

UNIVERSITE DE LILLE I

**Ecole Doctorale Sciences de la matière, du rayonnement et de
l'environnement**

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

en Chimie Organique et Macromoléculaire

présentée et soutenue publiquement par

Bertrand DIRIÉ

le 29 novembre 2007

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE LIGANDS DE LA PROTEINE ETHR
DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* : VALIDATION D'UNE
NOUVELLE STRATEGIE DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE**

JURY

Pr. Line Bonnet-Bourel	Université Louis Pasteur de Strasbourg	Rapporteur
Dr. Gilles Subra	Université de Montpellier I	Rapporteur
Dr. Jurgen Joossens	Université d'Anvers	Examineur
Dr. Christophe Biot	Université de Lille I	Examineur
Dr. Nicolas Willand	Université de Lille II	Examineur
Pr. Jean Claude Gesquière	Université de Lille II	Directeur de thèse

Laboratoire Biostructure et Découverte de Médicament - INSERM U761
Faculté de Pharmacie de Lille. 3, rue du Professeur Laguesse B.P. 83 59006 LILLE cedex



*Je dédie cette thèse
à mes Parents,*

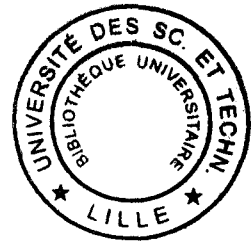
Remerciements

Madame Line Bonnet Bourel et Monsieur Gilles Subra

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

Messieurs Christophe Biot et Jurgen Joossens

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger cette thèse. Je vous en remercie vivement.



Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire « Biostructures et Découverte de Médicament », unité mixte INSERM U761, Université de Lille 2, Institut Pasteur de Lille, dirigé par le Professeur Benoît Déprez.

Je tiens, tout d'abord, à remercier Messieurs les Professeurs Jean-Claude Gesquière et Benoît Déprez pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire il y a cinq ans et pour m'avoir donné l'opportunité d'y réaliser ce travail.

Je remercie vivement Nicolas Willand pour son encadrement et ses conseils tout au long de ces années.

Je remercie également Patrick Toto, Candide Hounsou et Matthieu Desroses pour m'avoir fait partager leurs expériences de post-doctorant dans le cadre de ce projet. Merci pour toutes nos enrichissantes discussions.

Je tiens aussi à remercier Virginie Leroux, Valérie Landry, Sylvain Delaroche et Florence Leroux pour leur aide à l'établissement des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques, mais surtout pour leur gentillesse.

J'associe également à mes remerciements l'ensemble des stagiaires ayant travaillé à mes côtés, Caroline Hego, Julien Rocca, Caroline Cuypers, Liesbeth Verbraeken, Vincent Van Geem, Sarah Dubar, Soizic Besret, Hélène Soots, Alice Huet, Kevin Pouchain, Bouchra Hajjaj et Fatma Demirkaya, pour leur aide et leur motivation.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'unité U761 :

Sandra Raux pour m'avoir supporté depuis cinq ans

Tatiana Vandeputte et Carole Desruelle pour leurs précieux conseils

Nicolas Cousaert pour son enthousiasme et sa bonne humeur

Emilie Blanche, Olivier Busnel et Frédéric Labeguere pour leur gentillesse, leur patience et leur soutien

Marion Flipo, Guillaume Laconde et Hélène Host pour leur bonne humeur

Julie Charton et TERENCE Béghyn pour leur sympathie

Rébecca Déprez-Poulain pour sa spontanéité

Annie Marcincal pour son humour et son franc parler

Hélène Gras, Christophe Boutillon et André Tartar pour leurs conseils

Enfin, je remercie l'ensemble des membres du laboratoire de biophysique de la Faculté de Pharmacie de Lille pour leurs conseils et leur disponibilité.

Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec l'unité INSERM U629 dirigée par Camille Locht.

Je tiens à remercier Camille Locht pour m'avoir donné l'opportunité de venir travailler au sein de son unité.

Je tiens également à remercier Alain Baulard pour sa disponibilité, ses conseils et sa gentillesse. Merci d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir soutenu tout au long du déroulement de ce projet.

Je remercie tout particulièrement Xavier Carette pour avoir travaillé à mes côtés sur ce projet. En toutes circonstances, ce fut un immense plaisir de travailler avec toi. Encore merci pour tous ces bons moments.

J'associe également à mes remerciements Guy Delcroix et Gilles Mahieu pour leur disponibilité, leurs conseils et leur bonne humeur.

Enfin, je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'unité U629 pour leur accueil et leur joie de vivre. Parmi vous, j'ai eu l'impression d'être au sein d'une famille, encore merci.

Ce travail a également fait l'objet d'une collaboration avec l'unité CNRS 8161.

Je tiens à remercier Vincent Villeret pour m'avoir permis de m'initier à la cristallographie au sein de son équipe.

Je tiens également à remercier Marc Aumercier pour m'avoir formé à l'utilisation de la résonance plasmonique de surface. Encore merci pour votre spontanéité, votre disponibilité et votre humour.

Je remercie tout particulièrement Frédéric Frénois, Prakash Rucktooa et Zoé Lens pour avoir travaillé à mes côtés sur les études radiocristallographiques. Encore merci pour votre accueil chaleureux au sein du laboratoire, ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'unité CNRS8161 pour leur gentillesse et leur soutien.

Pour finir, je tiens à saluer l'ensemble des personnes que j'ai croisées tout au long de ces années et qui m'ont fait partager leurs expériences, leurs points de vue et leurs connaissances : Pascal Cellier, Lise Charruault, Gilles Curré, Marc David, Antoine Richard, Cyrille Brantis, Julien Parcq, Mikaël Cauche, Sandra Guitard, Albane Decarssin, Noémie Deguine, Aurore Muller, Magali Sénéchal, Alexandre Wohlkonich, Isabelle Huvent et Magali Vivier. Vous m'avez tous beaucoup apporté durant ce long parcours, tant au niveau professionnel que personnel. Encore merci à vous.

Résumé

Conception et synthèse de ligands de la protéine EthR de *Mycobacterium tuberculosis* : validation d'une nouvelle stratégie de lutte contre la tuberculose.

En raison de l'épidémie de VIH et de l'apparition de phénomènes de résistances aux traitements, la tuberculose reste aujourd'hui la seconde cause de mortalité au monde liée à un agent infectieux. Récemment, le répresseur transcriptionnel EthR a été identifié comme régulateur de l'activation de l'éthionamide (ETH), un anti-tuberculeux de seconde intention. Ce travail repose sur la découverte et l'optimisation de ligands d'EthR pour permettre une réduction des doses d'ETH utilisées en thérapeutique, ainsi qu'une diminution de la toxicité liée au traitement.

Par une approche intégrant un criblage par résonance plasmonique de surface, l'étude cristallographique des complexes ligands/protéine et un design rationnel, des ligands de ce répresseur ont été identifiés. Ils ont permis de potentialiser l'action de l'ETH d'un facteur vingt *in vitro* et d'un facteur quatre *in vivo* sur un modèle murin. Le choix d'engager de tels composés dans des expériences chez l'animal s'est appuyé à la fois sur leurs caractéristiques physico-chimiques, mais également sur leurs propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques.

