temperature with the stirring continued overnight (14h). The resulting yellow suspension was condensed to dryness with a rotary evaporator, and the residue obtained was treated water (50 mL) and saturated NH₄Cl (50 mL), and extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined extracts were washed with water (50 mL), brine (50 mL), and dried over anhydrous Na₂SO₄. Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by CombiFlash (eluting with 0-5% MeOH in DCM) to afford the title compound as yellow solid (0.33, 82% yield). NMR: ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.36 (s, 3H), 4.73 (s, 1H), 5.80 (t, J=112.2 Hz, 1H), 6.61 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.24 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.57 (d, J=8.1 Hz, 2H), 7.82 (d, J=8.4 Hz, 2H); ¹⁹F (400 MHz, CD₃OD) δ -130.00, -137.91 (ABq, d, 2F, JHF=60 Hz, JFF=300 Hz); ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 16.54, 54.87, 70.81, (72.60, 72.90, 73.19), 76.83, 78.97, 84.68, 108.36, (112.72, 115.96, 119.23), 114.26, 126.27, 127.53, 132.16, 133.47, 133.84, 150.16, 166.52, 167.51; LC/MS m/s [M+H]⁺ 428.2. HRMS C₂₂H₁₉F₂N₃O₄ calculated 427.1344 found 427.1346.

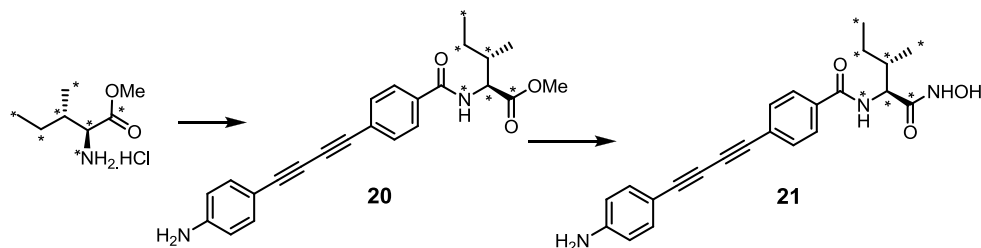
Synthesis of ¹³C/¹⁵N-labeled LPC-011 (compound 19)



Compound **18**: (4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoyl)-L-threonine- [¹³C₄, ¹⁵N]. To a stirred solution of the L-Threonine- [¹³C₄, ¹⁵N] (37 mg, 0.3 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) under an atmosphere of argon, was perfluorophenyl 4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoate **5** (128 mg, 0.3 mmol) followed by triethylamine (101 mg, 1 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 16h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue obtained was purified on a CombiFlash silica gel chromatography system with MeOH/DCM (0 to 20% gradient) as eluent to afford the desired product as yellow solid (96 mg). LC-MS: [M+1]⁺ 368.1; Calculated mass for ¹³C₄¹⁵N₄: 367.1

Isotope labeled **LPC-011** (compound **19**): 4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)-N-((2S,3R)-3-hydroxy-1-(hydroxyamino)-1-oxobutan-2-yl)benzamide- [¹³C₄, ¹⁵N]. To a stirred solution of compound **18** (95 mg, 0.26 mmol) in anhydrous DMF (3 mL), at room temperature under argon, was added hydroxylamine hydrochloride (70 mg, 1 mmol) and NEt₃ (202 mg, 2 mmol), followed by PyBOP (203 mg, 0.39 mmol). The reaction mixture was stirred at 16 h, and concentrated in vacuo to dryness. The residue was partitioned between water (10 mL) and EtOAc (20 mL) with vigorous stirring. The organic layer washed with water (2x10 mL), brine (10 mL), and dried (anhydrous Na₂SO₄). The crude product was purified by CombiFlash silica gel chromatography with EtOAc/DCM (0 to 100% gradient) as eluant to afford isotope labeled **LPC-011** (compound **19**) as a yellow solid (30 mg). LC-MS: [M+1]⁺ 383.1; Calculated mass for ¹³C₄¹⁵N₄: 382.1. NMR: ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 1.25 (br d, J=128 Hz, 3H), 4.20 (br d, J=144 Hz, 1H), 4.43 (br d, J=140 Hz, 1H), 6.63 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.25 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.59 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.89 (d, J=8.8 Hz, 2H).

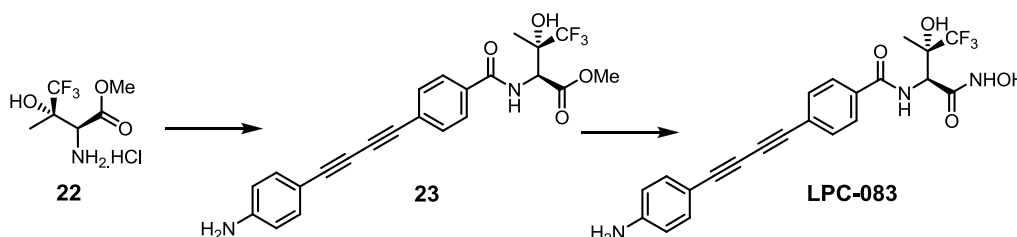
Synthesis of ¹³C/¹⁵N-labeled LPC-023 (compound 21)



Compound **20**: Methyl (4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoyl)-L-isoleucinate- [¹³C₆, ¹⁵N]. Methyl ester of L-Isoleucine- [¹³C₆, ¹⁵N] was used to prepare compound **20** employing the procedure used for the corresponding unlabeled analog, compound **1**. The desired product was obtained as yellow solid after purification by CombiFlash silica gel chromatography with EtOAc/DCM (0 to 100% gradient) as eluent. LC-MS: [M+1]⁺ 396.2; Calculated mass for ¹³C₆¹⁵N₃: 395.2

Isotope-labeled **LPC-023** (compound **21**): 4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)-N-((2S,3S)-1-(hydroxyamino)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamide-[13C6, 15N]. To a stirred solution of compound **20** (83 mg, 0.21 mmol) in MeOH (2 mL) and THF (1 mL), at 0-5°C under argon, was added 50% aqueous hydroxylamine (0.15 mL, 2.4 mmol), followed by addition of solid LiOH.H₂O (18 mg, 0.42 mmol). The reaction mixture was allowed to stir for 16h with gradual warming to RT. The reaction was quenched with the addition of AcOH (0.1 mL) and the contents were partitioned between saturated NH₄Cl (5 mL) and EtOAc (10 mL). The organic layer was washed with water (10 mL) and brine (5 mL) and dried (anhydrous Na₂SO₄). The crude product was purified by CombiFlash silica gel chromatography with MeOH/DCM (0 to 10% gradient) as eluent to afford isotope-labeled **LPC-023** (compound **21**) as a yellow solid (58 mg). LC-MS: [M+1]⁺ 397.2; Calculated mass for ¹³C₆¹⁵N₂O₃: 396.1. NMR: ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 0.75-0.82 (m, 3H), 1.10-1.14 (m, 3H), 1.3-1.5 (m, 1H), 1.7-1.9 (m, 1H), 2.08-2.22 (m, 1H), 4.26 (br d, J=136 Hz, 1H), 6.62 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.24 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.57 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.82 (d, J=8.8 Hz, 2H).

Synthesis of LPC-083



Compound **22**: Methyl (2S,3S)-2-amino-4,4,4-trifluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate hydrochloride. Compound **22** was prepared from (2S,3S)-2-amino-4,4,4-trifluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoic acid **6** using the method as described for compound **2**. LC-MS: [M+1]⁺ 202.1; Calculated mass for C₆H₁₀F₃NO₃: 201.1. NMR: ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.40 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 4.13 (s, 1H), 7.47 (br s, 1H), 8.77 (br, 3H). ¹⁹F (400 MHz, DMSO-d₆) δ -79.2.

Compound **23**: Methyl (2S,3S)-2-(4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamido)-4,4,4-trifluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate. Compound **23** was prepared using standard EDC-mediated amide coupling conditions. The desired product was obtained as yellow solid after purification by CombiFlash silica gel chromatography with EtOAc/DCM (0 to 100% gradient) as eluent. LC-MS: [M+1]⁺ 445.1; Calculated mass for C₂₃H₁₉F₃N₂O₄: 444.1. NMR: ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 1.52 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 5.01 (s, 1H), 6.62 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 8.8 Hz, 2H). ¹⁹F (400 MHz, CD₃OD) δ -81.2.

LPC-083: 4-((4-aminophenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)-N-((2S,3S)-4,4,4-trifluoro-3-hydroxy-1-(hydroxylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)benzamide. **LPC-083** was prepared from compound **23** employing the method described for the preparation of compound **21**. The desired product was obtained as yellow solid after purification on a by CombiFlash silica gel chromatography with MeOH/DCM (0 to 10% gradient) as eluent. LC-MS: [M+1]⁺ 446.1; Calculated mass for C₂₂H₁₈F₃N₃O₄: 445.1. NMR: ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.40 (s, 3H), 4.85 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.87 (s, 2H), 6.47 (s, 1H), 6.55 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.35 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 9.12 (s, 1H), 10.98 (s, 1H). ¹⁹F (400 MHz, DMSO-d₆) δ -78.6.

References:

- 1 Barb, A. W., Jiang, L., Raetz, C. R. & Zhou, P. Structure of the deacetylase LpxC bound to the antibiotic CHIR-090: Time-dependent inhibition and specificity in ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 18433-18438 (2007).
- 2 Liang, X. *et al.* Syntheses, structures and antibiotic activities of LpxC inhibitors based on the diacetylene scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 852-860, doi:10.1016/j.bmc.2010.12.017 (2011).
- 3 Zhou, P. & Toone, E. J. Ethynylbenzene derivatives. US patent (2013).
- 4 Nishide, K., Shigeta, Y., Obata, K., Inoue, T. & Node, M. Reductive desulfurization using the Raney nickel sodium hypophosphite combination system without racemization of a secondary alcohol. *Tetrahedron Letters* **37**, 2271-2274, doi:Doi 10.1016/0040-4039(96)00273-0 (1996).
- 5 Lee, C. J. *et al.* Structural Basis of the Promiscuous Inhibitor Susceptibility of *Escherichia coli* LpxC. *ACS chemical biology* **9**, 237-246, doi:10.1021/cb400067g (2014).
- 6 Soloshonok, V. A., Avilov, D. V. & Kukhar, V. P. Asymmetric Aldol Reactions of Trifluoromethyl Ketones with a Chiral Ni(II) Complex of Glycine: Stereocontrolling Effect of the Trifluoromethyl Group. *Tetrahedron* **52**, 12433-12442 (1996).

ANNEXE 4

High susceptibility of multidrug- and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens to biphenyl-diacetylene-based difluoromethyl-*allo*-threonyl-hydroxamate LpxC inhibitors

Marie Titecat¹, Xiaofei Liang², Chul-Jin Lee³, Audrey Charlet¹, Didier Hocquet⁴, Thierry Lambert⁵, Jean-Marie Pages⁶, René Courcol¹, Florent Sebbane¹, Eric J. Toone^{2,3} Pei Zhou^{2,3}§, Nadine Lemaitre¹*§

§ footnote: Pei Zhou and Nadine Lemaitre are co-senior authors

Corresponding author

Nadine Lemaitre: Tel.: +33 320 445 692; Fax: +33 320 444 895; E-mail: nadine.lemaitre@chru-lille.fr

1 Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, U1019 – UMR 8204, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France, 2 Department of Chemistry, Duke University, Durham, North Carolina 27708, USA. 3 Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710, USA. 4 UMR CNRS 6249, Chrono-environnement, Université de Bourgogne-Franche-Comté, Centre de Ressources Biologiques Ferdinand Cabanne, Hygiène Hospitalière, CHU Besançon, F-25000, Besançon, France, 5 EA 4043 Unité Bactéries Pathogènes et Santé (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Unité Paris Saclay, F-92290 Châtenay-Malabry, France. 6 UMR-MD1, Aix Marseille Université, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, F-13000 Marseille, France.

Running title: Antibacterial efficacy of biphenyl-diacetylene-based LpxC inhibitors

Keywords: LpxC inhibitor, carbapenemase, synergy, lipid A, Gram-negative pathogens

Synopsis

Objectives: Inhibitors of uridine diphosphate-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetyl-D-glucosamine deacetylase (LpxC, which catalyses the first, irreversible step in lipid A biosynthesis) are a promising new class of antibiotics against Gram-negative bacteria. The objectives of the present study were to (i) compare the antibiotic activities of three LpxC inhibitors (LPC-058, LPC-011 and LPC-087) and the reference inhibitor CHIR-090 against Gram-negative bacilli (including MDR or XDR isolates) and (ii) investigate the effect of combining these inhibitors with conventional antibiotics.

Methods: MICs were determined for 369 clinical isolates (234 Enterobacteriaceae and 135 non-fermentative Gram-negative bacilli). Time-kill assays with LPC-058 were performed on four MDR/XDR strains, including *Escherichia coli* producing CTX-M-15-ESBL, and *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* producing KPC-2, VIM-1 and OXA-23 carbapenemases, respectively.

Results: LPC-058 was the most potent antibiotic and displayed the broadest spectrum of antimicrobial activity, with MIC₉₀ values against Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *A. baumannii* of 0.12, 0.5, 1 and 1 mg/L, respectively. LPC-058 was bactericidal at 1x or 2x MIC against CTX-M-15, KPC-2 and VIM-1 carbapenemase-producing strains and bacteriostatic at $\leq 4x$ MIC against OXA-23 carbapenemase-producing *A. baumannii*. Combinations of LPC-058 with β -lactams, amikacin and ciprofloxacin were synergistic against these strains, albeit in a species-dependent manner. LPC-058's high efficacy was attributed to the presence of the difluoromethyl-*allo*-threonyl head group and a linear biphenyl diacetylene tail group.

Conclusions: These *in vitro* data highlight the therapeutic potential of the new LpxC inhibitor LPC-058 against MDR/XDR strains and set the stage for subsequent *in vivo* studies.