Ces résultats valident la stratégie mise en œuvre et ouvrent des perspectives dans la mise au point d'une nouvelle voie dans la lutte contre la tuberculose.

MOTS CLÉS : tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, EthR, éthionamide, potentialisation, répresseur transcriptionnel, résonance plasmonique de surface, 1,2,4-oxadiazole, click-chemistry *in situ*

Abstract

Conception and synthesis of ligands for *Mycobacterium tuberculosis* EthR protein: validation of a new way to fight tuberculosis.

Because of HIV epidemic and the appearance of resistance strains, tuberculosis remains the second cause of mortality in the world associated to a contagious agent. Recently, EthR, a transcriptional repressor, was identified as key regulator of the activation of ethionamide, a second line anti-tuberculosis. Herein, we describe the discovery and optimization of EthR ligands in order to allow a reduction of ETH therapeutic doses and a reduction of the toxicity linked to treatment.

By the meaning of a surface plasmon resonance screening, cristallographic studies of ligands / protein complexes and rational design, ligands of this repressor were discovered. They were able to boost ETH activity by a factor twenty *in vitro* and a factor four *in vivo* on a murin model. The choice of compounds to perform *in vivo* studies was made on physico-chemical characteristics, but also on pharmacodynamics and pharmacokinetics properties.

These results validate our strategy and open perspectives for a new way to fight tuberculosis.

KEY WORDS: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, EthR, ethionamide, potentialisation, transcriptionnal repressor, surface plasmon resonance, 1,2,4-oxadiazole, *in situ* click-chemistry

Sommaire

GLOSSAIRE	12
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1 : TUBERCULOSE ET RESISTANCE A L'ETHIONAMIDE	17
1 LA PATHOLOGIE	17
1.1 Description	17
1.1.1 Primo-infection tuberculeuse ou tuberculose infection	17
1.1.2 La maladie tuberculeuse au sein de l'organisme	17
1.1.3 Signes et symptômes	19
1.1.4 Diagnostic	19
1.1.4.1 Radiographie, examen direct et culture du bacille	19
1.1.4.2 L'intra dermo réaction à la tuberculine (IDR)	21
2 HISTORIQUE ET DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	21
3 CARACTERISTIQUES DES MYCOBACTERIES	24
3.1 Généralités	24
3.2 Enveloppe cellulaire des mycobactéries	25
3.2.1 Description	25
3.2.1.1 La membrane plasmique	26
3.2.1.2 La paroi cellulaire	26
3.2.1.3 La capsule	28
3.2.2 Biosynthèse des acides mycoliques de la paroi cellulaire	28
3.2.2.1 Structures des acides mycoliques	28
3.2.2.2 Systèmes enzymatiques mis en cause dans la biosynthèse des acides mycoliques	29
3.2.2.2.1 Le module FAS-I	30
3.2.2.2.2 Le module FAS-II	31
3.2.2.2.3 Fonctionnalisation des insaturations des méroacides	34
3.2.2.2.4 Condensation des méroacides et de la chaîne α	34
3.2.2.2.5 Transfert des acides mycoliques dans la paroi bactérienne	34
4 PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE	35
4.1 Déclaration et mesures d'investigations	35
4.2 La vaccination par le bacille Calmette Guérin	35
4.3 Traitements de la tuberculose	36
4.3.1 Médicaments utilisés dans le traitement de la tuberculose en première intention	37
4.3.1.1 L'isoniazide	37
4.3.1.2 La rifampicine	41
4.3.1.3 Le pyrazinamide	42
4.3.1.4 L'éthambutol	44
4.3.2 Traitement de la tuberculose : la stratégie DOTS	45
4.3.3 Les antituberculeux de seconde intention	47
4.3.3.1 Les fluoroquinolones	47
4.3.3.2 La streptomycine	49
4.3.3.3 La rifapentine et la rifabutine	51
4.3.3.4 La D-cyclosérine	51
4.3.3.5 L'acide <i>para</i> -aminosalicylique	52
4.3.3.6 L'éthionamide et le prothionamide	53
4.3.3.7 Le thiacétazone	54
4.3.3.8 L'isoxyl / thiocarlide	55
4.3.4 Conclusion sur l'arsenal thérapeutique existant	55
4.3.5 Les antituberculeux en cours de développement	57
4.3.5.1 Le composé R207910 / TMC207	57
4.3.5.2 Les composés PA-824 et OPC-67683	57
4.3.5.3 Le rifamétane	58
4.3.5.4 Le composé SQ109	59
4.3.5.5 Le <i>n</i> -octanesulphonylacétamide	59
4.3.5.6 Les oxazolidinones	60
4.4 Stratégie envisagée dans la découverte d'un nouvel antituberculeux	61
4.4.1 Opportunité stratégique : amélioration de traitements déjà existants	61
4.4.2 Pré-requis pour le succès d'un nouvel antituberculeux	61
4.4.3 Opportunité dans la mise en oeuvre : découverte des mécanismes d'activation et de résistance de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> à l'éthionamide	62
5 ACTIVATION DE L'ETHIONAMIDE CHEZ <i>M. TUBERCULOSIS</i> ET MECANISMES DE REGULATION	62
5.1 Mécanismes d'activation de l'éthionamide	62

5.1.1	Découverte du gène <i>Rv3854c</i> et de la protéine EthA	63
5.1.2	Substrats et rôle physiologique de EthA	63
5.1.3	Caractérisation des formes actives de l'éthionamide.....	64
5.2	Régulation de l'activation de l'éthionamide	67
5.2.1	Implication du gène <i>ethR</i>	67
5.2.2	Les répresseurs transcriptionnels de la famille TetR/CamR.....	68
5.2.2.1	TetR.....	69
5.2.2.2	QacR.....	71
5.2.3	La protéine EthR de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	73
5.2.3.1	Etude des structures radiocristallographiques de la protéine	73
5.2.3.1.1	Etude du domaine de régulation.....	74
5.2.3.1.2	Etude des interactions ligands fortuits/protéine.....	75
5.2.3.1.2.1	Interactions entre EthR et l'octanoate d'héxadécyle (structure 1U9N).....	75
5.2.3.1.2.2	Interactions entre EthR et le présumé 1,4-dioxane (structure 1T56).....	79
5.2.3.2	Etude de l'interaction EthR/promoteur <i>ethA</i> : étude de la zone intergénique <i>ethA-R</i>	81
6	VALIDATION DE ETHR COMME CIBLE THERAPEUTIQUE POTENTIELLE PAR ANALYSE SWOT	82

CHAPITRE 2 : DECOUVERTE DE LIGANDS DE LA PROTEINE ETHR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

1	SPECIFICATIONS POUR LE CRIBLAGE DE COMPOSES SYNTHETIQUES	86
2	MISE AU POINT D'UNE METHODE DE CRIBLAGE DE COMPOSES SYNTHETIQUES : TEST UTILISANT LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (BIACORE®).....	87
2.1	Principe du phénomène de résonance plasmonique de surface	87
2.2	Principe du test envisagé utilisant la résonance plasmonique de surface.....	90
2.3	Mise au point du test utilisant la résonance plasmonique de surface.....	91
2.3.1	Fonctionnalisation de la puce CM5 par de l'ADN biotinylié.....	91
2.3.2	Détermination de la sensibilité du test utilisant la résonance plasmonique de surface.....	92
3	SELECTION ET CRIBLAGE DE COMPOSES: DECOUVERTE DU COMPOSE BDM_14500	94
3.1	Détermination du pharmacophore et sélection des composés testés.....	94
3.2	Résultats et discussion	96
3.3	Resynthèse du composé BDM_14500	97
3.4	Comparaison de l'activité des composés sélectionnés par RPS.....	98
3.4.1	Adaptation des conditions utilisées pour la détermination de courbes doses-réponses	98
3.4.2	Courbe dose-réponse du composé BDM_14500 établie par RPS.....	98
4	CARACTERISATION DE L'INTERACTION ETHR/COMPOSES PAR CO-CRISTALLISATION	99
4.1	Protocole de co-cristallisation utilisé.....	99
4.2	Co-cristallisation du composé BDM_14500 au sein du domaine de régulation de EthR.....	101
5	ETUDES DE RELATION-STRUCTURE-ACTIVITE A PARTIR DES COMPOSES TESTES ET DES DONNEES RADIOCRISTALLOGRAPHIQUES.....	105
6	BILAN SUR LES ETUDES RPS ET RADIOCRISTALLOGRAPHIQUE DES INTERACTIONS LIGANDS/ETHR	108
7	ETUDE DE POTENTIALISATION DE L'ETHIONAMIDE SUR <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> H37RV	109
8	BILAN SUR LA DECOUVERTE DU HIT BDM_14500 : VALIDATION DE LA CIBLE.....	111

CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DU COMPOSE BDM_14500 : VERS LA DECOUVERTE D'UN LEAD

1	CONTRAINTES POUR L'OBTENTION D'UN LEAD.....	113
2	SYNTHESE IN SITU DE LIGAND D'ETHR PAR CYCLOADDITION DE HUISGEN : « CLICK CHEMISTRY »	114
2.1	Principe.....	114
2.2	Mise en œuvre et déroulement des expériences de click chemistry <i>in situ</i> au sein de la protéine EthR	119
2.2.1	Synthèse et évaluation d'un analogue azoture du composé BDM_14500.....	120
2.2.1.1	Synthèse du composé BDM_14801.....	120
2.2.1.2	Evaluation de la capacité inhibitrice du composé azoture BDM_14801 par RPS.....	121
2.2.1.3	Etablissement de la structure radiocristallographique du composé BDM_14801 au sein de la protéine EthR.....	122
2.2.1.4	Bilan sur la synthèse du composé BDM_14801	126
2.2.2	Description et synthèse des alcynes mis en jeu lors du couplage de click chemistry <i>in situ</i>	126
2.2.3	Cycloadditions de Huisgen <i>in situ</i> BDM_14801 / alcynes.....	130
2.2.3.1	Formation des clusters d'alcynes servant aux expériences de click chemistry <i>in situ</i>	130
2.2.3.2	Réalisation des expériences de click-chemistry <i>in situ</i>	131
2.2.3.3	Résultats des expériences de click-chemistry <i>in situ</i>	132
2.2.3.4	Confirmation de l'importance du groupement arylsulfonamide dans les expériences de click-chemistry <i>in situ</i>	133

2.2.4	Synthèse des composés 1,2,3-triazoles déterminés	137
2.2.5	Etudes des interactions entre EthR et les composés identifiés par click chemistry <i>in situ</i>	138
2.2.5.1	Optimisation des conditions utilisées pour la détermination par RPS des CI ₅₀	138
2.2.5.2	Evaluation de la capacité inhibitrice des composés déterminés par RPS.....	138
2.3	Etude radiocristallographique du composé 1,2,3-triazole BDM_14950 déterminé lors des expériences de click chemistry <i>in situ</i>	140
2.4	Evaluation de la solubilité et de la potentialisation de l'éthionamide par les composés BDM_14801, BDM_14949 et BDM_14950.....	146
2.4.1	Evaluation de la solubilité des composés	146
2.4.2	Etudes de potentialisation de l'éthionamide par les composés BDM_14801, BDM_14949 et BDM_14950	147
2.4.2.1	Activité des composés BDM_14801, BDM_14949 et BDM_14950 sur <i>M. bovis</i>	147
2.4.2.2	Activité du composé BDM_14801 sur <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	149
2.4.2.2.1	Détermination de la potentialisation de l'éthionamide par utilisation d'un appareillage Bactec 460	149
2.4.2.2.2	Détermination de la potentialisation de l'éthionamide par culture en milieu solide.....	151
2.5	Etude de l'importance de l'hétérocycle 1,2,3-triazole sur l'affinité des ligands d'EthR.....	151
2.5.1	Substitution de la fonction azoture du composé BDM_14801 par un 1,2,3-triazole	151
2.5.2	Evaluation par RPS de la capacité inhibitrice du composé BDM_14805.....	152
2.5.3	Evaluation de la potentialisation de l'éthionamide chez <i>M. bovis</i> par le composé BDM_14805	153
2.6	Bilan de l'utilisation de la click chemistry <i>in situ</i>	154
3	SYNTHESE D'ANALOGUES DU COMPOSE BDM_14801 : VERS UN CANDIDAT MEDICAMENT	155
3.1	Synthèses et évaluation des analogues du composé BDM_14801 après remplacement du cycle thiophène	158
3.1.1	Synthèses réalisées.....	158
3.1.1.1	Synthèse d'amidoximes à partir de nitrile.....	159
3.1.1.2	Synthèse des dérivés 1,2,4-oxadiazoles par couplage et condensation successifs	160
3.1.1.3	Obtention des dérivés azotures désirés. Introduction du groupement acétyl-azoture.....	161
3.1.2	Evaluation sur <i>M. bovis</i> et par RPS de l'activité des analogues synthétisés.....	161
3.2	Synthèses et évaluation des analogues du composé BDM_14801 après remplacement du groupement azoture	164
3.2.1	Synthèses réalisées.....	164
3.2.2	Evaluation <i>in bacterio</i> et par RPS de l'activité des analogues synthétisés	166
3.2.2.1	Importance du groupement azoture dans l'interaction.....	166
3.2.2.2	Implication de la chaîne latérale hydrophobe sur l'activité	167
3.2.2.2.1	Comparatif des analogues portant des chaînes saturées et insaturées	167
3.2.2.2.2	Etude radiocristallographique de la structure d'EthR en présence du composé 22.....	169
3.2.2.3	Conséquences d'une fonction carboxylique sur l'activité.....	170
3.2.2.4	Importance des groupements cycliques aromatiques ou non au sein de la chaîne latérale.....	172
3.2.2.4.1	Importance de l'encombrement stérique sur l'affinité.....	172
3.2.2.4.2	Etude radiocristallographique de la structure d'EthR en présence des composés 38, 40 et 41..	175
3.3	Synthèses et évaluation des analogues du composé BDM_14801 après remplacement de l'1,2,4-oxadiazole.....	179
3.3.1	Synthèses et évaluation de l'analogue 1,2,4-triazole du composé 40	180
3.3.1.1	Synthèse de l'analogue 1,2,4-triazole du composé 40	180
3.3.1.2	Evaluation par RPS de la capacité inhibitrice du composé BDM_33069	180
3.3.2	Synthèse et évaluation de l'analogue 1,2,4-thiadiazole du composé BDM_14801	181
3.3.2.1	Synthèse de l'analogue 1,2,4-thiadiazole du composé BDM_14801.....	181
3.3.2.2	Evaluation par RPS de la capacité inhibitrice du composé BDM_15046	182
3.4	Comparaison de l'activité des analogues synthétisés sur mycobactéries	183
3.4.1	Détermination des concentrations minimales effectrices des composés les plus intéressants sur <i>Mycobacterium bovis</i>	183
3.4.2	Confirmation de la potentialisation de l'éthionamide sur <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	186
3.5	Caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés d'intérêt	187
3.5.1	Détermination de la solubilité et du log D.....	187
3.5.2	Détermination des stabilités plasmatique et gastrique.....	188
3.5.3	Détermination de la stabilité microsomale	189
	CONCLUSION	191
	PARTIE EXPERIMENTALE	198
I	EXPERIENCES DE RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE.....	198
1.1	Protocole général de fonctionnalisation d'une puce CM5 pour les expériences de résonance plasmonique de surface.....	198