Introduction

The emergence of MDR and XDR Gram-negative bacilli is weakening the efficacy of the antimicrobial agents currently used to treat infections caused by these microorganisms.¹⁻³ This alarming situation emphasizes the need to develop novel antibiotics directed at previously unexploited targets and thus to overcome resistance to existing antibiotic classes. The development of novel antibiotics targeting uridine diphosphate-3-*O*-(*R*-3-hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine deacetylase (LpxC) appears to be a promising strategy, as this essential enzyme catalyses the first, irreversible step in the biosynthesis of lipid A - the membrane anchor of lipopolysaccharide and the predominant lipid species in the outer leaflet of the Gram-negative outer membrane.⁴

In the late 1990s, phenyloxazoline-based LpxC inhibitors were found to be active against *Escherichia coli* both *in vitro* and *in vivo* - thus validating LpxC as a viable antibiotic target⁵. The subsequently discovery of the compound CHIR-090 (characterized by a threonyl-hydroxamate head group coupled to a morpholine-conjugated biphenyl acetylene tail group) led to the development of the first, active, LpxC-targeting antibiotic against *P. aeruginosa* (Figure 1).^{6,7} Replacing CHIR-090's biphenyl acetylene tail by a linear biphenyl diacetylene group has yielded the compounds LPC-009 and LPC-011, which have enhanced antibacterial activity (Figure 1).^{8,9} Recently, another promising class of LpxC inhibitors (pyridine-methylsulfone-hydroxamate-based compounds, as exemplified by PF-5081090) was also found to show potent activity against Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa in vitro* and in murine models of acute septicaemia and pulmonary infection.¹⁰ However, none of these compounds displayed activity against *Acinetobacter baumannii*, a pathogen often associated with nosocomial infections and outbreaks. Recently, the use of NMR spectroscopy to probe the dynamic interactions between LpxC and its bound inhibitors in solution led to the development of a difluoromethyl-*allo*-threonyl-hydroxamate-based compound LPC-058,

which contains a *para*-amino biphenyl diacetylene tail group (Figure 1). LPC-058 was demonstrated to be 5- to 55-fold more active than CHIR-090 against representative strains of Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae* and *Chlamydia trachomatis*.¹¹ Most importantly, LPC-058 was the first LpxC inhibitor to display potent antibiotic activity against the *A. baumannii* ATCC 17978 strain; this finding indicated the feasibility of developing LpxC-targeting antibiotics against this notorious, opportunistic pathogen. Despite this exciting progress, LPC-058's antibiotic activity has only been determined against reference strains that lack well-characterized resistance mechanisms and thus are not representative of MDR and XDR strains. In the present study, we evaluated the potency of LPC-058 against a broad panel of Gram-negative clinical isolates and compared it with those of the reference compound CHIR-090 and two other biphenyl-diacetylene-based LpxC inhibitors that differed from LPC-058 in terms of the head group (LPC-011) or the tail group (LPC-087, which has an additional morpholine group). We hypothesized that studying clinical strains would provide information on the effects of antibiotic resistance mechanisms (such as ESBL, carbapenemase or overexpression of efflux resistance-nodulation-division (RND) pumps) on the LpxC inhibitors' potency. Lastly, we investigated the putative synergy between LpxC inhibitors and the conventional antibiotics commonly used to treat serious infections caused by MDR strains.^{12,13}

Materials and Methods

Bacterial strains

Reference strains of *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) and *A. baumannii* (ATCC 17978) were studied, along with 369 Gram-negative clinical isolates from Lille University Hospital (Lille, France). A total of 34 MDR (9%) and 44 XDR (12%) strains were identified, according to the interim standard definitions for acquired resistance.¹⁴ Two MDR

strains (CTX-M-15 ESBL-producing *E. coli* and KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*) and two XDR strains (VIM-1 carbapenemase-producing *P. aeruginosa* and OXA-23 carbapenemase producing-*A. baumannii*) were used in time-kill assays. Lastly, *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* strains respectively overexpressing the AcrAB-TolC, MexAB-oprM/MexCD-OprJ and AdeABC efflux pumps were also examined, along with the corresponding parental strains.¹⁵⁻¹⁸

Antimicrobial compounds

Cefotaxime, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin and amikacin were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). The LpxC inhibitor CHIR-090 and the biphenyl-diacetylene-based LpxC inhibitors LPC-058 and LPC-011 (Figure 1) were prepared at the Duke University Small Molecule Synthesis Facility (Durham 27710, NC, USA), according to published procedures.⁷⁻⁹ The synthesis of LPC-087 is described in the Supplementary Methods. Stock solutions of conventional antibiotics and LpxC inhibitors were stored at -80 °C until use.

MIC assays

The bacterial strains' susceptibility to LpxC inhibitors at final concentrations ranging from 0.015 to 64 mg/L was determined using the CLSI standard agar dilution and broth microdilution methods in cation-adjusted Mueller Hinton (CAMH) medium¹⁹. An inoculum of ~10⁴ cfu/spot or 5x10⁵ cfu/mL was used for the agar dilution and microdilution methods, respectively. The inoculated agar and 96-well plates were subsequently incubated for 24 h at 37 °C (except for *Yersinia* species, which were incubated for 48 h at 28 °C). Each assay was performed at least twice on separate days, and three quality control strains (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *A. baumannii* ATCC 17978) were included on each

day of testing (depending on the species investigated). The MIC was defined as the lowest concentration of drug that prevented visible growth after incubation.

Time-kill assays

The bactericidal activity of LpxC inhibitors was investigated with the following strains: CTX-M-15 ESBL-producing *E. coli*, KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, VIM-1 carbapenemase-producing *P. aeruginosa* and OXA-23 carbapenemase producing-*A. baumannii*. Assays were performed using LPC-058 alone at concentrations of 1x to 8x MIC or mixed at 0.25x to 1x MIC with the following conventional antibiotics: cefotaxime, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin and amikacin. For time-kill assays, the MIC for each antibiotic was determined by using the CLSI reference microdilution method.¹⁹ The various combinations were added to an inoculum of 5×10^5 cfu/mL from a bacterial culture growing exponentially in CAMH broth. After 0, 3, 6, 9 and 24 h of incubation at 37 °C with shaking, aliquots were removed and subcultured in triplicate onto bromocresol purple agar plates. Viable cells were then counted. Bactericidal activity was defined as a 3 log₁₀ cfu/mL reduction, relative to the initial inoculum. Synergy and indifference were respectively defined as a ≥ 2 log₁₀- and < 2 log₁₀ decrease in the cfu count when the combination was compared with the most active single drug after a 24 h incubation. The limit of detection (LOD) was ≤ 1.3 log₁₀ cfu/mL. Each assay was repeated at least twice.

Results

Inhibitory activity of the LpxC inhibitors against clinical isolates of Enterobacteriaceae and non-fermentative Gram-negative bacilli

The antimicrobial activities of LPC-058, LPC-011 and LPC-087 were tested against 369 clinical isolates (234 Enterobacteriaceae and 135 non-fermentative Gram-negative bacilli) and

compared with that of the reference compound CHIR-090 (Tables 1 and S1). All the biphenyl-diacetylene-based compounds showed a high level of activity against common Enterobacteriaceae, with MIC₅₀ values of ≤ 0.25 and MIC₉₀ values of ≤ 0.5 mg/L. LPC-058 was the most active compound, with MIC₅₀ (0.06 mg/L) and MIC₉₀ (0.12 mg/L) values that were 6- to 8-fold lower than those of the reference compound CHIR-090 (with a MIC₅₀ of 0.5 mg/L and a MIC₉₀ of 2 mg/L respectively). The second most active compound was LPC-011, with MIC₅₀ (0.12 mg/L) and MIC₉₀ (0.25 mg/L) values about 2-fold higher than those of LPC-058 for the various Enterobacteriaceae strains (Table S1); however, its MIC₅₀ and MIC₉₀ values were 2-fold lower than those of LPC-087 (MIC₅₀=0.25 mg/L and MIC₉₀=0.5 mg/L). A similar trend in antibacterial activities was observed for clinical isolates of *P. aeruginosa* (Table 1). LPC-058 and LPC-011 were more active (MIC₅₀ ≤ 0.5 mg/L and MIC₉₀ ≤ 1 mg/L) than LPC-087, which had much the same similar MIC₅₀ and MIC₉₀ values as the reference compound CHIR-090 (2 mg/L and 4 mg/L, respectively). Overall, the compounds' activities against Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa* could be ranked (in decreasing order) as follows: LPC-058 > LPC-011 > LPC-087 > CHIR-090.

Interestingly, the LpxC inhibitors' activity patterns against *A. baumannii* and *B. cepacia* differed distinctly from those against Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa*. For *A. baumannii*, only the difluoromethyl-substituted compounds (LPC-058 and LPC-087) displayed a significant level of antibiotic activity (Table 1). LPC-058 displayed a higher potency (MIC₅₀ = 0.25 mg/L and MIC₉₀ = 1 mg/L) against clinical isolates of *A. baumannii* than LPC-087 (MIC₅₀ = 1 mg/L and MIC₉₀ = 32 mg/L), a compound that has the same head group but a different tail (with an additional morpholine moiety attached to the biphenyl diacetylene scaffold; Figure 1). For *B. cepacia*, only LPC-058 and LPC-011 were active; once again, LPC-058 was the most potent antibiotic (Table 1). Since LPC-058 and LPC-011 share the same linear *para*-amino substituted biphenyl diacetylene tail group and differ from LPC-

087 and CHIR-090 in terms of the absence of the morpholine unit in the tail, their activity against *B. cepacia* indicates that the morpholine substitution may adversely affect the activity of LpxC inhibitors. None of the LpxC inhibitors evaluated here was effective against *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter xylosoxidans*; this lack of activity was unexpected, given the presence of LpxC enzymes in these species.

Taken as a whole, the results of MIC assays with a large collection of Gram-negative clinical strains indicated that LPC-058 (with the difluoromethyl-*allo*-threonyl hydroxamate head group and a linear biphenyl diacetylene tail group) was the most active LpxC inhibitor and had the broadest spectrum of activity.

Inhibitory activity of LpxC inhibitors against defined efflux mutants

We next examined the effect of non-specific drug-resistant mechanisms (such as the overexpression of RND efflux pumps) on the antibiotic activity of the biphenyl diacetylene derivatives LPC-058, LPC-011 and LPC-087. To this end, MIC values were determined against selective wild-type strains of *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii* and their isogenic mutants overexpressing efflux pumps (Table 2). The MICs of LPC-058 and LPC-011 (which have different head groups but the same tail group) were moderately higher (by a factor of four) for the AcrAB-TolC overproduction mutant of *E. aerogenes* than for the WT strain. The two compounds' MICs were only slightly affected by overexpression of MexAB-OprM or MexCD-OprJ efflux pumps in *P. aeruginosa* and the AdeABC efflux pump in *A. baumannii* CIP 7010-1. In contrast, the difference in MICs was greater for LPC-087 (which bears the same morpholine moiety in the tail as CHIR-090) than for than LPC-058 and LPC-011. The MICs of LPC-087 with the efflux pump mutant strains of *E. aerogenes* and *P. aeruginosa* were respectively 8- and 4-fold greater than those for the isogenic parental strain. It has already been reported that CHIR-090 is a substrate of the RND efflux pumps in *P.*

aeruginosa.^{10,20} These observations suggests that the morpholine group in LPC-087 and CHIR-090 may be preferentially recognized (relative to the linear *para*-amino substituted biphenyl-diacetylene tail group in LPC-058 and LPC-011) by the RND efflux pump family.

Inhibitory activity of individual LpxC inhibitors against MDR and/or XDR strains

To assess the broader impact of MDR (i.e. other than efflux pump overproduction), we compared the MICs of LPC-058, LPC-011, LPC-087 and CHIR-90 when tested against MDR/XDR or non-MDR/XDR clinical isolates of Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. All the LpxC inhibitors had very similar MIC values for MDR and XDR strains (Table 3). In general, the MIC₅₀ and MIC₉₀ values of the biphenyl-diacetylene-based compounds (LPC-058, LPC-011 and LPC-087) with non-MDR/XDR clinical isolates of Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa* were similar to those with MDR/XDR clinical strains (with a two-fold difference, typically).

The two LpxC inhibitors with activity against *A. baumannii* (the difluoromethyl substituted compounds LPC-058 and LPC-087) differed in their relative potencies against MDR/XDR isolates. The activity of the morpholine-containing LPC-087 against MDR/XDR *A. baumannii* isolates was much lower (the MIC₉₀ increased from 2 mg/L to 32 mg/L), whereas LPC-058's activity was only slightly affected (the MIC₉₀ increased from 0.5 mg/L to 1 mg/L). Taken as a whole, these observations support the concept whereby LPC-058 (with a difluoromethyl-*allo*-threonyl hydroxamate head group and a linear biphenyl diacetylene tail group) can effectively overcome multidrug-resistance in all the MDR/XDR strains tested here.

The bactericidal effect of LPC-058 alone

Since LPC-058 (i) was the most potent LpxC inhibitor, (ii) displayed the broadest spectrum of antimicrobial activities and (iii) was only slightly affected by the efflux-based antibiotic-

resistance mechanisms, we next sought to determine its bactericidal activity against two MDR strains (CTX-M-15 ESBL-producing *E. coli* and KPC-2 carbapenemase-producing *K. pneumoniae*) and two XDR strains (*P. aeruginosa* and *A. baumannii* producing VIM-1 and OXA-23 carbapenemases, respectively). All four MDR/XDR strains exhibited a high level of resistance to β -lactams, amikacin and ciprofloxacin (Table 4). At a concentration of 1x or 2x MIC, LPC-058 alone was strongly bactericidal (with a reduction of at least 3 log₁₀ cfu/mL) against MDR/XDR *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (Figure 2). LPC-058's bactericidal activity was more prominent for ESBL-producing *E. coli* than for carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*: a full bactericidal effect was rapidly observed (within 3 h) at 1x MIC (0.06 mg/L) for ESBL-producing *E. coli* but occurred more slowly (within 6 h) at 2x MIC (0.24 and 1 mg/L, respectively) for KPC-2 carbapenemase-producing-*K. pneumoniae* and VIM-1 producing *P. aeruginosa*. In contrast, LPC-058 was bacteriostatic at \leq 4x MIC (MIC=0.5 mg/L) with OXA-23 carbapenemase-producing *A. baumannii* and was slowly bactericidal at 8x MIC (Figure 2).

The synergistic effect of LPC-058 with conventional antibiotics

We next assessed LPC-058's potential synergistic action with β -lactams, amikacin and ciprofloxacin against the above-mentioned MDR/XDR bacteria. We deliberately chose to use subinhibitory concentrations of the conventional antibiotics that could nevertheless be achieved clinically 21-25. All combinations of LPC-058 with a β -lactam were synergistic when tested against the four MDR/XDR strains (Table 5, Figure S1). A higher concentration of LPC-058 (1x MIC) did not further enhance the bacterial killing of the β -lactam plus LPC-058 combinations, when compared with LPC-058 at subinhibitory concentrations (0.25x and 0.5x MIC). The synergistic killing effect of the cefotaxime plus LPC-058 combination was more rapid for ESBL-producing *E. coli* (at 6 or 9 h) than for KPC-2-producing *K. pneumoniae*

(at 24 h, with an LPC-058 concentration $\geq 0.5x$ MIC). At all LPC-058 concentrations, the ceftazidime plus LPC-058 combination produced a greater killing effect with VIM-1-producing *P. aeruginosa* than LPC-058 alone. Impressively, the LPC-058 plus imipenem combination was effective against all carbapenemase-producing strains; this was especially true for the OXA-23-producing *A. baumannii*, which was killed within 3 h and did not display any regrowth (Table 5, Figure S1).

Similarly, the LPC-058 plus amikacin combination displayed synergistic activity against all MDR/XDR strains (Table 5, Figure S1) other than the OXA-23 carbapenemase-producing *A. baumannii* (which was highly resistant: MIC_{AMK}= 1024 mg/L). Hence, the synergistic improvements in the activity of LPC-058 with ciprofloxacin appear to be species-dependent. For CTX-M-15-producing *E. coli* and OXA-23-producing *A. baumannii*, the synergistic effect of LPC-058 plus ciprofloxacin occurred rapidly (within 6 h) but was weaker for carbapenemase-producing *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains (with indifference at $\leq 0.5x$ MIC of LPC-058 and prevention of bacterial regrowth at 24 h with 1x MIC of LPC-058, respectively). Overall, our results highlight LPC-058's ability to eradicate MDR-XDR strains when combined with conventional antibiotics usually associated with a high level of resistance.