1.2	Protocole de criblage de composés sur une puce CM5 fonctionnalisée avec 200 RU d'ADN.	198
1.3	Protocole de criblage de composés sur une puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU d'ADN	199
2	DETERMINATION STRUCTURALE DES COMPLEXES ETHR/COMPOSES	199
2.1	Production et purification de la protéine His₆-EthR	199
2.2	Protocole pour la détermination structurale du complexe EthR/BDM_14500	200
2.3	Protocole général pour la détermination structurale des autres complexes EthR/ligand	200
3	EXPERIENCES DE POTENTIALISATION DE L'ETHIONAMIDE IN BACTERIO	201
3.1	Protocole de détermination de la CMI de l'éthionamide seul et en présence de ligand chez <i>M. bovis</i>	201
3.1.1	Test de synergie	201
3.1.2	Test de stérilité	201
3.1.3	Détermination de la CMI en ETH	201
3.1.4	Détermination de l'effet solvant	201
3.2	Protocole de détermination de la CME de l'éthionamide en présence de ligand chez <i>M. bovis</i>	202
3.2.1	Test de stérilité	202
3.2.2	Test d'activité de l'ETH à 0.04 µg/mL	202
3.2.3	Détermination de l'effet solvant	202
3.3	Protocoles de détermination de la CMI de l'éthionamide seul et en présence de ligand BDM_14500 chez <i>M. tuberculosis</i> par méthode Bactec MGIT 960	202
3.4	Protocoles de détermination de la CMI de l'éthionamide seul et en présence d'analogues du composé BDM_14801 chez <i>M. tuberculosis</i> par méthode Bactec MGIT 960	205
3.5	Protocoles de détermination de la CMI de l'éthionamide seul et en présence de ligand BDM_14801 chez <i>M. tuberculosis</i> par méthode Bactec 460	205
4	SYNTHESES REALISEES	207
4.1	Synthèse des alcynes servant à la click chemistry <i>in situ</i>	208
4.1.1	Procédure générale pour la synthèse des composés propargyl-sulfonamide	208
4.1.2	Procédure générale pour la synthèse des composés propargylamides	210
4.1.3	Procédure générale pour la synthèse des composés propargylamines	219
4.2	Synthèse des composés BDM_14500 et BDM_14801	233
4.3	Synthèse des analogues du composé BDM_14801	238
4.3.1	Procédure générale pour la synthèse des composés <i>N</i> -Hydroxy-benzamidine	238
4.3.2	Procédure générale pour la synthèse des composés 4-([1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridine-1-carboxylate de <i>t</i> -butyle	244
4.3.3	Procédure générale pour la synthèse des dérivés acétyle-azoture (19-32)	253
4.3.4	Procédure générale pour la synthèse des analogues de BDM_14801 par couplage avec des chlorures d'acide	262
4.3.5	Procédure générale pour la synthèse des analogues de BDM_14801 par couplage avec des acides carboxyliques	267
4.3.6	Procédure générale pour la synthèse des analogues de BDM_14801 par couplage avec des anhydrides d'acide	278
4.4	Synthèse des composés 1,2,3-triazoles	280
4.5	Synthèse des composés 1,2,4-triazoles	283
4.6	Synthèse des composés 1,2,4-thiadiazoles	286
5	ETUDES DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES	288
5.1	Détermination de la solubilité des composés	288
5.2	Détermination du log D	288
5.3	Etudes des propriétés pharmacocinétiques des composés	288
5.3.1	Etudes de stabilité dans les fluides digestifs	288
5.3.2	Etudes de stabilité plasmatique	289
5.3.3	Etudes de stabilité microsomale	289

BIBLIOGRAPHIE	291
----------------------	------------

Glossaire

Aide à l'interprétation des structures radiocristallographiques.

La représentation des structures radiocristallographiques présentes dans ce mémoire a été réalisée grâce au logiciel PyMol (DeLano Scientific LLC). Les liaisons hydrogènes décrites sont caractérisées par la distance observée entre les hétéroatomes. L'angle de liaison et la distance hydrogène-hétéroatome ne pouvant être que calculés *in silico*, ces caractéristiques n'ont pas été indiquées.

Les courbes doses réponses présentes dans ce mémoire ont été retravaillées grâce au logiciel XL fit (IDBS).

Ala	alanine	Leu	leucine
Arg	arginine	Lys	lysine
Asn	asparagine	Met	méthionine
Asp	acide aspartique	Phe	phénylalanine
Cys	cystéine	Pro	proline
Gln	glutamine	Ser	sérine
Glu	acide glutamique	Thr	thréonine
Gly	glycine	Trp	tryptophane
His	histidine	Tyr	tyrosine
Ile	isoleucine	Val	valine

Å	angström
AChE	acétylcholinestérase
ACP	acyl carrier protein
ADN	acide désoxyribonucléique
AG	arabinogalactane
Ag	antigène
AM	arabinomannane
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
AUC	aire sous la courbe
AZT	3'-azidothymidine
BCG	bacille Calmette Guérin
BSA	sérum albumine bovine
CFU	colonies formant unité
CI ₅₀	concentration inhibitrice 50
Cl	clairance
CME	concentration minimale effectrice
CMI	concentration minimale inhibitrice
DCM	dichlorométhane
DDASS	direction départementale des autorités sanitaires et sociales
DHFR	dihydrofolate réductase
DIPEA	diisopropyléthylamine

DMF	<i>N,N'</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
DOTS	Directly Observed Therapy Short course traitement de courte durée sous observance directe
DTT	dithiothréitol
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
EDCI	chlorhydrate de 1-[3-(diméthyl-amino)propyl]-3-éthylcarbodiimide
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EMB	éthambutol
ETH	éthionamide
Et ₃ N	triéthylamine
EtOH	éthanol
eV	électron volt
F	point de fusion
FAD	flavine adénine dinucléotide
FAS	fatty acid synthase
Fbp	domaine de liaison à la fibronectine
FaSSIF	fasted state simulated intestinal fluid
FeSSIF	fed state simulated intestinal fluid
G6P	glucose-6-phosphate
G6PD	glucose-6-phosphate déshydrogénase
g/mol	gramme par mole
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-uronium-hexafluoro-phosphate
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPOA	acide pyrazinoïque
HTH	hélice-tour-hélice
IDR	intra dermo réaction
INH	isoniazide
INVS	institut national de veille sanitaire
IPTG	isopropylthiogalactoside
kcal/mol	kilocalorie par mole
kDa	kilodalton
L	litre
LAM	lipoarabinomannane
LAT	lutte antituberculeuse
LCMS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LM	lipomannane
mAGP	mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane
MeOH	méthanol
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
mL	millilitre
mpk	milligramme par kilo mg/kg
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MW	poids moléculaire
N	normale
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ND	non déterminé
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide

nM	nanomolaire
NTA	acide nitrilotriacétique
OADC	acide oléique-albumine-dextrose-catalase
OMS	organisation mondiale de la santé
PBS	phosphate buffer saline
PG	peptidoglycane
POA ⁻	pyrazinoate
ppi	pour préparation injectable
PZA	pyrazinamide
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPS	résonance plasmonique de surface
RSA	Relation Structure Activité
RU	unité de réponse
SGF	simulated gastric fluid
SWOT	Strenght Weakness Opportunities Threat Forces Faiblesses Opportunités Menaces
T ₀	temps initial
T _{1/2}	temps de demi-vie
ta	température ambiante
TBAF	<i>tertio</i> -butylammoniumfluoride
<i>t</i> Boc	<i>tertio</i> -butyloxycarbonyle
TDM	tréhalose dimycolate
THF	tétrahydrofurane
TFAA	anhydride de l'acide trifluoroacétique
TMM	tréhalose monomycolate
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
SIM	selected ion mode monitoring
V	volt
VIH	virus d'immunodéficience humaine
µg/mL	microgramme par millilitre
µL	microlitre
µL/min	microlitre par minute
µm	micromètre
µM	micromolaire

Introduction

Avec 1.6 millions de morts et 8.8 millions de nouveaux cas chaque année, la tuberculose est la deuxième maladie infectieuse au monde après le SIDA. Le germe responsable de cette pathologie est *Mycobacterium tuberculosis* qui appartient au genre des mycobactéries et se transmet de façon aérienne. En raison de l'absence de traitement, de nombreux cas furent à déplorer jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle. Avec l'essor de la médecine, et notamment la découverte des anti-tuberculeux et du BCG, la propagation de l'épidémie semblait être sous contrôle. Malheureusement, la pandémie de SIDA, ainsi que l'apparition de phénomènes de résistances aux anti-tuberculeux, ont provoqué lors de ces dernières années une recrudescence de cette pathologie. La lutte contre la tuberculose demeure donc toujours une priorité au niveau mondial. C'est dans ce cadre, que le programme DOTS (Directly Observed Therapy Short Course) a été mis en place dans 155 pays. Cette stratégie consiste à traiter les patients par une polychimiothérapie de plusieurs mois, afin de limiter les risques de récurrences et l'apparition de résistance. Cela passe par un engagement des pouvoirs publics, aussi bien dans la prise en charge des patients, que dans l'accès aux traitements.

Parallèlement, de nouveaux moyens de lutte contre la pathologie sont actuellement en cours d'évaluation. Les grands axes de recherche consistent en la découverte de nouveaux composés possédant une activité anti-tuberculeuse, mais aussi en la compréhension des mécanismes de résistance développés par *Mycobacterium tuberculosis*. Une troisième approche, basée sur l'amélioration de l'efficacité de traitements déjà existants, pourrait également être envisageable. C'est dans ce cadre, que la protéine EthR de *Mycobacterium tuberculosis* s'est révélée être une cible thérapeutique d'intérêt dans la potentialisation de l'éthionamide, un anti-tuberculeux de seconde intention.

Afin de jouer son rôle, l'éthionamide a besoin d'être activé au sein de la mycobactérie par la flavoprotéine monooxygénase EthA. L'espèce active ainsi formée va interagir dans la synthèse des acides mycoliques et provoquer la mort de la mycobactérie. EthR est un répresseur transcriptionnel de la famille TetR/CamR. Il intervient dans l'inhibition de la production de EthA au sein de la mycobactérie. Cela engendre une diminution de l'activation de l'éthionamide et par conséquent un effet anti-tuberculeux moindre. La perspective de cibler EthR par des molécules chimiques afin de l'empêcher de jouer son rôle de répresseur devrait

donc provoquer une augmentation de la production de EthA au sein de la mycobactérie et par conséquent une surproduction de la forme activée de l'éthionamide.

L'objectif de ce travail a été de concevoir des ligands de la protéine EthR, dans le but d'augmenter la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* à l'éthionamide. Cela devrait se traduire à terme par une diminution des doses utilisées en thérapeutique, ainsi que par une diminution des effets secondaires liés au traitement.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec les équipes INSERM-U629 et CNRS-UMR8161 de l'Institut de Biologie de Lille, et a été financé par CPER FEDER et l'ANR.

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

Les déterminations de CMI et de CME sur *M. bovis* ont été réalisées par Xavier Carette et les CMI sur *M. tuberculosis* H37Rv ont été réalisées par Guy Delcroix et Gilles Mahieu.

La production de la protéine His₆-EthR a été réalisée par Frédéric Frénois et Xavier Carette.

La cristallogenèse du composé BDM_14500 en présence de His₆-EthR a été réalisée par Frédéric Frénois. Celles des composés **22**, **38**, **40** et **41** ont été réalisées par Matthieu Desroses et Zoé Lens.

Le retraitement des données radiocristallographiques a été réalisé par Vincent Villeret, Prakash Rucktooa et Zoé Lens.

L'appareil BIAcore[®] 2000 a été mis à notre disposition par Marc Aumercier.

L'évaluation des composés sur la souris a été réalisée par Pablo Biffani de l'Institut Pasteur de Bruxelles.

Chapitre 1 : Tuberculose et résistance à l'éthionamide

1 La pathologie

1.1 Description

1.1.1 Primo-infection tuberculeuse ou tuberculose infection

M. tuberculosis se transmet par voie aérienne, via le dépôt alvéolaire de gouttelettes contaminées en suspension dans l'air (1 à 5 μm). Ces gouttelettes proviennent d'une personne atteinte d'une tuberculose pulmonaire bacillifère (contagieuse). Leur émission se fait lors de la toux, des éternuements ou de la parole. Les quelques bacilles présents au niveau des espaces alvéolaires (foyer primaire) vont être phagocytés par les macrophages. Les bacilles vont alors, d'une part continuer à se multiplier au sein de ces macrophages au niveau du foyer primaire, et d'autre part être drainés vers le ganglion hilair le plus proche. L'adénopathie satellite provoquée est le plus souvent asymptomatique et seul un examen radiologique permet, à ce niveau, de mettre en évidence l'association « foyer primaire » et « adénopathie ». Il convient également de noter que par dissémination dans la circulation sanguine, des foyers secondaires peuvent se former à partir du foyer ganglionnaire.