Discussion

The worldwide rise and spread of ESBLs and carbapenemases in Gram-negative bacilli has created an urgent need to develop new antimicrobial agents.¹⁻³ Our present results showed that the newly discovered difluoromethyl-*allo*-threonyl-hydroxamate compound LPC-058 is the most potent (*in vitro*) of all the biphenyl-diacetylene tail scaffold compounds tested here. It was ~ 10 times more active than the reference compound CHIR-090 against a broad panel of Enterobacteriaceae and non-fermentative Gram-negative bacilli, and effectively overcame

resistance mechanisms in MDR/XDR strains. LPC-058 is the first inhibitor to have shown activity against both *A. baumannii* and *B. cepacia*.^{10,11} Furthermore, LPC-058 is an effective bactericidal antibiotic (at 1x or 2x MIC) against MDR/XDR Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa* strains. Lastly, LPC-058 displays synergy with β -lactams, amikacin and ciprofloxacin.

The generally greater potency and broader spectrum of activity displayed by LPC-058, LPC-011 and LPC-087 (relative to CHIR-90) likely reflects the presence of a biphenyl diacetylene tail (Figure 1).^{8,11} LpxC enzymes accommodate the acyl chain of the substrate through a hydrophobic passage, which also hosts the tail group of LpxC inhibitors. As the contour of the hydrophobic passage differs in distinct LpxC enzymes, it has been shown that the diacetylene group's elasticity and its smaller footprint within the substrate-binding hydrophobic passage of LpxC orthologues contribute to the compounds' broad-spectrum antimicrobial activity (relative to CHIR-090).^{8,9} However, our MIC assay data suggested that the presence of the biphenyl diacetylene tail scaffold in LpxC inhibitors is not enough to gain activity against *A. baumannii*. In fact, LPC-011 has the same tail group as LPC-058 (Figure 1) but was ineffective against *A. baumannii*. Optimal activity of LpxC inhibitors against *A. baumannii* depends strictly on the presence of a difluoromethyl-*allo*-threonyl hydroxamate head group (Figure 1), since only LPC-087 and LPC-058 were active against *A. baumannii*. Addition of the difluoromethyl moiety to LPC-011's threonyl head strengthens the compound's electrostatic interactions with the amino acids in LpxC's active site.¹¹ We speculate that the introduction of fluorine atoms might also increase the compound's ability to cross lipid membranes, as has previously been demonstrated for fluoroquinolone compounds.²⁶

It is noteworthy that LPC-087 (a compound bearing the same head group as LPC-058 but with an additional morpholine moiety in the tail) was generally less active than LPC-058.

It is possible that the presence of this morpholine group weakened the inhibitor-LpxC interaction or diminished the compound's ability to cross the bacterial membrane. In the present study, both LPC-087 and CHIR-090 (which also has a morpholine group) were more affected by the overexpression of efflux pumps than LPC-058 (which lacks the morpholine unit). This observation suggests that LPC-087's low activity (relative to LPC-058) may reflect the target bacterial cells' greater ability to excrete compounds containing a morpholine group. We were very surprised to find that the broad-spectrum LpxC inhibitor LPC-058 was inactive against *S. maltophilia* and *A. xylosoxidans* - despite the presence of a high level (~55%) of sequence homology between these LpxC orthologues and that of *E. coli* (Figure S2). Further biochemical studies are now required to establish whether or not the existing LpxC inhibitors can (i) inhibit the target enzyme's activity, (ii) effectively penetrate the membrane barrier or (iii) avoid efficient extrusion by the various efflux pumps present in these species.^{27,28}

In conclusion, we found that LPC-058 (bearing a difluoromethyl-*allo*-threonyl hydroxamate head group and a *para*-amino biphenyl diacetylene tail group) is highly effective *in vitro* against a broad range of Enterobacteriaceae and non-fermentative Gram-negative clinical strains. The compound retains potent activity against MDR/XDR strains. Moreover, our results showed that LPC-058 was synergistic with several classes of antibiotics against carbapenemase-producing isolates - suggesting that an LPC-058-containing combination regimen might hold promise for the clinical treatment of drug-resistant Gram-negative pathogens.

Acknowledgements

We thank Michel Simonet (Lille, France) for critically reading the manuscript, and Thilo Köhler (Geneva, Switzerland) for the gift of strains PT629 and ERYR.

Funding

This work was funded in part by National Institutes of Health grants AI055588, AI094475, and GM115355 (awarded to P.Z.) and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Institut Pasteur de Lille, the Université Lille Nord de France and the Centre National de la Recherche Scientifique.

Transparency declarations

P.Z. and E.J.T. declare a competing financial interest: a patent on difluoromethyl-*allo*-threonyl-hydroxamate was awarded to P.Z. and E.J.T.

All other authors: none to declare.

Supplementary data

Chemical synthesis of LPC-087, Table S1 and Figures S1 and S2 are available as supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org>).

References

- 1 Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M *et al.* Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; **25**: 682-707.
- 2 De Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG *et al.* Burden of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay associated with bloodstream infections due to *Escherichia coli* resistant to third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 398-407.

- 3** Kallen AJ, Hidron AI, Patel J *et al.* Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; **31**: 528-31.
- 4** Jackman JE, Raetz CR, Fierke CA. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* 1999; **38**: 1902-11.
- 5** Onishi HR, Pelak BA, Gerckens LS *et al.* Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science* 1996; **274**: 980-2.
- 6** Barb AW, McClerren AL, Snehelatha K *et al.* Inhibition of lipid A biosynthesis as the primary mechanism of CHIR-090 antibiotic activity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 2007; **46**: 3793-802.
- 7** Barb AW, Jiang L, Raetz CR *et al.* Structure of the deacetylase LpxC bound to the antibiotic CHIR-090: Time-dependent inhibition and specificity in ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 18433-8.
- 8** Lee CJ, Liang X, Chen X *et al.* Species-specific and inhibitor-dependent conformations of LpxC: implications for antibiotic design. *Chem Biol* 2011; **18**: 38-47.
- 9** Lee CJ, Liang X, Gopaldaswamy R *et al.* Structural basis of the promiscuous inhibitor susceptibility of *Escherichia coli* LpxC. *ACS Chem Biol* 2014; **9**: 237-46.

- 10** Tomaras AP, McPherson CJ, Kuhn M *et al.* LpxC inhibitors as new antibacterial agents and tools for studying regulation of lipid A biosynthesis in Gram-negative pathogens. *MBio* 2014; **5**: e01551-14.
- 11** Lee CJ, Liang X, Wu Q *et al.* Drug design from the cryptic inhibitor envelope. *Nat Commun* 2016; **7**:10638.
- 12** Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 2006; **43** Suppl 2:S95-9.
- 13** Timsit JF, Soubirou JF, Voiriot G *et al.* Treatment of bloodstream infections in ICUs. *BMC Infect Dis* 2014; **14**:489.
- 14** Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 268-81.
- 15** Ghisalberty D, Masi M, Pagès JM *et al.* Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **328**: 1113-8.
- 16** Dumas JL, van Delden C, Perron K *et al.* Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **254**: 217-25.
- 17** Hamzeshpour MM, Pechere JC, Plesiat P *et al.* OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2392-6.

18 Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P *et al.* Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3298-304.

19 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplements M100-S24. CLSI Wayne, PA, USA, 2014.

20 Caughlan RE, Jones AK, Delucia AM *et al.* Mechanisms decreasing *in vitro* susceptibility to the LpxC inhibitor CHIR-090 in the gram-negative pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 17-27.

21 Mariat C, Venet C, Jehl F *et al.* Continuous infusion of ceftazidime in critically ill patients undergoing continuous venovenous haemodiafiltration: pharmacokinetic evaluation and dose recommendation. *Crit Care* 2006; **10**:R26.

22 Lüthy R, Münch R, Blaser J *et al.* Human pharmacology of cefotaxime (HR 756), a new cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; **16**:127-33.

23 Gotfried MH, Danziger LH, Rodvold KA. Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of levofloxacin and ciprofloxacin in healthy adult subjects. *Chest* 2001; **119**: 1114-22.

24 Jaruratanasirikul S, Raungsri N, Punyo J *et al.* Pharmacokinetics of imipenem in healthy volunteers following administration by 2 h or 0.5 h infusion. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 1163-5.

25 White BP, Lomaestro B, Pai MP. Optimizing the initial amikacin dosage in adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 7094-6.

26 Domagala JM, Hanna LD, Heifetz CL *et al.* New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J Med Chem* 1986; **29**: 394-404.

27 Hu Y, Zhu Y, Ma Y *et al.* Genomic insights into intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 ; **59**: 1152-61.

28 Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 337-418.

Table 1. Activities of LPC-058, LPC-011, LPC-087 and the reference compound CHIR-90 against 234 clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and 135 clinical isolates of non-fermentative Gram-negative bacilli.

Organism group (number of isolates tested)	MIC (mg/L)	LPC-058	LPC-011	LPC-087	CHIR-090
<i>Enterobacteriaceae</i> (234)	MIC50	0.06	0.12	0.25	0.5
	MIC90	0.12	0.25	0.5	2
	Range	≤ 0.015 - 0.5	≤ 0.015 - 1	≤ 0.015 - 2	0.03 - 8
<i>P. aeruginosa</i> (51)	MIC50	0.25	0.5	2	2
	MIC90	0.5	1	4	4
	Range	0.06 - 0.5	0.12 - 1	0.25 - 8	0.5 - 8
<i>A. baumannii</i> (26)	MIC50	0.25	≥ 64	1	≥ 64
	MIC90	1	≥ 64	32	≥ 64
	Range	0.12 - 4	-	0.5 - ≥ 64	-
<i>B. cepacia</i> (22)	MIC50	0.5	4	≥ 64	≥ 64
	MIC90	1	8	≥ 64	≥ 64
	Range	0.12 - 2	1 - 8	-	-
<i>S. maltophilia</i> (20)	MIC50	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
	MIC90	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
	Range	-	-	-	-
<i>A. xylosoxidans</i> (16)	MIC50	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
	MIC90	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
	Range	-	-	-	-

Table 2. MICs of LPC-058, LPC-011, LPC-087 and CHIR-090 when tested against *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* mutant strains overexpressing RND pump efflux systems and their respective parental strains.

	Strain	Efflux pump status	MIC (mg/L)			
			LPC-058	LPC-011	LPC-087	CHIR-090
<i>E. aerogenes</i>	ATCC 13048	WT ^a	0.12	0.25	0.5	0.5
	CM64	AcrAB-TolC overexpressed	0.5	1	4	4
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	WT	0.12	0.25	2	2
	PT629	MexAB-OprM overexpressed	0.12	0.25	8	8
	ERYR	MexCD-OprJ overexpressed	0.25	0.5	8	8
<i>A. baumannii</i>	CIP7010	WT	4	ND	ND	ND
	CIP7010-1	AdeABC overexpressed	8	ND	ND	ND

^a WT, isogenic, antibiotic-susceptible parent

ND: not determined

Table 3. Activities of LpxC inhibitors as a function of the resistance phenotype in *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii*.

Organism groups (number tested)	MIC (mg/L)	LPC-058	LPC-011	LPC-087	CHIR-090
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC50	0.06	0.12	0.25	0.5
Non-MDR/XDR (196)	MIC90	0.12	0.25	0.5	1
	Range	≤ 0.015-0.25	≤ 0.015-1	≤ 0.015-1	0.03-2
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC50	0.06	0.12	0.25	0.5
MDR or XDR (38a)	MIC90	0.25	0.5	1	2
	Range	≤ 0.015-0.25	0.06-1	0.25-1	0.25-8
<i>P. aeruginosa</i>	MIC50	0.25	0.5	2	2
Non-MDR/XDR (31)	MIC90	0.5	1	4	4
	Range	0.06-0.5	0.25-2	0.25-4	0.5-8
<i>P. aeruginosa</i>	MIC50	0.25	0.5	4	4
MDR or XDR (20b)	MIC90	0.5	1	8	8
	Range	0.12-0.5	0.25-1	1-8	2-8
<i>A. baumannii</i>	MIC50	0.25	≥ 64	1	≥ 64
Non-MDR/XDR (6)	MIC90	0.5	≥ 64	2	≥ 64
	Range	0.12-0.5	≥ 64	0.5-2	≥ 64
<i>A. baumannii</i>	MIC50	0.25	≥ 64	1	≥ 64
MDR or XDR (20c)	MIC90	1	≥ 64	32	≥ 64
	Range	0.12-4	≥ 64	0.5-≥64	≥ 64

a includes 17 ESBL-producing and 5 carbapenemase-producing strains [OXA-48 (n=3), NDM (n=1) and KPC (n=1)]

b includes 3 ESBL-producing and 5 carbapenemase-producing strains [VIM (n=4) and IMP (n=1)]

c includes one ESBL-producing and 10 carbapenemase-producing strains [OXA-23 (n=9) and OXA-40 (n=1)]

Table 4: MICs (in CAMH-adjusted broth) for the four MDR/XDR strains used in time-kill assays.

Strain	MIC (mg/L)					
	LPC-058	CTX	CAZ	IPM	AMK	CIP
<i>E. coli</i> with CTX-M-15	0.06	256	ND	0.25	32	64
<i>K. pneumoniae</i> with KPC-2	0.12	512	ND	16	32	16
<i>P. aeruginosa</i> with VIM-1	0.5	ND	64	256	4	16
<i>A. baumannii</i> with OXA-23	0.5	ND	128	32	1024	32

ND: not determined

CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime, IPM, imipenem; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin.

Table 5: Interactions between conventional antibiotics and LPC-058 at 0.25x, 0.5x and 1x MIC against *E. coli* producing CTX-M-15 ESBL, and *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* respectively producing KPC-2, VIM-1 and OXA-23 carbapenemases.

Strain	Multiple of the MIC of conventional antibiotics	(Combination effect, time in h)		
		Multiple of the MIC of LPC-058		
		0.25 x	0.5x	1x
<i>E. coli</i> CTX-M-15	CTX 0.5x	Synergy, 9 h	Synergy, 6 h	Indifference
	AMK 0.25x	Synergy, 9 h	Synergy, 9 h	Indifference
	CIP 0.5x	Synergy, 6 h	Synergy, 6 h	Indifference
<i>K. pneumoniae</i> KPC-2	CTX 0.25x	Indifference	Synergy, 24 h	Synergy, 24 h
	IPM 0.5x	Synergy, 9 h	Synergy, 9 h	Synergy, 9 h
	AMK 0.5x	Synergy, 9 h	Synergy, 9 h	Synergy, 9 h
	CIP 0.5x	Indifference	Indifference	Synergy, 24 h
<i>P. aeruginosa</i> VIM-1	CAZ 0.5x	Synergy, 6 h	Synergy, 9 h	Synergy, 24 h
	IPM 0.125x	Synergy, 6 h	Synergy, 9 h	Synergy, 24 h
	AMK 0.5x	Synergy, 9 h	Synergy, 9 h	Synergy, 24 h
	CIP 0.25x	Indifference	Indifference	Synergy, 24 h
<i>A. baumannii</i> OXA-23	IPM 0.5x	ND	Synergy, 3 h	Synergy, 3 h
	AMK 0.062x	ND	Indifference	Indifference
	CIP 0.5x	ND	Synergy, 6 h	Synergy, 6 h

a bacterial regrowth at 24 h

ND: non determined

CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime, IPM, imipenem; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin.

Figure Captions

Figure 1. Antibiotics targeting LpxC in the lipid A biosynthetic pathway in Gram-negative bacteria. The LpxC inhibitors' head groups, tail groups and morpholine moiety (if present) are highlighted in grey.