Dans les deux à dix semaines suivant cette contamination, le patient développe une réponse immune à médiation cellulaire, qui lui permet de limiter la prolifération du bacille et, le plus souvent, de n'avoir aucun symptôme. Au cours de cette période, dite de latence, on observe la formation de lésions histologiques (ou granulomes) au niveau des différents foyers. Ces granulomes consistent en une accumulation de cellules monocytaires entourées de lymphocytes, avec au centre, une nécrose au contenu riche en lipide (nécrose caséuse). Ces lésions ont tendance à se calcifier, mais conservent en leur sein des bacilles tuberculeux dits « quiescents », responsables des rechutes (par exemple chez les immunodéprimés).

1.1.2 La maladie tuberculose au sein de l'organisme

Les bacilles quiescents présents dans les granulomes peuvent à l'occasion de certains facteurs recommencer à se multiplier et ainsi provoquer la maladie. La réactivation des bacilles est d'autant plus fréquente que le sujet est jeune (43 % en dessous d'un an, 24 % entre 1 et 5 ans,

et 15 % entre 11 et 15 ans) ou possède d'autres pathologies (immunodépression, diabète, insuffisance rénale, ...). La fréquence de développement de la maladie est estimée à 10%.

La grande majorité des cas de tuberculose maladie se localise au niveau pulmonaire. L'infection se produit par liquéfaction du caséum, puis par formation d'un foyer contenant une grande quantité de bacilles (10^8 à 10^{10}). Leur dissémination dans l'ensemble du poumon provoque une pleurésie ou une pneumonie aiguë tuberculeuse.

Plus rarement, la tuberculose peut se localiser de façon extra-pulmonaire (colonne vertébrale, moëlle, foie, rate, reins, méninges ...) donnant ainsi lieu à des formes disséminées ou miliaires, souvent gravissimes (Schéma 1).

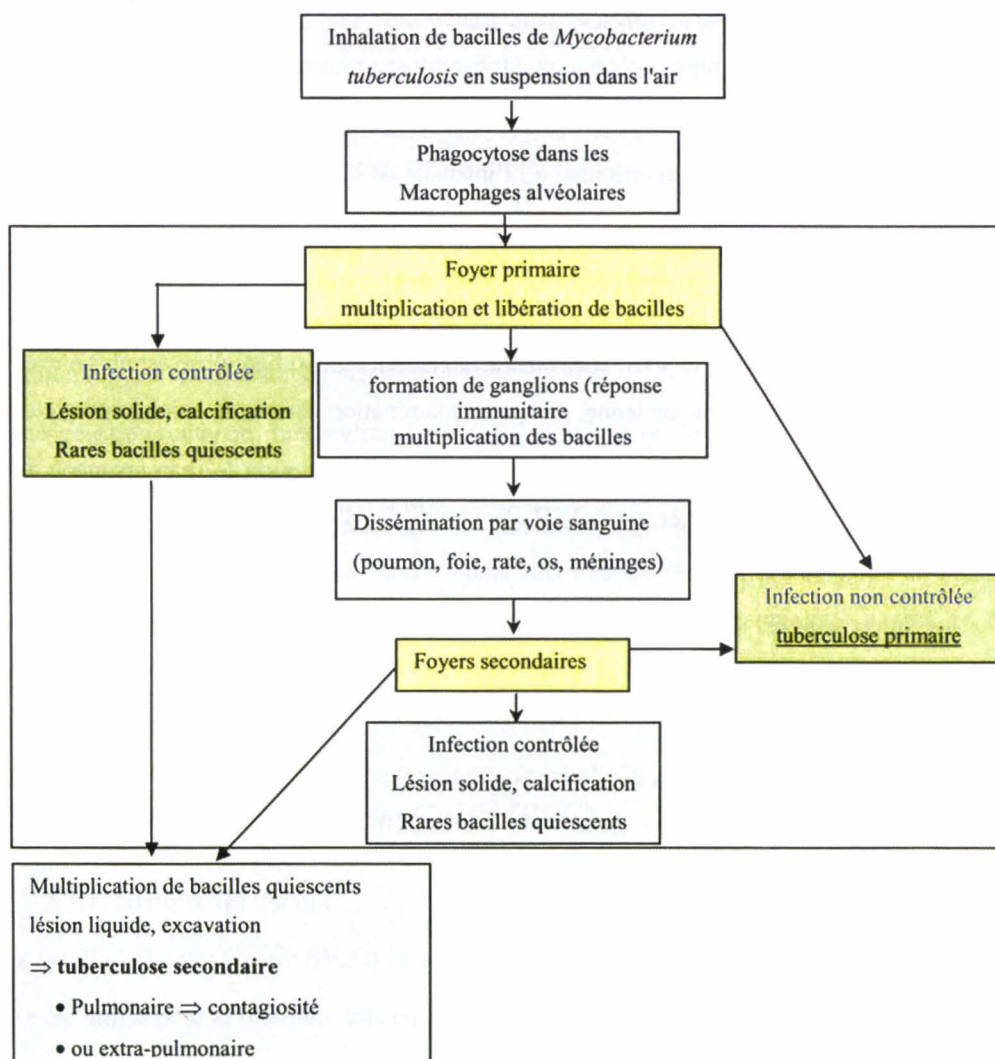


Schéma 1: Développement de la pathologie dans l'organisme selon le Pr Marquette et le Pr Lafitte¹

¹ Pr Marquette et Pr Lafitte. Année universitaire 2004-2005

1.1.3 Signes et symptômes

Les symptômes de la tuberculose peuvent varier énormément d'un individu à l'autre. Habituellement, un affaiblissement de l'état général est observable avec de l'asthénie, un amaigrissement, un état fébrile ou encore des sueurs nocturnes. Tous ces symptômes ne suffisent cependant pas toujours à aiguiller le diagnostic, le patient attribuant souvent son état à du surmenage. Cela est renforcé par le fait que la phase de primo-infection est très souvent asymptomatique, même si rarement des manifestations, telles qu'un état grippal, une kératoconjonctivite ou un érythème noueux sont observables.

La tuberculose pulmonaire donne lieu à des symptômes plus évocateurs, notamment une toux pouvant être accompagnée d'expectoration mucoïde ou muco-purulente, voire d'hémoptysies. A cela peuvent s'ajouter des douleurs thoraciques, le plus souvent unilatérales et majorées à l'inspiration, et plus rarement de la dyspnée.

D'un point de vue radiologique, la présence d'infiltrats, de nodules et/ou d'excavations, notamment dans les parties supérieures des lobes pulmonaires, doit orienter vers le diagnostic de tuberculose.

Lors de localisations extra-pulmonaires, les symptômes sont peu spécifiques, avec une adénopathie, une hépato-splénomégalie ou d'autres manifestations inflammatoires : ascite, péricardite, méningite...

1.1.4 Diagnostic

1.1.4.1 Radiographie, examen direct et culture du bacille

Actuellement, l'élément clé qui oriente le diagnostic est la radiographie thoracique. Néanmoins, il est systématique lors d'une suspicion de tuberculose d'avoir recours à un diagnostic bactériologique. Pour cela, des prélèvements biologiques doivent être réalisés sur le patient afin de mettre en évidence la présence de bacilles tuberculeux.

Lors de tuberculose pulmonaire, les prélèvements réalisés sont les crachats et les expectorations du malade. Si ces manifestations ne se présentent pas, un tubage gastrique est réalisé. Ces prélèvements sont effectués trois jours de suite, car les émissions de bacilles tuberculeux sont intermittentes. Le recours à la fibroscopie bronchique est également

envisageable en cas de bacilloscopies négatives successives. Une aspiration des sécrétions bronchiques, un lavage bronco-alvéolaire ou éventuellement la biopsie d'une lésion suspecte sont alors réalisés.

S'il s'agit de tuberculose extra-pulmonaire, les prélèvements réalisés sont fonction de l'organe atteint : analyse d'urine (tuberculose rénale), de liquide céphalorachidien (méningite tuberculeuse) ou hémoculture (chez les immunodéprimés). Des biopsies peuvent également être réalisées.

Une fois les prélèvements réalisés, le diagnostic bactériologique comporte quatre étapes :

- L'examen direct : il correspond à la recherche directe de bacille dans le prélèvement, par mise en évidence de leur acido-alcoolo-résistance (coloration de Ziehl-Neelsen ou à l'auramine). Le résultat est connu après quelques heures. Cette méthode est peu sensible, mais reste indispensable pour déterminer la contagiosité des patients.

- La culture : elle s'effectue classiquement dans le milieu solide de Lowenstein-Jensen pendant une durée d'environ quatre semaines. L'utilisation plus récente des méthodes Bactec, en milieu liquide de Middlebrook 7H9, permet d'avoir un résultat en huit à quinze jours. La méthode Bactec 460 utilise un système radiométrique employant des isotopes radioactifs, alors que la méthode Bactec MGIT 960 est basée sur une méthode fluorométrique.

- L'identification des mycobactéries obtenues en culture : outre la coloration de Ziehl-Neelsen mettant en évidence l'acido-alcoolo-résistance, de nouvelles méthodes d'identification ont vu le jour. La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) fait désormais office de référence. Elle est basée sur l'hybridation spécifique, par southern blot, de sondes géniques. Cela permet l'identification précise des espèces par comparaison de séquences conservées (ARN 16S). Quatre mycobactéries sont ainsi identifiables par cette méthode *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii* et *M. goodii*.

- L'antibiogramme : Il repose sur la mise en culture des bacilles sur un milieu solide en présence d'antibiotiques ou d'anti-tuberculeux. Le délai d'attente est similaire à celui d'une culture classique (environ quatre semaines), bien que les méthodes Bactec puissent être utilisées pour limiter cette attente. La biologie moléculaire permet également de déterminer la

résistance d'une mycobactérie en recherchant les mutations induisant une résistance du bacille aux traitements.

1.1.4.2 L'intra dermo réaction à la tuberculine (IDR)

Son principe vise à mettre en évidence une réaction cutanée d'hypersensibilité retardée induite par les antigènes mycobactériens. Elle est réalisée par injection intra-dermique de 100 µL de tuberculine. Une IDR est négative si l'induration provoquée est inférieure à 5 mm après 72 heures. Dans le cas contraire, elle est jugée positive et révélatrice, soit de la vaccination par le bacille Calmette Guérin (cf. 4.2), soit de la rencontre avec le bacille tuberculeux sauvage. Elle n'est pas indicative d'une immunité vis-à-vis de la maladie.

2 Historique et données épidémiologiques

La tuberculose existe depuis au moins 60 siècles. Elle a été décrite par les médecines grecque, chinoise, égyptienne et indienne. Pour illustration, des séquelles du mal de Pott ont été retrouvées sur des momies égyptiennes datant de 4000 ans avant JC. La tuberculose a longtemps été baptisée « consommation » ou « phtisie », mot d'origine grecque signifiant dépérissement. Le terme de « tuberculose » ne sera prononcé qu'à partir de 1834 par l'allemand Johann Lucas Schönlein, qui s'inspirera de l'appellation de « tubercule » donnée aux nodules pulmonaires présents lors de la pathologie.

De façon générale, plusieurs grandes vagues de contamination de tuberculose ont été recensées dans l'histoire. Ces épidémies correspondent à l'avènement des grandes civilisations et aux regroupements des populations qui y étaient associés. En Europe, les chiffres de contamination à la fin du 18^{ème} et au début du 19^{ème} siècle sont évocateurs. A Londres, en 1780, 1120 décès étaient recensés pour 100 000 habitants, et à Paris 36 % des décès étaient dus à ce fléau entre 1900 et 1910².

En dépit de son ancienneté, c'est uniquement à partir du 19^{ème} siècle et du développement de la médecine, que les connaissances sur la tuberculose évoluent. Les descriptions anatomo-cliniques effectuées par René Théophile Laennec en 1819, et la découverte du caractère

² Daniel, M. Thomas *Captain of death : the story of tuberculosis*

contagieux de la maladie par Jean – Antoine Villemin en 1865, seront les premières avancées significatives dans ce domaine. Il faudra malgré tout attendre le 24 mars 1882 pour assister à l’identification et à la culture *in vitro* de l’agent pathogène par Robert Koch, qui a ainsi donné son nom au bacille.

A partir du début du 20^{ème} siècle, le développement de l’hygiène, l’utilisation du vaccin BCG par Calmette et Guérin dès 1921, ainsi que la découverte des anti-tuberculeux ont permis une forte diminution du nombre de cas de tuberculose. Parmi les composés ayant permis une avancée dans le traitement, peuvent être citées la streptomycine découverte par Waksman en 1943, l’isoniazide utilisée depuis 1952, et la rifampicine à partir de 1966. Grâce à ces traitements, le nombre de cas recensés en France par l’Institut National de Veille Sanitaire³ a fortement diminué au cours des dernières décennies et n’était plus que de 8.9 pour 100 000 habitants en 2005 (Figure 1).