Figure 2. Twenty-four-hour time-kill curves with LPC-058 alone at 1, 2, 4 and 8x MIC, as tested against CTX-M-15 ESBL-producing *E. coli* (a), KPC-2 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (b), VIM-1 carbapenemase-producing *P. aeruginosa* (c) and OXA-23 carbapenemase-producing *A. baumannii* (d). The dashed horizontal line indicates the LOD ($\leq 1.3 \log_{10}$ cfu). The bacterial count corresponds to the mean of at least two independent experiments in duplicate.

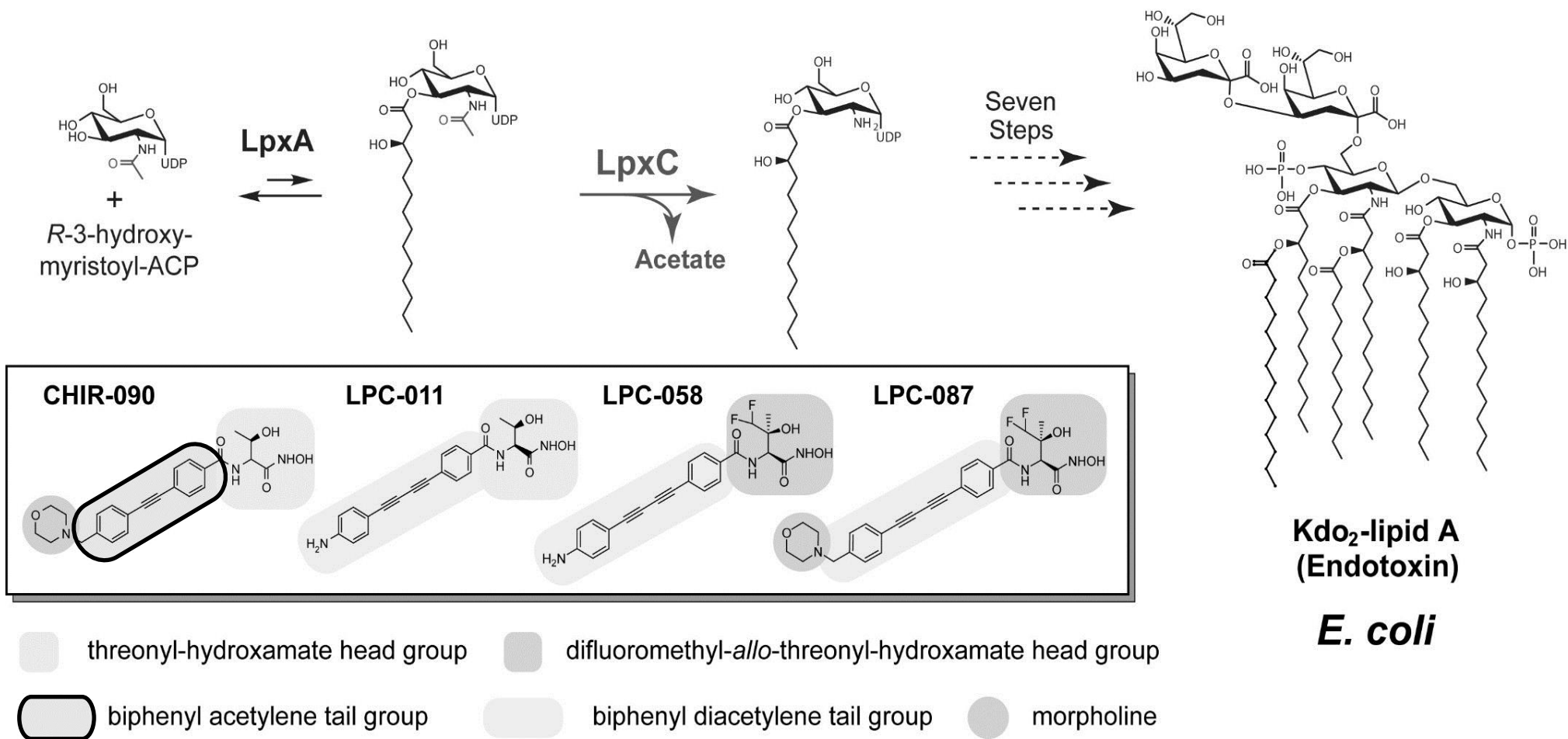
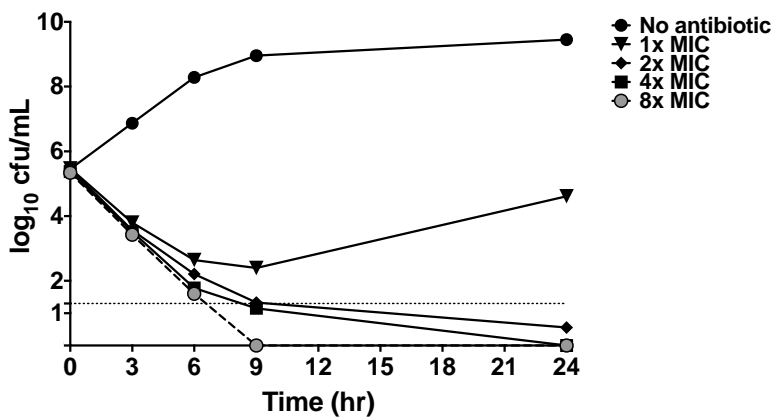
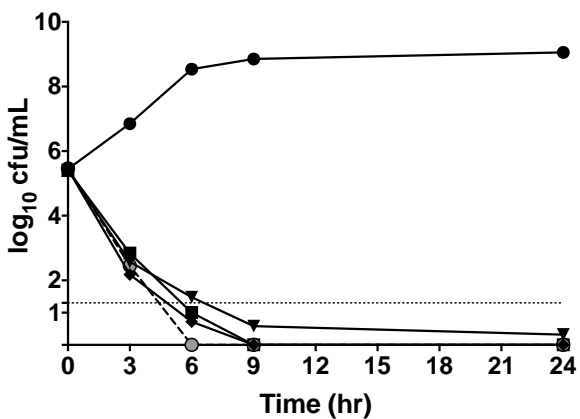


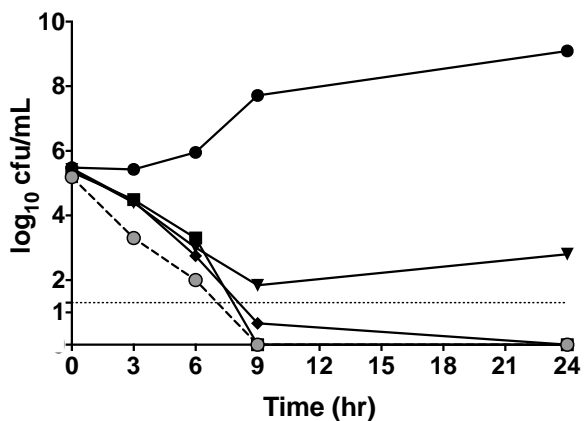
Figure 1

Figure 2.

(a) *E. coli* with CTX-M-15



(c) *P. aeruginosa* with VIM-1



(d) *A. baumannii* with OXA-23

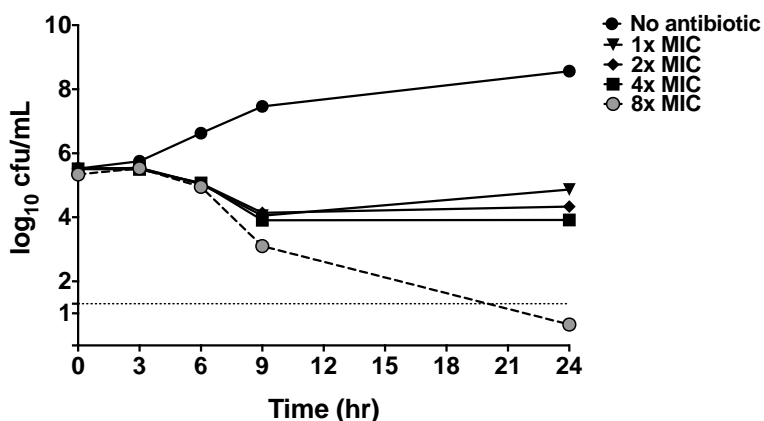
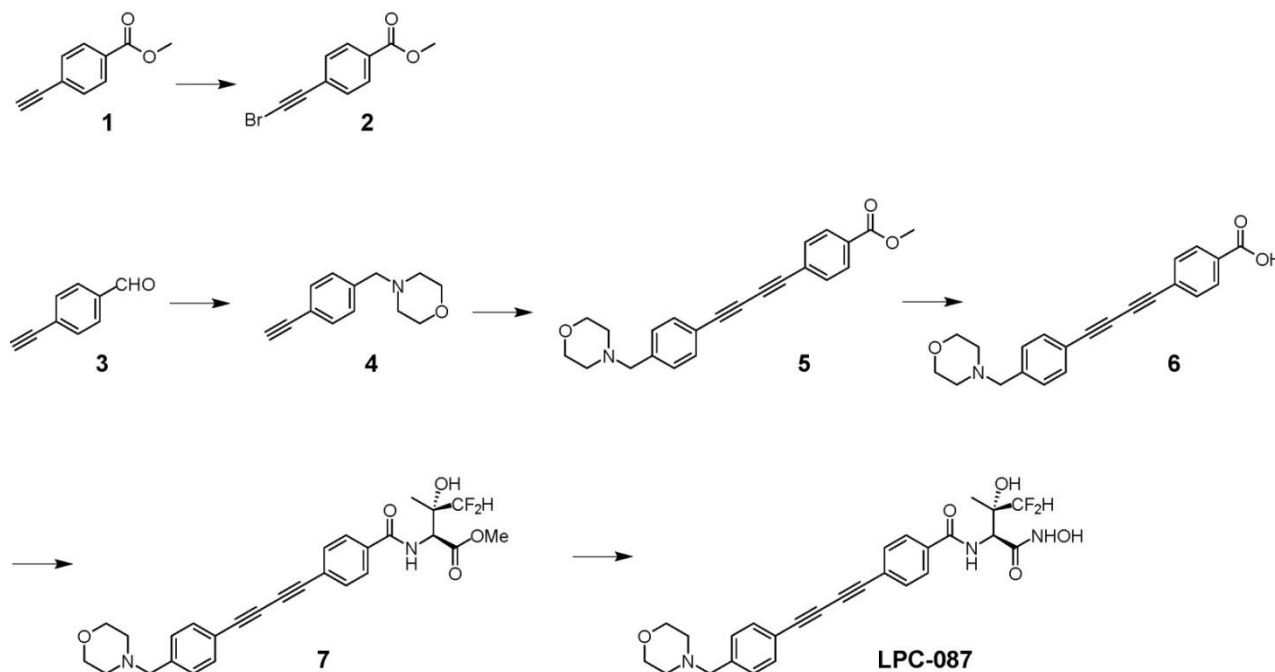


Figure 2.

Supplementary Methods

Chemical Synthesis of *N*-((2*S*,3*S*)-4,4-difluoro-3-hydroxy-1-(hydroxyamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamide (LPC-087)



The synthesis of compound **LPC-087** was started from the 4-ethynylbenzaldehyde **3**, which was reacted with morpholine and NaBH(OAc)₃ at room temperature under argon. Then the methyl 4-(bromoethynyl)benzoate **2** was reacted with near stoichiometric amount of 4-(4-ethynylbenzyl)morpholine **4** in the presence of the catalyst copper(II) acetate under anaerobic conditions at room temperature to provide the Methyl 4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoate **5**. The compound **5** was then hydrolyzed by LiOH to give the crude 4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoic acid **6**, which was coupled with (2*S*,3*S*)-methyl 2-amino-4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate **1,2** under the EDC/HOBt condition to provide (2*S*,3*S*)-methyl 4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methyl-2-(4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamido)butanoate **7**. The compound **7** was reacted with NH₂OH and KCN to form *N*-((2*S*,3*S*)-4,4-difluoro-3-hydroxy-1-(hydroxyamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamide (**LPC-087**). The total yield of **LPC-087** is 24%.

Methyl 4-(bromoethynyl)benzoate (2): NBS (3.34 g, 18.8 mmol, 1.50 equiv) was added to the acetone solution (60 mL) of methyl 4-ethynylbenzoate **1** (2.00 g, 12.5 mmol, 1.00 equiv) and CF₃COOAg (0.21 g, 1.25 mmol, 0.10 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature under argon for 24 h. The reaction mixture was then poured into ice water and stirred for another 0.5 h. The suspension mixture was extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with EtOAc in hexanes 0-7%) to provide the product **2** as white

solid 2.4 g, yield 80%. ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3.9 (s, 3H), 7.50 (d, J=8.1 Hz, 2H), 7.97 (d, J=6.9 Hz, 2H); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 52.25, 53.36, 79.39, 127.28, 129.47, 129.94, 131.93, 166.34; HPLC-MS (ESI, m/z): 240,1132 [M+H]⁺.

4-(4-ethynylbenzyl)morpholine (4): To a solution of 4-ethynyl(benzaldehyde) **3** (1.50 g, 11.5 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous THF (40 mL) was added morpholine (1.25 g, 14.4 mmol, 1.25 equiv) at room temperature under argon. Then the mixture was cooled to 0 °C. Then 4.87 g of NaHB(OAc)₃ was added at four portion. The reaction mixture was stirred 0 °C for 1 h, then it was allowed to warm to room temperature for 15 h. The yellow suspension mixture was concentrated to dryness. The residue was diluted with water (100 mL), extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with EtOAc in hexanes 0-50%) to give product **4** as white solid 2.08 g, yield 90%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.41 (t, 4H, J=9.3 Hz), 3.06 (s, 1H), 3.47 (s, 2H), 3.69 (t, 4H, J=9.6 Hz), 7.28 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.43 (d, 2H, J=7.8 Hz); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 53.59, 63.05, 66.96, 83.58, 120.85, 129.01, 132.04, 138.84; HPLC-MS (ESI, m/z): 202.1160 [M+H]⁺.

Methyl 4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoate (5): To a solution of compound **2** (1.50 g, 7.5 mmol, 1.50 equiv) in anhydrous THF (20 mL) was added compound **4** (1.20 g, 5.0 mmol, 1.00 equiv), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.35 g, 0.5 mmol, 0.10 equiv), PPh₃ (0.066 g, 0.25 mmol, 0.005 equiv), CuI (0.048 g, 0.25 mmol, 0.05 equiv) and TEA (2.1 mL, 15.0 mmol, 3.0 equiv). The reaction mixture was then heated to 45 °C under argon for 14 h. The suspension mixture was concentrated to dryness. The residue was diluted with EtOAc (150 mL) and filtered through a pad of celite. The filtrate was washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄) to give the product **5** as white solid 1.26 g, yield 70%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.42 (t, 4H, J=9.0 Hz), 3.48 (s, 2H), 3.69 (t, 4H, J=9.6 Hz), 3.91 (s, 3H), 7.31 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.48 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.56 (d, 2H, J=9.0 Hz), 7.99 (d, 2H, J=8.7 Hz); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 52.30, 53.61, 63.05, 66.97, 73.46, 76.64, 80.43, 83.05, 120.13, 126.49, 129.15, 129.53, 130.24, 132.35, 132.51, 139.86, 166.27; HPLC-MS (ESI, m/z): 360.1542 [M+H]⁺.

4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoic acid (6): To a solution of compound **5** (0.79 g, 2.2 mmol, 1.0 equiv) in methanol (8 mL) and H₂O (4 mL) was added LiOH.H₂O (0.097 g, 2.3 mmol, 1.05 equiv). The reaction mixture was heated to reflux for 3 h under argon. The resulting mixture was concentrated to dryness. The residue was diluted with 30 mL of water and added 1N HCl to pH around 3. The white precipitate was filtered and dried to afford the compound **6** as white solid 0.7 g, yield 93%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.92 (s, br, 4H), 3.78 (s, br, 4H), 4.14 (s, 2H), 7.63 (s, br, 4H), 7.68 (d, 2H, J=8.8 Hz), 7.92 (d, 2H, J=8.4 Hz); ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 51.63, 64.12, 74.32, 76.13, 81.69, 82.99, 105.00, 125.01, 129.99, 131.86, 132.10, 133.04, 133.06, 166.90; HPLC-MS (ESI, m/z): 346.1367[M+H]⁺.

(2S,3S)-methyl 4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methyl-2-(4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamido)butanoate (7): To a solution of compound **6** (50 mg, 0.228 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous DMF (1 mL) was added (2S,3S)-methyl 2-amino-4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate 1,2 (93 mg, 0.273 mmol, 1.20 equiv), EDC (52 mg, 0.273 mmol, 1.20 equiv), HOBt (37 mg, 1.20 equiv, 37 mmol) and DIPEA (0.24 mL, 1.14 mmol, 5.0 equiv) at room temperature under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature for 14 h. The resulting mixture was concentrated to

dryness. The residue was diluted with water (20 mL), extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with MeOH in DCM 0-3%) to provide the product **7** as white solid 100 mg, yield 86%. ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 1.36 (s, 3H), 2.44 (t, 4H, J=9.0 Hz), 3.47 (s, 2H), 3.68 (t, 4H, J=9.0 Hz), 3.77 (s, 3H), 4.97 (d, 2H, J=8.7 Hz), 5.75 (t, 1H, J=111.9Hz), 7.24 (d, 1H, J=8.7Hz), 7.30 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.46 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.55 (d, 2H, J=8.1 Hz), 7.78 (d, 2H, J=7.8Hz); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 18.08, 52.92, 53.58, 55.98, 63.08, 66.96, 74.04 (t, J=43Hz), 88.31, 92.20, 105.00, 115.78 (t, J=493.95Hz), 127.27, 127.48, 127.82, 129.16, 131.66, 131.77, 132.25, 138.83, 167.06, 170.22; ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃) δ -128.98, -135.17 (ABq, J_{HH}=59.4 Hz, J_{HF}=360.6Hz); HPLC-MS (ESI, m/z): 511.1200 [M+H]⁺.

N-((2S,3S)-4,4-difluoro-3-hydroxy-1-(hydroxyamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamide (LPC-087): To a solution of compound **7** (90 mg, 0.18 mmol, 1.0 equiv) in methanol (4 mL) was added KCN (10 mg) at 0 °C under argon. Then 2 mL of 50% NH₂OH was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h, then was allowed to warm to room temperature for 14 h. The resulting mixture was concentrated to dryness. The residue was diluted with water (100 mL), extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with MeOH in DCM 0-10%) to give the product **LPC-087** as white solid 57 mg, yield 63%. ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.37(s, 3H), 2.45 (t, 4H, J=8.1 Hz), 3.54 (s, 2H), 3.68 (t, 4H, J=8.4 Hz), 4.75 (s, 1H), 5.82 (t, 1H, J=112.2 Hz), 7.38 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.51 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.63 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.87 (d, 2H, J=7.5 Hz); ¹³C (75MHz, CD₃OD) δ 53.21, 54.66, 62.44, 66.35, 72.67, 72.73, 75.43, 79.82, 82.14, 115.75, 120.11, 125.22, 127.40, 129.42, 132.12, 132.21, 133.85, 139.30, 166.25, 167.13; ¹⁹F (300MHz, CD₃OD) δ -129.93, -137.84 (ABq, J_{HH}=60.3Hz, J_{HF}=361.8 Hz); HRMS: C₂₇H₂₇F₂N₃O₅ calculated 511.1919, obtained 511.1925.

References:

1. Lee CJ, Liang X, Wu Q *et al.* Drug Design from the Cryptic Inhibitor Envelope. *Nat Commun* 2016; **7**:10638.
2. Arnone A, Gestmann D, Valdo Meille S *et al.* Synthesis of enantiomerically pure 3-fluoromethylthreonines from (S)- 1 -fluoro-3- tolylsulfinylacetone. *Chem. Commun* 1996; **22**:2569-70.

Table S1. MIC values of biphenyl-diacetylene LpxC inhibitors LPC-058, LPC-087, LPC-011 and the reference compound CHIR-090 against Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *B. cepacia* clinical isolates.

Organism group (number tested)	Cumulative % of strains inhibited by LpxC inhibitors at MIC (mg/L) of:													MIC mg/L	
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC50	MIC90
<i>E. coli</i> (20)															
LPC-058	25.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.03
LPC-011	5.5	60.0	85.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.12
LPC-087	0.0	15.0	70.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
CHIR-090	0.0	0.0	10.0	70.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
<i>C. koseri</i> (25)															
LPC-058	0.0	16.0	72.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
LPC-011	0.0	4.0	28.0	72.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
LPC-087	0.0	0.0	0.0	12.0	72.0	92.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	60.0	88.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	2
<i>K. pneumoniae</i> (29)															
LPC-058	0.0	0.0	45.5	77.3	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
LPC-011	0.0	0.0	4.5	54.5	86.4	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.5
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	45.5	86.4	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	63.6	90.9	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1
<i>Enterobacter</i> spp.a (23)															
LPC-058	0.0	0.0	75.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
LPC-011	0.0	0.0	15.0	85.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
LPC-087	0.0	0.0	0.0	35.0	80.0	90.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	80.0	90.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1

a includes the following species (no): *Enterobacter aerogenes* (4) and *E. cloacae* (16)

Table S1 (continued)

Organism group (number tested)	Cumulative % of strains inhibited by LpxC inhibitors at MIC (mg/L) of:													MIC mg/L	
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC50	MIC90
<i>S. marcescens</i> (20)															
LPC-058	0.0	20.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.06
LPC-011	0.0	5.0	35.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.12
LPC-087	0.0	0.0	5.0	25.0	60.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	5.0	60.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
<i>C. freundii</i> (12)															
LPC-058	0.0	33.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.06
LPC-011	0.0	8.3	75.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
LPC-087	0.0	0.0	0.0	25.0	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.25
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	8.3	50.0	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
<i>P. mirabilis</i> (19)															
LPC-58	0.0	26.3	94.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.06
LPC-011	0.0	0.0	10.5	47.4	73.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
LPC-087	0.0	0.0	5.3	63.2	89.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	42.1	78.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	2
<i>M.morganii</i> (23)															
LPC-058	43.5	95.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.03
LPC-011	0.0	8.7	69.6	87.0	95.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.25
LPC-087	0.0	0.0	0.0	60.9	82.6	95.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	52.2	82.6	95.7	95.7	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	2

Table S1 (continued)

Organism group (number tested)	Cumulative % of strains inhibited by LpxC inhibitors at MIC (mg/L) of:													MIC mg/L	
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC50	MIC90
<i>Salmonella</i> spp. (22)															
LPC-058	0.0	9.1	90.9	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.06
LPC-011	0.0	0.0	0.0	31.8	95.5	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.25
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	90.9	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.9	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	2
<i>Shigella</i> spp. (21)															
LPC-058	47.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.03
LPC-011	0.0	76.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.06
LPC-087	0.0	28.6	81.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
CHIR-090	0.0	4.8	19.0	85.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
<i>Yersinia</i> spp.b (20)															
LPC-058	0.0	10.0	80.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
LPC-011	0.0	0.0	20.0	80.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
LPC-087	0.0	0.0	10.0	60.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	15.0	55.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	2

b includes the following species (no) : *Yersinia enterocolitica* (10) and *Y. pseudotuberculosis* (10)

Table S1 (continued)

Organism group (number tested)	Cumulative % of strains inhibited by LpxC inhibitors at MIC (mg/L) of:													MIC mg/L	
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC5 0	MIC9 0
<i>P. aeruginosa</i> (51)															
LPC-058	0.0	0.0	2.0	11.8	78.4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
LPC-011	0.0	0.0	0.0	2.0	19.6	78.4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	9.8	9.8	70.6	96.1	100.0	100.0	100.0	100.0	2	4
CHIR-90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0	54.9	92.2	100.0	100.0	100.0	100.0	2	4
<i>A. baumannii</i> (26)															
LPC-058	0.0	0.0	0.0	11.5	69.2	84.6	92.3	96.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	1
LPC-011	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	≥ 64	≥ 64
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	26.9	57.7	80.8	80.8	80.8	80.8	96.2	100.0	1	32
CHIR-90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	≥ 64	≥ 64
<i>B. cepacia</i> (22)															
LPC-058	0.0	0.0	0.0	22.7	22.7	72.7	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1
LPC-011	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	31.8	72.7	100.0	100.0	100.0	100.0	4	8
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	≥ 64	≥ 64
CHIR-90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	≥ 64	≥ 64

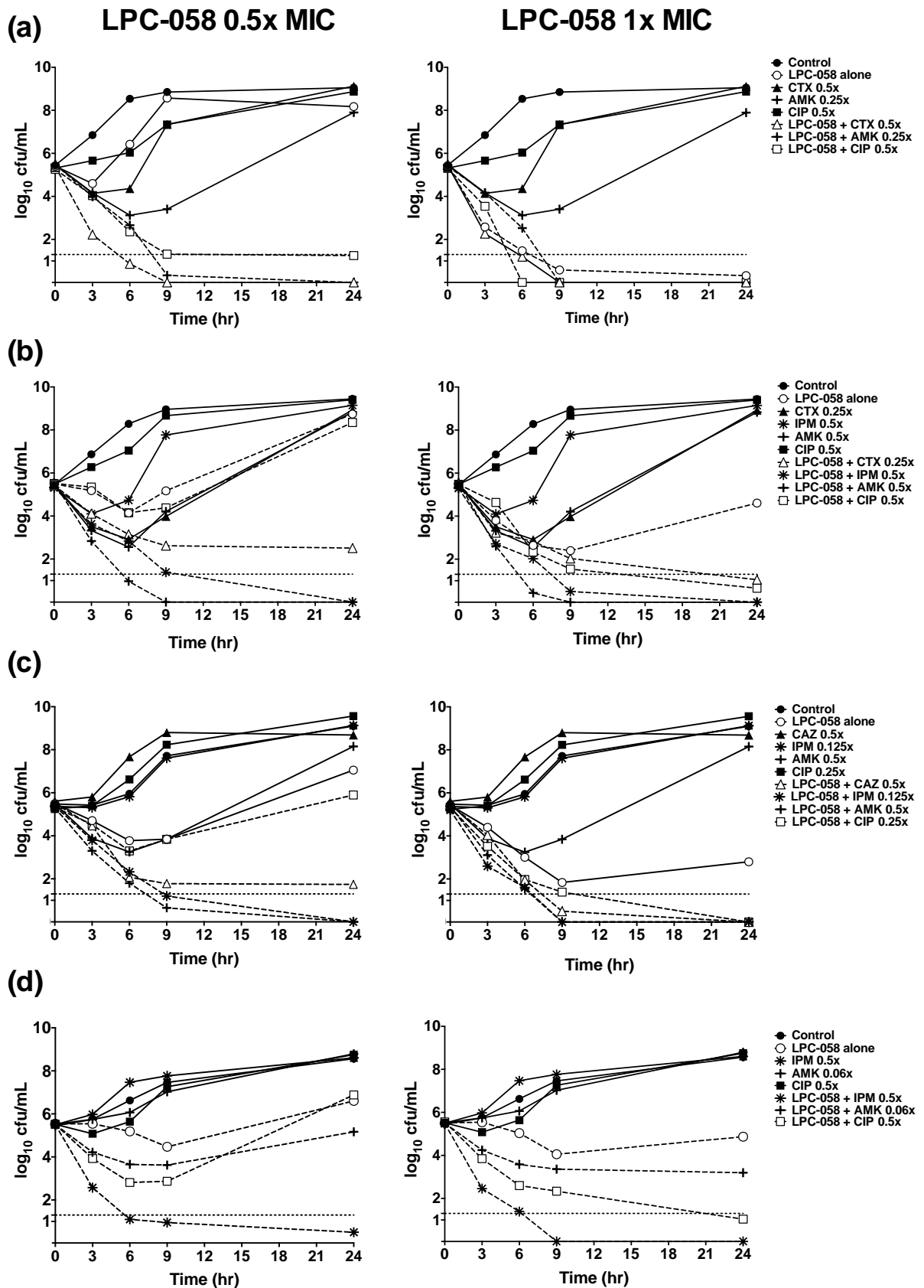
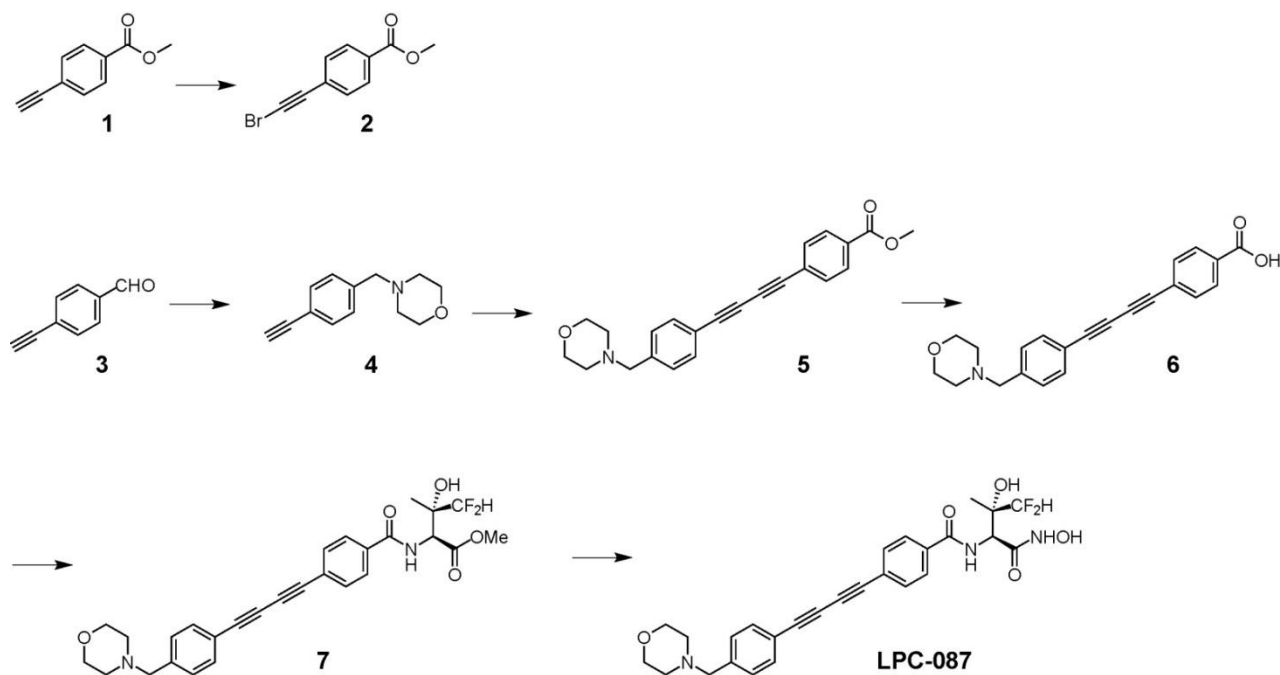


Figure S1. Twenty-four-hour time-kill curves with LPC-058 at 0.5x MIC (left) and 1x MIC (right) combined with cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), imipenem (IPM), amikacin (AMK) and ciprofloxacin (CIP) as tested against CTX-M-15 ESBL-producing *E. coli* (a). KPC-2 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (b). VIM-1 carbapenemase-producing *P. aeruginosa* (c) and OXA-23 carbapenemase-producing *A. baumannii* (d). The dashed horizontal line indicates the LOD ($\leq 1.3 \log_{10}$ cfu). The bacterial count corresponds to the mean of at least two independent experiments in duplicate.

Supplementary Methods

Chemical Synthesis of *N*-((2*S*,3*S*)-4,4-difluoro-3-hydroxy-1-(hydroxyamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamide (LPC-087)



The synthesis of compound **LPC-087** was started from the 4-ethynylbenzaldehyde **3**, which was reacted with morpholine and NaBH(OAc)₃ at room temperature under argon. Then the methyl 4-(bromoethynyl)benzoate **2** was reacted with near stoichiometric amount of 4-(4-ethynylbenzyl)morpholine **4** in the presence of the catalyst copper(II) acetate under anaerobic conditions at room temperature to provide the Methyl 4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoate **5**. The compound **5** was then hydrolyzed by LiOH to give the crude 4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoic acid **6**, which was coupled with (2*S*,3*S*)-methyl 2-amino-4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate **1,2** under the EDC/HOBt condition to provide (2*S*,3*S*)-methyl 4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methyl-2-(4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamido)butanoate **7**. The compound **7** was reacted with NH₂OH and KCN to form *N*-((2*S*,3*S*)-4,4-difluoro-3-hydroxy-1-(hydroxyamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamide (**LPC-087**). The total yield of LPC-087 is 24%.

Methyl 4-(bromoethynyl)benzoate (2): NBS (3.34 g, 18.8 mmol, 1.50 equiv) was added to the acetone solution (60 mL) of methyl 4-ethynylbenzoate **1** (2.00 g, 12.5 mmol, 1.00 equiv) and CF₃COOAg (0.21 g, 1.25 mmol, 0.10 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature under argon for 24 h. The reaction mixture was then poured into ice water and stirred for another 0.5 h. The suspension mixture was extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with EtOAc in hexanes 0-7%) to provide the product **2** as white

solid 2.4 g, yield 80%. ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3.9 (s, 3H), 7.50 (d, J=8.1 Hz, 2H), 7.97 (d, J=6.9 Hz, 2H); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 52.25, 53.36, 79.39, 127.28, 129.47, 129.94, 131.93, 166.34; HPLC-MS (ESI, m/z): 240,1132 [M+H]⁺.

4-(4-ethynylbenzyl)morpholine (4): To a solution of 4-ethynyl(benzaldehyde) **3** (1.50 g, 11.5 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous THF (40 mL) was added morpholine (1.25 g, 14.4 mmol, 1.25 equiv) at room temperature under argon. Then the mixture was cooled to 0 °C. Then 4.87 g of NaHB(OAc)₃ was added at four portion. The reaction mixture was stirred 0 °C for 1 h, then it was allowed to warm to room temperature for 15 h. The yellow suspension mixture was concentrated to dryness. The residue was diluted with water (100 mL), extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with EtOAc in hexanes 0-50%) to give product **4** as white solid 2.08 g, yield 90%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.41 (t, 4H, J=9.3 Hz), 3.06 (s, 1H), 3.47 (s, 2H), 3.69 (t, 4H, J=9.6 Hz), 7.28 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.43 (d, 2H, J=7.8 Hz); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 53.59, 63.05, 66.96, 83.58, 120.85, 129.01, 132.04, 138.84; HPLC-MS (ESI, m/z): 202.1160 [M+H]⁺.

Methyl 4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoate (5): To a solution of compound **2** (1.50 g, 7.5 mmol, 1.50 equiv) in anhydrous THF (20 mL) was added compound **4** (1.20 g, 5.0 mmol, 1.00 equiv), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.35 g, 0.5 mmol, 0.10 equiv), PPh₃ (0.066 g, 0.25 mmol, 0.005 equiv), CuI (0.048 g, 0.25 mmol, 0.05 equiv) and TEA (2.1 mL, 15.0 mmol, 3.0 equiv). The reaction mixture was then heated to 45 °C under argon for 14 h. The suspension mixture was concentrated to dryness. The residue was diluted with EtOAc (150 mL) and filtered through a pad of celite. The filtrate was washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄) to give the product **5** as white solid 1.26 g, yield 70%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.42 (t, 4H, J=9.0 Hz), 3.48 (s, 2H), 3.69 (t, 4H, J=9.6 Hz), 3.91 (s, 3H), 7.31 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.48 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.56 (d, 2H, J=9.0 Hz), 7.99 (d, 2H, J=8.7 Hz); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 52.30, 53.61, 63.05, 66.97, 73.46, 76.64, 80.43, 83.05, 120.13, 126.49, 129.15, 129.53, 130.24, 132.35, 132.51, 139.86, 166.27; HPLC-MS (ESI, m/z): 360.1542 [M+H]⁺.

4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzoic acid (6): To a solution of compound **5** (0.79 g, 2.2 mmol, 1.0 equiv) in methanol (8 mL) and H₂O (4 mL) was added LiOH.H₂O (0.097 g, 2.3 mmol, 1.05 equiv). The reaction mixture was heated to reflux for 3 h under argon. The resulting mixture was concentrated to dryness. The residue was diluted with 30 mL of water and added 1N HCl to pH around 3. The white precipitate was filtered and dried to afford the compound **6** as white solid 0.7 g, yield 93%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.92 (s, br, 4H), 3.78 (s, br, 4H), 4.14 (s, 2H), 7.63 (s, br, 4H), 7.68 (d, 2H, J=8.8 Hz), 7.92 (d, 2H, J=8.4 Hz); ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 51.63, 64.12, 74.32, 76.13, 81.69, 82.99, 105.00, 125.01, 129.99, 131.86, 132.10, 133.04, 133.06, 166.90; HPLC-MS (ESI, m/z): 346.1367[M+H]⁺.

(2S,3S)-methyl 4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methyl-2-(4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamido)butanoate (7): To a solution of compound **6** (50 mg, 0.228 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous DMF (1 mL) was added (2S,3S)-methyl 2-amino-4,4-difluoro-3-hydroxy-3-methylbutanoate 1,2 (93 mg, 0.273 mmol, 1.20 equiv), EDC (52 mg, 0.273 mmol, 1.20 equiv), HOBt (37 mg, 1.20 equiv, 37 mmol) and DIPEA (0.24 mL, 1.14 mmol, 5.0 equiv) at room temperature under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature for 14 h. The resulting mixture was concentrated to

dryness. The residue was diluted with water (20 mL), extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with MeOH in DCM 0-3%) to provide the product **7** as white solid 100 mg, yield 86%. ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 1.36 (s, 3H), 2.44 (t, 4H, J=9.0 Hz), 3.47 (s, 2H), 3.68 (t, 4H, J=9.0 Hz), 3.77 (s, 3H), 4.97 (d, 2H, J=8.7 Hz), 5.75 (t, 1H, J=111.9Hz), 7.24 (d, 1H, J=8.7Hz), 7.30 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.46 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.55 (d, 2H, J=8.1 Hz), 7.78 (d, 2H, J=7.8Hz); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 18.08, 52.92, 53.58, 55.98, 63.08, 66.96, 74.04 (t, J=43Hz), 88.31, 92.20, 105.00, 115.78 (t, J=493.95Hz), 127.27, 127.48, 127.82, 129.16, 131.66, 131.77, 132.25, 138.83, 167.06, 170.22; ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃) δ -128.98, -135.17 (ABq, J_{HH}=59.4 Hz, J_{HF}=360.6Hz); HPLC-MS (ESI, m/z): 511.1200 [M+H]⁺.

N-((2S,3S)-4,4-difluoro-3-hydroxy-1-(hydroxyamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-4-((4-(morpholinomethyl)phenyl)buta-1,3-diyne-1-yl)benzamide (LPC-087): To a solution of compound **7** (90 mg, 0.18 mmol, 1.0 equiv) in methanol (4 mL) was added KCN (10 mg) at 0 °C under argon. Then 2 mL of 50% NH₂OH was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h, then was allowed to warm to room temperature for 14 h. The resulting mixture was concentrated to dryness. The residue was diluted with water (100 mL), extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried (Na₂SO₄). Evaporation of the solvent afforded the crude product, which was purified by flash chromatography (eluting with MeOH in DCM 0-10%) to give the product **LPC-087** as white solid 57 mg, yield 63%. ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.37(s, 3H), 2.45 (t, 4H, J=8.1 Hz), 3.54 (s, 2H), 3.68 (t, 4H, J=8.4 Hz), 4.75 (s, 1H), 5.82 (t, 1H, J=112.2 Hz), 7.38 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.51 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.63 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.87 (d, 2H, J=7.5 Hz); ¹³C (75MHz, CD₃OD) δ 53.21, 54.66, 62.44, 66.35, 72.67, 72.73, 75.43, 79.82, 82.14, 115.75, 120.11, 125.22, 127.40, 129.42, 132.12, 132.21, 133.85, 139.30, 166.25, 167.13; ¹⁹F (300MHz, CD₃OD) δ -129.93, -137.84 (ABq, J_{HH}=60.3Hz, J_{HF}=361.8 Hz); HRMS: C₂₇H₂₇F₂N₃O₅ calculated 511.1919, obtained 511.1925.

References:

1. Lee CJ, Liang X, Wu Q *et al.* Drug Design from the Cryptic Inhibitor Envelope. *Nat Commun* 2016; **7**:10638.
2. Arnone A, Gestmann D, Valdo Meille S *et al.* Synthesis of enantiomerically pure 3-fluoromethylthreonines from (*S*)- 1 -fluoro-3- tolylsulfinylacetone. *Chem. Commun* 1996; **22**:2569-70.

Table S1. MIC values of biphenyl-diacetylene LpxC inhibitors LPC-058, LPC-087, LPC-011 and the reference compound CHIR-090 against Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *B. cepacia* clinical isolates.

Organism group (number tested)	Cumulative % of strains inhibited by LpxC inhibitors at MIC (mg/L) of:													MIC mg/L	
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC50	MIC90
<i>E. coli</i> (20)															
LPC-058	25.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.03
LPC-011	5.5	60.0	85.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.12
LPC-087	0.0	15.0	70.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
CHIR-090	0.0	0.0	10.0	70.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
<i>C. koseri</i> (25)															
LPC-058	0.0	16.0	72.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
LPC-011	0.0	4.0	28.0	72.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
LPC-087	0.0	0.0	0.0	12.0	72.0	92.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	60.0	88.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	2
<i>K. pneumoniae</i> (29)															
LPC-058	0.0	0.0	45.5	77.3	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
LPC-011	0.0	0.0	4.5	54.5	86.4	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.5
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	45.5	86.4	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	63.6	90.9	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1
<i>Enterobacter</i> spp.a (23)															
LPC-058	0.0	0.0	75.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
LPC-011	0.0	0.0	15.0	85.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
LPC-087	0.0	0.0	0.0	35.0	80.0	90.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	80.0	90.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1

a includes the following species (no): *Enterobacter aerogenes* (4) and *E. cloacae* (16)

Table S1 (continued)

Organism group (number tested)	Cumulative % of strains inhibited by LpxC inhibitors at MIC (mg/L) of:													MIC mg/L	
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC50	MIC90
<i>S. marcescens</i> (20)															
LPC-058	0.0	20.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.06
LPC-011	0.0	5.0	35.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.12
LPC-087	0.0	0.0	5.0	25.0	60.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	5.0	60.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
<i>C. freundii</i> (12)															
LPC-058	0.0	33.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.06
LPC-011	0.0	8.3	75.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
LPC-087	0.0	0.0	0.0	25.0	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.25
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	8.3	50.0	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
<i>P. mirabilis</i> (19)															
LPC-58	0.0	26.3	94.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.06
LPC-011	0.0	0.0	10.5	47.4	73.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
LPC-087	0.0	0.0	5.3	63.2	89.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	42.1	78.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	2
<i>M.morganii</i> (23)															
LPC-058	43.5	95.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.03
LPC-011	0.0	8.7	69.6	87.0	95.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.25
LPC-087	0.0	0.0	0.0	60.9	82.6	95.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	52.2	82.6	95.7	95.7	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	2

Table S1 (continued)

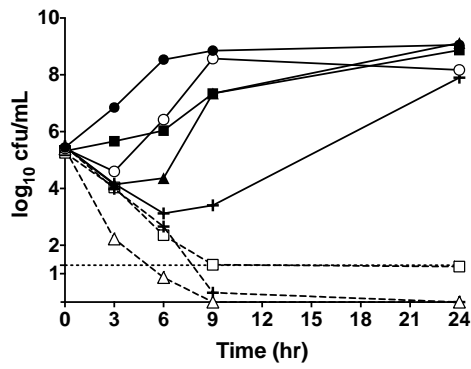
Organism group (number tested)	Cumulative % of strains inhibited by LpxC inhibitors at MIC (mg/L) of:													MIC mg/L	
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC50	MIC90
<i>Salmonella</i> spp. (22)															
LPC-058	0.0	9.1	90.9	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.06
LPC-011	0.0	0.0	0.0	31.8	95.5	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.25
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	90.9	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	0.5
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.9	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	2
<i>Shigella</i> spp. (21)															
LPC-058	47.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.03
LPC-011	0.0	76.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.03	0.06
LPC-087	0.0	28.6	81.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
CHIR-090	0.0	4.8	19.0	85.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
<i>Yersinia</i> spp.b (20)															
LPC-058	0.0	10.0	80.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.06	0.12
LPC-011	0.0	0.0	20.0	80.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
LPC-087	0.0	0.0	10.0	60.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.12	0.25
CHIR-090	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	15.0	55.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	2

b includes the following species (no) : *Yersinia enterocolitica* (10) and *Y. pseudotuberculosis* (10)

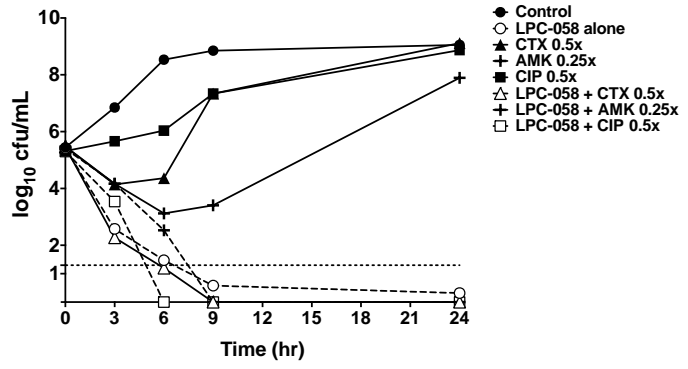
Table S1 (continued)

Organism group (number tested)	Cumulative % of strains inhibited by LpxC inhibitors at MIC (mg/L) of:												MIC mg/L		
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>P. aeruginosa</i> (51)															
LPC-058	0.0	0.0	2.0	11.8	78.4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	0.5
LPC-011	0.0	0.0	0.0	2.0	19.6	78.4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	9.8	9.8	70.6	96.1	100.0	100.0	100.0	100.0	2	4
CHIR-90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0	54.9	92.2	100.0	100.0	100.0	100.0	2	4
<i>A. baumannii</i> (26)															
LPC-058	0.0	0.0	0.0	11.5	69.2	84.6	92.3	96.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.25	1
LPC-011	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	≥ 64	≥ 64
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	26.9	57.7	80.8	80.8	80.8	80.8	96.2	100.0	1	32
CHIR-90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	≥ 64	≥ 64
<i>B. cepacia</i> (22)															
LPC-058	0.0	0.0	0.0	22.7	22.7	72.7	95.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.5	1
LPC-011	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	31.8	72.7	100.0	100.0	100.0	100.0	4	8
LPC-087	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	≥ 64	≥ 64
CHIR-90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	≥ 64	≥ 64

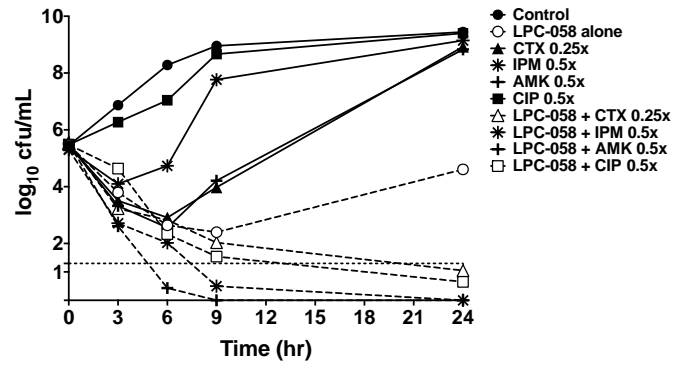
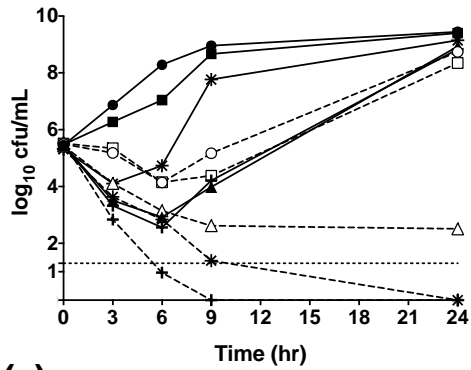
(a) LPC-058 0.5x MIC



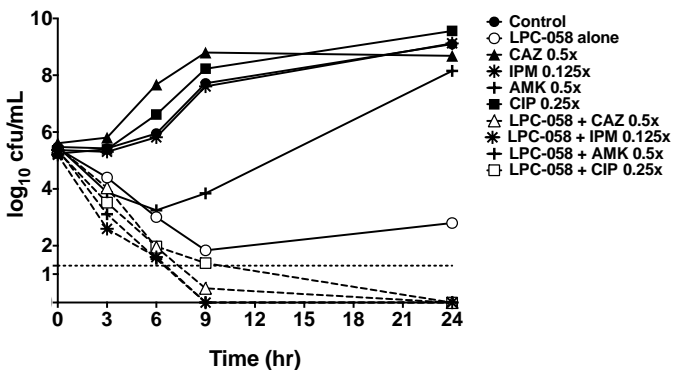
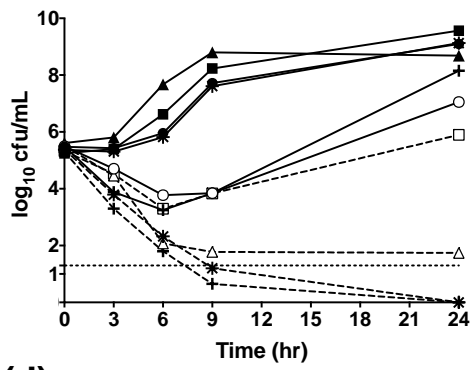
LPC-058 1x MIC



(b)



(c)



(d)

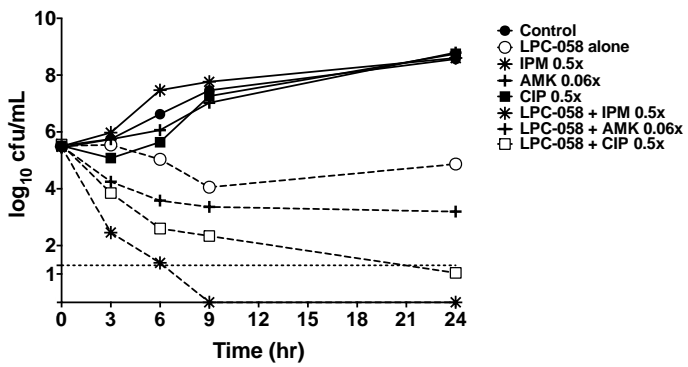
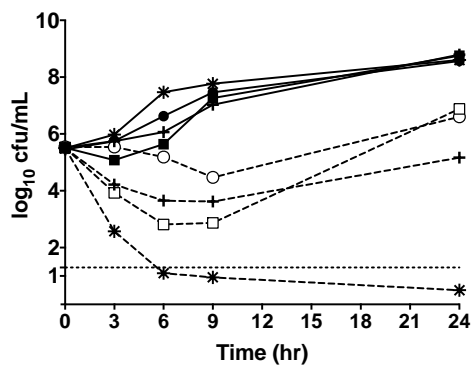


Figure S1. Twenty-four-hour time-kill curves with LPC-058 at 0.5x MIC (left) and 1x MIC (right) combined with cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), imipenem (IPM), amikacin (AMK) and ciprofloxacin (CIP) as tested against CTX-M-15 ESBL-producing *E. coli* (a). KPC-2 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (b). VIM-1 carbapenemase-producing *P. aeruginosa* (c) and OXA-23 carbapenemase-producing *A. baumannii* (d). The dashed horizontal line indicates the LOD ($\leq 1.3 \log_{10}$ cfu). The bacterial count corresponds to the mean of at least two independent experiments in duplicate.

E.c MIKQRTLKRIVQATGVGLHTGKKVTLTLRPAPANTGVIYRRTDLNPPVDFPADAKSVRDTMLCTCLVNEHDVRISTVEHL
P.a MIKQRTLKNIIRATGVGLHSGEKVYLTLPAPVDTGIVFCRTDLDPVVEIPARAENVGETTMSTTLVKG-DVKVDTVEHL
S.m MIQQRTLKNTIRATGVGLHSGDKVYMTLRPAPVNHGIVFRRVDLDPVVEVPAKAELVTEVTLCGLTCN-DAKIQTVEHL
A.b MVKQRTLNRVVKASGIGLHSGQKVMINFIPTVDGGIVFRRIDLDPVVDIPANALLIQEAFMCSNLVTG-DIKVGTIEHV
B.c MLKQRTIKSIVKTVGIGVHSGRKIELTLRPAAPGTGIVFSRVLDLPTPVDIPASAMSIGDTRLASVLQKD-GVRVSTVEHL
A.x MFRQRSIQNLVVRTTGVGVHSGRRVELTLRPAQPNTGIVFHRVDLPQVVDLPAQATGVGDTRMASVLQQG-NVRVSTVEHL

E.c NAALAGLGIDNIVIEVNAPEIPIMDGSAAPFVYLLLDAGIDELNCAKKFVRIKETVRVEDGD----KWAEFKPYNGFSLD
P.a LSAMAGLGIDNAYVELSASEVPIMDGSAGPFVFLIQSAGLQEQEAAKKFIRIKREVSVEEGD----KRAVFVFPDGFKVS
S.m MSALAGLGVDNIIVELSSAELPIMDGSAGPFVLLQSAGIVEQDAPKRFIRVLKTVEVTEGD----KVARFSPYEGYKLG
A.b MSAIAGLGIDNLIVEVSASEVPIMDGSAGPFIYLLMQGGLREQDAPKKFIKILKPVEALIDD----KKAIFSPHNGFQLN
B.c MSACAGLGIDNLYVDVTAEIPIMDGSAATFVFLIQSAGIEEQNAPKRFIKVKKPVEIRDGD----KFARLDPYFGFKLK
A.x MSALAGLGIDNLHIDLTAEEVPIMDGSAAATFVYLLRSAGIVEQNAPKQFIRVLKPVEVREGEGRNEKWARLEPHEGYALA

E.c FTIDFNHPAIDSSNQRYAMNFSADAFMRQISRARTFGFMRDIEYLQSRGLCLGGSFDCAIVVDDYRVLNEDGLRFEDEFV
P.a FEIDFDHPVFRGRTQQASVDFSSTSFVKEVSRARTFGFMRDIEYLRSQLALGGSVENAIIVVDENRVLNEDGLRYEDEFV
S.m FTIQFDHPMIPAKQSRQEIIEFSTLAYTKEISRARTFGFMRDLEYMRERNLGLGGSMDNAIVLDEFRVLNEDGLRYADEFV
A.b FTIDFDHPAFAKEYQSATIDFSTETFFVYEVSEARTFGFMKDLDYLKANNLALGASLDNAIGVDDTGVVNEEGLRFADEFV
B.c FSIDFRHPAVDKTGQELEVDFAATTSYVREIARARTFGFAHEAEMLRIGLARGGSMDNAIVLDEYRILNNDGLRYDDEFV
A.x FSIDFRHPAIDSTANFAEIDFATHSYVREIARARTFGFVNEVEALRSMGLARGGSMDNAIVMDEYRVLNSDGLRYDDEFV

239

265

E.c RHKMLDAIGDLFMC GHNIIGAFTAYKSGHALNNKLLQAVLAKQEAWYVTFQDDAE-LPLAFKAPSAVLA-
P.a KHKILDAIGDLYLLGNSLIGEFRGFKSGHALNNQLLRTLIADKDAWEVVTFFEDART-APISYMRPAAAV--
S.m RHKILDAIGDLYLAGGQVLGAYEGFKSGHALNNKLVRLMADATAWEWVSFDS PATPDPVEYATPAYA---
A.b RHKILDAVGDLYLLGHQIIAKFDGYKSGHALNNQLLRNVQSDPSNYEIVTFDDEKD-CPIPYVSVT-----
B.c KHKMLDAIGDLYVIGHPLLASYTAYKSGHGLNALLRELLAHEDAYEIVTFDDPQA-APKGFAFDAQTAF
A.x KHKILDAIGDLYLLGKPLVARYVACKSGHGLNQLARALLEQRDAWELITYESQAE-APQAFRQEWQLA--

Figure S2. Alignment of the deduced amino-acids sequence of the *lpxC* genes from *E. coli* (E.c), *P. aeruginosa* (P.a), *S. maltophilia* (S.m), *A. baumannii* (A.b), *B. cepacia* (B.c) and *A. xylosoxidans* (A.x) (accession no. BAB96664.1, NP253096.1, CRX68495.1, AJF 83452, AJP83452, KIS49143.1, ADP14145.1, respectively). The residues E78, K239 and H265 (*E. coli* numbering) coordinated with zinc atom are highlighted in grey.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, *et al.* Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* 2001;28(2):108-21.

Anderson MS, Bull HG, Galloway SM, Kelly TM, Mohan S, Radika K, *et al.* UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase of *Escherichia coli*. The first step of endotoxin biosynthesis is thermodynamically unfavorable. *J Biol Chem.* 1993;268(26):19858-65.

Andes D, Craig WA. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2002;19(4):261-8.

Anname D, Bellissant E, Cavallion J-M. Septic shock. *The Lancet.* 2005;365(9453):63-78.

Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock REW. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3743-51.

B

Bainbridge BW, Karimi-Naser L, Reife R, Blethen F, Ernst RK, Darveau RP. Acyl chain specificity of the acyltransferases LpxA and LpxD and substrate availability contribute to lipid A fatty acid heterogeneity in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2008;190(13):4549-58.

Barb AW, Jiang L, Raetz CRH, Zhou P. Structure of the deacetylase LpxC bound to the antibiotic CHIR-090: Time-dependent inhibition and specificity in ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(47):18433-8.

Barb AW, McClerren AL, Snehelatha K, Reynolds CM, Zhou P, Raetz CRH. Inhibition of lipid A biosynthesis as the primary mechanism of CHIR-090 antibiotic activity in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 2007;46(12):3793-802.

Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, *et al.* Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3370-9.

Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S2-6; discussion S6-7. Review.

Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, Trent MS, Miller SI, Raetz CR. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of Gram-negative bacteria. *The EMBO journal*. 2000;19(19):5071-80.

Brade H. Endotoxin in health and disease. Marcel Dekker; New York: 1999.

Brown MF, Reilly U, Abramite JA, Arcari JT, Oliver R, Barham RA, *et al*. Potent inhibitors of LpxC for the treatment of Gram-negative infections. *J Med Chem*. 2012;55(2):914-23.

Buetow L, Dawson A, Hunter WN. The nucleotide-binding site of *Aquifex aeolicus* LpxC. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*. 2006;62(11):1082-6.

Bush K. A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;46(5):483-93.

C

Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, *et al*. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(5):413-31.

Caughlan RE, Jones AK, DeLucia AM, Woods AL, Xie L, Ma B, *et al*. Mechanisms decreasing in vitro susceptibility to the Lpxc inhibitor CHIR-090 in the Gram-negative pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):17-27.

Centers for Disease Control and Prevention, Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 (<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>)

Clements JM, Coignard F, Johnson I, Chandler S, Palan S, Waller A, *et al*. Antibacterial activities and characterization of novel inhibitors of LpxC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1793-9.

Clementz T, Zhou Z, Raetz CRH. Function of the *Escherichia coli* msbB Gene, a Multicopy Suppressor of htrB knockouts, in the acylation of lipid A acylation by msbB follows laurate incorporation by HtrB. *J Biol Chem*. 1997;272(16):10353-60.

Coggins BE, Li X, McClerren AL, Hindsgaul O, Raetz CRH, Zhou P. Structure of the LpxC deacetylase with a bound substrate-analog inhibitor. *Nat Struct Mol Biol*. 2003;10(8):645-51.

Coggins BE, McClerren AL, Jiang L, Li X, Rudolph J, Hindsgaul O, *et al*. Refined Solution Structure of the LpxC-TU-514 Complex and pKa Analysis of an Active Site Histidine: Insights into the Mechanism and Inhibitor Design. *Biochemistry*. 2005;44(4):1114-26.

Cole KE, Gattis SG, Angell HD, Fierke CA, Christianson DW. Structure of the metal-dependent deacetylase LpxC from *Yersinia enterocolitica* complexed with the potent inhibitor CHIR-090. *Biochemistry*. 1 2011;50(2):258-65.

D

Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest*. 1991;99(1):169-75.

de Kraker MEA, Davey PG, Grundmann H. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. *PLoS Med* [Internet]. oct 2011 [cité 22 mars 2016];8(10). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3191157/>

Domagala JM, Hanna LD, Heifetz CL, Hutt MP, Mich TF, Sanchez JP, *et al.* New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J Med Chem*. 1986;29(3):394-404.

Dumas J-L, van Delden C, Perron K, Köhler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;254(2):217-25.

E

Eidt MV, Nunes FB, Pedrazza L, Caeran G, Pellegrin G, Melo DAS, *et al.* Biochemical and inflammatory aspects in patients with severe sepsis and septic shock: The predictive role of IL-18 in mortality. *Clinica Chimica Acta*. 2016;453:100-6.

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015.

F

Fabian E, Bordag N, Herold M, Kamp H, Krennrich G, Looser R, *et al.* Metabolite profiles of rats in repeated dose toxicological studies after oral and inhalative exposure. *Toxicology Letters*. 2016;255:11-23.

Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. 2010;10(1):43-50.

Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(7):1170-5.

Faruk Mansoor U, Vitharana D, Reddy PA, Daubaras DL, McNicholas P, Orth P, *et al.* Design and synthesis of potent Gram-negative specific LpxC inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011;21(4):1155-61.

Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock REW. Adaptive resistance to the «Last Hope» antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3372-82.

Führer F, Müller A, Baumann H, Langklotz S, Kutscher B, Narberhaus F. Sequence and length recognition of the C-terminal turnover element of LpxC, a soluble substrate of the membrane-bound FtsH protease. *Journal of Molecular Biology*. 2007;372(2):485-96.

G

Galimand M, Carniel E, Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(10):3233-6.

Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G, Rasoamanana B, Chanteau S, Carniel E, *et al.* Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *New England Journal of Medicine*. 1997;337(10):677-81.

García-Quintanilla M, Caro-Vega JM, Pulido MR, Moreno-Martínez P, Pachón J, McConnell MJ. Inhibition of LpxC increases antibiotic susceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;AAC.00407-16.

Gattis SG, Hernick M, Fierke CA. Active Site metal ion in UDP-3-O-((R)-3-Hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC) switches between Fe(II) and Zn(II) depending on Cellular Conditions. *J Biol Chem*. 2010;285(44):33788-96.

Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005;41(6):848-54.

Gennadios HA, Whittington DA, Li X, Fierke CA, Christianson DW. Mechanistic inferences from the binding of ligands to LpxC, a metal-dependent deacetylase, *Biochemistry*. 2006;45(26):7940-8.

Ghisalberti D, Masi M, Pagès J-M, Chevalier J. Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;328(4):1113-8.

Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J Bacteriol*. 1997;179(22):7040-5.

Gunn JS, Miller SI. PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. J Bacteriol. 12 janv 1996;178(23):6857-64.

Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, *et al.* Regulation of Lipid A Modifications by *Salmonella typhimurium* Virulence Genes phoP-phoQ. Science. 1997;276(5310):250-3.

H

Hamzehpour MM, Pechere JC, Plesiat P, Köhler T. OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(11):2392-6.

Hernick M, Fierke CA. Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2005;433(1):71-84.

Hernick M, Fierke CA. Molecular Recognition by *Escherichia coli* UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase is modulated by bound metal ions. Biochemistry. 2006;45(49):14573-81.

Hoang TT, Sullivan SA, Cusick JK, Schweizer HP. β -Ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. Microbiology. 2002;148(12):3849-56.

I

Institut de veille sanitaire. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements antiinfectieux en établissements de santé, mai-juin 2012. Résultats. (<http://www.invs.sante.fr>)

J

Jackman JE, Fierke CA, Tumey LN, Pirrung M, Uchiyama T, Tahir SH, *et al.* Antibacterial agents that target lipid A biosynthesis in Gram-negative bacteria inhibition of diverse UDP-3-O-(r-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylases by substrate analogs containing zinc binding motifs. J Biol Chem. 2000;275(15):11002-9.

Jackman JE, Raetz CRH, Fierke CA. UDP-3-O-(R-3-Hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. Biochemistry. 1999;38(6):1902-11.

Jackman JE, Raetz CRH, Fierke CA. Site-Directed Mutagenesis of the Bacterial Metalloamidase UDP-(3-O-acyl)-N-acetylglucosamine Deacetylase (LpxC). Identification of the Zinc Binding Site. Biochemistry. 2001;40(2):514-23.

K

Kadam RU, Chavan A, Roy N. Pharmacophoric features of *Pseudomonas aeruginosa* deacetylase LpxC inhibitors: An electronic and structural analysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007;17(4):861-8.

Karow M, Fayet O, Cegielska A, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C. Isolation and characterization of the *Escherichia coli* htrB gene, whose product is essential for bacterial viability above 33 degrees C in rich media. *J Bacteriol*. 1 janv 1991;173(2):741-50.

Kawano M, Manabe T, Kawasaki K. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages. *FEBS Letters*. 2010;584(1):207-12.

Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI. 3-O-Deacylation of Lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated Deacylase of *Salmonella typhimurium*, Modulates Signaling through Toll-like Receptor 4. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20044-8.

Kawasaki K, Teramoto M, Tatsui R, Amamoto S. Lipid A 3'-O-deacylation by *Salmonella* outer membrane enzyme LpxR modulates the ability of lipid A to stimulate Toll-like receptor 4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;428(3):343-7.

L

Langklotz S, Schäkermann M, Narberhaus F. Control of Lipopolysaccharide Biosynthesis by FtsH-Mediated Proteolysis of LpxC Is Conserved in Enterobacteria but Not in All Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol*. 2011;193(5):1090-7.

Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel J-P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*. 2005;8(1):60-6.

Lee C-J, Liang X, Chen X, Zeng D, Joo SH, Chung HS, et al. Species-specific and inhibitor-dependent conformations of LpxC: implications for antibiotic design. *Chemistry & Biology*. 2011;18(1):38-47.

Lee C-J, Liang X, Gopaldaswamy R, Najeeb J, Ark ED, Toone EJ, et al. Structural basis of the promiscuous inhibitor susceptibility of *Escherichia coli* LpxC. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2013 ; <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cb400067g>

Lee H, Hsu F-F, Turk J, Groisman EA. The PmrA-Regulated pmrC Gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*. 2004;186(13):4124-33.

Ley P van der, Steeghs L. Lessons from an LPS-deficient *Neisseria meningitidis* mutant. *Journal of Endotoxin Research*. 2003;9(2):124-8.

Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-Negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(2):337-418.

Liang X, Lee C-J, Chen X, Chung HS, Zeng D, Raetz CRH, *et al.* Syntheses, structures and antibiotic activities of LpxC inhibitors based on the diacetylene scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2011;19(2):852-60.

Liang X, Lee C-J, Zhao J, Toone EJ, Zhou P. Synthesis, structure and antibiotic activity of aryl-substituted LpxC inhibitors. *J Med Chem.* 2013;56(17):6954-66.

Llobet E, Martínez-Moliner V, Moranta D, Dahlström KM, Regueiro V, Tomás A, *et al.* Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *PNAS.* 2015;112(46):E6369-78.

Lüderitz O, Galanos C, Lehmann V, Nurminen M, Rietschel ET, Rosenfelder G, Simon M, Westphal O.

Lipid A: chemical structure and biological activity. *J Infect Dis.* 1973;128:Suppl:17-29.

M

Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, *et al.* Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *New England Journal of Medicine.* 2014;370(13):1198-208.

Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection.* 2012;18(3):268-81.

Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3298-304.

McClerren AL, Endsley S, Bowman JL, Andersen NH, Guan Z, Rudolph J, *et al.* A slow, tight-binding inhibitor of the zinc-dependent deacetylase LpxC of lipid A biosynthesis with antibiotic activity comparable to ciprofloxacin. *Biochemistry.* 2005;44(50):16574-83.

McClerren AL, Zhou P, Guan Z, Raetz CRH, Rudolph J. Kinetic Analysis of the Zinc-Dependent Deacetylase in the Lipid A Biosynthetic Pathway†. *Biochemistry.* 2005;44(4):1106-13.

McPhee JB, Lewenza S, Hancock REW. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology.* 2003;50(1):205-17.

Mdluli KE, Witte PR, Kline T, Barb AW, Erwin AL, Mansfield BE, *et al.* Molecular Validation of LpxC as an Antibacterial Drug Target in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(6):2178-84.

Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Micro.* 2005;3(1):36-46.

Mira J, Cariou A, Grall F, *et al.* Association of TNF2, a tnf- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: A multicenter study. *JAMA.* 1999;282(6):561-8.

Mochalkin I, Knafels JD, Lightle S. Crystal structure of LpxC from *Pseudomonas aeruginosa* complexed with the potent BB-78485 inhibitor. *Protein Sci.* 2008;17(3):450-7.

Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, *et al.* Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):4971-7.

Montminy SW, Khan N, McGrath S, Walkowicz MJ, Sharp F, Conlon JE, *et al.* Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat Immunol.* 2006;7(10):1066-73.

Moran AP, Zähringer U, Seydel U, Scholz D, Stütz P, Rietschel ET. Structural analysis of the lipid A component of *Campylobacter jejuni* CCUG 10936 (serotype O:2) lipopolysaccharide. *European Journal of Biochemistry.* 1991;198(2):459-69.

Morris TH. Antibiotic therapeutics in laboratory animals. *Lab Anim.* 1995;29(1):16-36.

N

Nation RL, Li J. Colistin in the 21st Century. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22(6):535-43.

Needham BD, Trent MS. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology.* 2013;11(7):467-81.

Nguyen BD, Cunningham D, Liang X, Chen X, Toone EJ, Raetz CRH, *et al.* Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(25):10284-9.

Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994;264(5157):382-8.

Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):593-656.

Normark S, Boman HG, Matsson E. Mutant of *Escherichia coli* with anomalous cell division and ability to decrease episomally and chromosomally mediated resistance to ampicillin and several other antibiotics. *J Bacteriol.* 1969;97(3):1334-42.

O

Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques. Rapport d'activité 2011-2012 (<http://www.onerba.org>)

Ogura T, Inoue K, Tatsuta T, Suzaki T, Karata K, Young K, et al. Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology.* 1999;31(3):833-44.

Onishi HR, Pelak BA, Gerckens LS, Silver LL, Kahan FM, Chen M-H, et al. Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science.* 1996;274(5289):980-2.

Opiyo SO, Pardy RL, Moriyama H, Moriyama EN. Evolution of the Kdo2-lipid A biosynthesis in bacteria. *BMC Evolutionary Biology.* 2010;10:362.

Oyston PCF, Dorrell N, Williams K, Li S-R, Green M, Titball RW, et al. The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 2000;68(6):3419-25.

P

Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009;458(7242):1191-5.

Pirrung MC, Tumey LN, Raetz CRH, Jackman JE, Snehalatha K, McClerren AL, et al. Inhibition of the Antibacterial Target UDP-(3-O-acyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC): isoxazoline zinc amidase inhibitors bearing diverse metal binding groups. *J Med Chem.* 2002;45(19):4359-70.

Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2015;72(3):557-81.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.

R

Raetz CRH, Guan Z, Ingram BO, Six DA, Song F, Wang X, *et al.* Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J Lipid Res.* 2009;50(Supplement):S103-8.

Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:295-329.

Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry.* 2002;71(1):635-700.

Rebeil R, Ernst RK, Gowen BB, Miller SI, Hinnebusch BJ. Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae. *Molecular Microbiology.* 2004;52(5):1363-73.

Ren Q, Sierro N, Witholt B, Kessler B. FabG, an NADPH-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length Poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2000;182(10):2978-81.

Reynolds CM, Ribeiro AA, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CRH, Trent MS. An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* lpxR that removes the 3-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J Biol Chem.* 2006;281(31):21974-87.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994;8(2):217-25.

Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):225-30.

Rubin EJ, Herrera CM, Crofts AA, Trent MS. PmrD Is Required for Modifications to *Escherichia coli* endotoxin that promote antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):2051-61.

S

Schäkermann M, Langklotz S, Narberhaus F. FtsH-Mediated coordination of lipopolysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* correlates with the growth rate and the alarmone (p)ppGpp. *J Bacteriol.* 2013;195(9):1912-9.

Shannon JG, Hasenkrug AM, Dorward DW, Nair V, Carmody AB, Hinnebusch BJ. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *mBio.* 2013;4(5):e00170-13.

Shin H, Gennadios HA, Whittington DA, Christianson DW. Amphipathic benzoic acid derivatives: synthesis and binding in the hydrophobic tunnel of the zinc deacetylase LpxC. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007;15(7):2617-23.

Smit J, Kamio Y, Nikaido H. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants. *J Bacteriol*. 1975;124(2):942-58.

Soncini FC, Groisman EA. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol*. 1996;178(23):6796-801.

Sorensen PG, Lutkenhaus J, Young K, Eveland SS, Anderson MS, Raetz CRH. Regulation of UDP-3-O-[R-3-hydroxymyristoyl]-N-acetylglucosamine Deacetylase in *Escherichia coli* the second enzymatic step of lipid A biosynthesis. *J Biol Chem*. 18 oct 1996;271(42):25898-905.

Soyza AD, Silipo A, Lanzetta R, Govan JR, Molinaro A. Review: Chemical and biological features of *Burkholderia cepacia* complex lipopolysaccharides. *Innate Immunity*. 2008;14(3):127-44.
108.

Sperandeo P, Dehò G, Polissi A. The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2009;1791(7):594-602.

Strain SM, Fesik SW, Armitage IM. Characterization of lipopolysaccharide from a heptoseless mutant of *Escherichia coli* by carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem*. 1983;258(5):2906-10.

Sweet CR, Preston A, Toland E, Ramirez SM, Cotter RJ, Maskell DJ, et al. Relaxed Acyl Chain Specificity of *Bordetella* UDP-N-acetylglucosamine Acyltransferases. *J Biol Chem*. 2002;277(21):18281-90.

T

Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2013;11(3):321-31.

Tomaras AP, McPherson CJ, Kuhn M, Carifa A, Mullins L, George D, et al. LpxC Inhibitors as New Antibacterial Agents and Tools for Studying Regulation of Lipid A Biosynthesis in Gram-Negative Pathogens. *mBio*. 2014;5(5):e01551-14.

Trent MS, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Raetz CRH. An Inner Membrane Enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-Amino-4-deoxy-l-arabinose to Lipid A induction in polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem*. 2001;276(46):43122-31.

Tzeng Y-L, Stephens DS. Antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2015;1848(11, Part B):3026-31.

V

Vincent J, Rello J, Marshall J, et al. INternational study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009;302(21):2323-9.

W

Walker SL, Redman JA, Elimelech M. Role of Cell Surface Lipopolysaccharides in *Escherichia coli* K12 Adhesion and Transport. *Langmuir*. 2004;20(18):7736-46.

Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*. 2010;49(2):97-107.

Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, Raetz CRH. Identification of Undecaprenyl Phosphate- β -d-Galactosamine in *Francisella novicida* and Its Function in Lipid A Modification. *Biochemistry*. 2009;48(6):1162-72.

Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M. In vitro activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(5):1047-51.

Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso M-L, Rasko DA, et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLOS ONE*. 2007;2(3):e309.

Whittington DA, Rusche KM, Shin H, Fierke CA, Christianson DW. Crystal structure of LpxC, a zinc-dependent deacetylase essential for endotoxin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8146-50.

World Health Organisation. Plague around the world, 2010–2015. *Wkly Epidemiol Rec*. 2016 Feb 26;91(8):89-93.

Y

Young K, Silver LL, Bramhill D, Cameron P, Eveland SS, Raetz CRH, et al. The envA permeability/cell division gene of *escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase. *J Biol Chem*. 1995;270(51):30384-91.

Yu B, Wright SD. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem.* 1996;271(8):4100-5.

Z

Zähringer U, Knirel YA, Lindner B, Helbig JH, Sonesson A, Marre R, *et al.* The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog Clin Biol Res.* 1995;392:113-39.

Zeng D, Zhao J, Chung HS, Guan Z, Raetz CRH, Zhou P. Mutants Resistant to LpxC inhibitors by rebalancing cellular homeostasis. *J Biol Chem.* 2013;288(8):5475-86.

Zhou Z, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Miller SI, Raetz CRH. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium* pmrA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem.* 2001;276(46):43111-21.