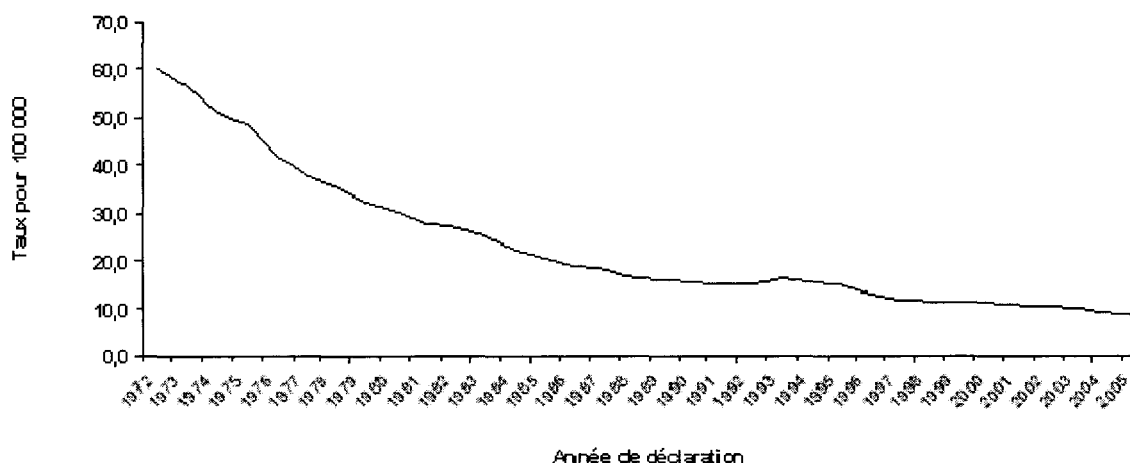


Figure 1 : Nombre de cas par année en France selon l’INVS

Ces progrès thérapeutiques ont laissé entrevoir la perspective à l’aube du 21^{ème} siècle d’une éradication progressive du fléau à l’échelle mondiale. Malheureusement, cela s’est révélé être une prévision beaucoup trop optimiste. En effet, avec l’apparition de résistances aux traitements utilisés, ainsi que la propagation du VIH, une recrudescence de la maladie a été observée durant les 20 dernières années. Ce fait est dû à la présence de bacilles quiescents susceptibles de se réactiver chez les porteurs sains. En 1986 aux Etats-Unis, pour la première

³ Antoine, D.; Che, D. *Medecine et Maladies Infectieuses* 2007, 37, 245-52.

fois depuis plus de 30 ans, le nombre de cas recensés de tuberculose était légèrement en hausse (Figure 2).

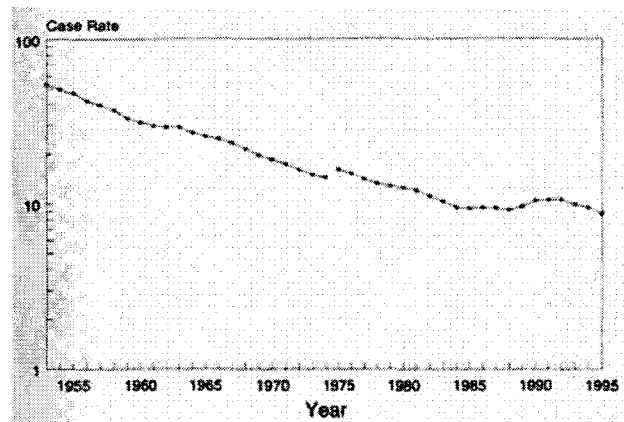


Figure 2 : Nombre de cas par année aux Etats-Unis²

Aujourd'hui, avec 1.6 millions de morts et 8.8 millions de nouveaux cas chaque année, la tuberculose est la deuxième maladie infectieuse au monde après le SIDA. Les études montrent qu'elle est la cause de 7 % des décès sur l'ensemble de la planète, les déplacements de populations lors de ces 40 dernières années ayant largement contribué à la propagation de la maladie. Selon l'OMS, près d'un tiers de la population mondiale est infectée et 22 pays totalisent à eux seuls 80 % des cas mondiaux, notamment l'Afrique sub-saharienne et l'Asie du sud-est. Les pays en voie de développement sont les premiers à souffrir de cette situation, du fait de leurs grandes difficultés d'accès aux traitements et de leurs observances (Figure 3)⁴.

⁴ Report of the meeting of the WHO global task force on XDR-TB October 2006

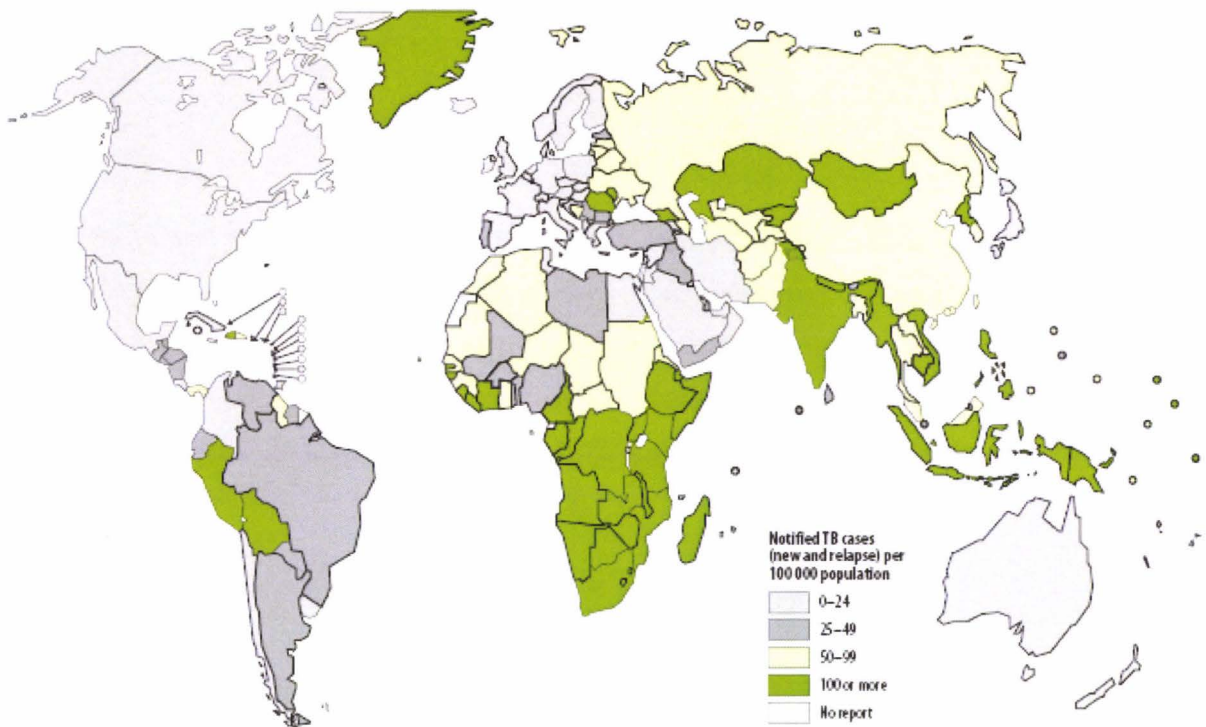


Figure 3 : Nombres de cas recensés de tuberculose par pays sur la planète d’après l’OMS

L’OMS estime qu’entre 2000 et 2020, près d’un milliard de personnes seront nouvellement infectées. Deux cent millions d’entre elles devraient développer la maladie et 35 millions en mourront si aucune amélioration n’est apportée dans le traitement de cette infection. Cette recrudescence des cas est notamment à associer à la propagation de l’épidémie de VIH. En effet, le risque de développer la maladie est accru chez les personnes immunodéprimées.

3 Caractéristiques des mycobactéries

3.1 Généralités

Les bactéries responsables de la pathologie sont des mycobactéries appartenant au sous-ordre des Corynebactéries dans l’ordre des Actinomycètes. Les mycobactéries sont des protozoaires aérobies stricts de 2 à 5 μm , dont le génome est caractérisé par un pourcentage élevé en guanine et cytosine (60 à 70 %). Leur durée de division est longue par rapport à d’autres espèces bactériennes (15 à 20 heures pour *Mycobacterium tuberculosis*).

Historiquement, trois genres de Mycobactéries ont été identifiés comme pouvant être responsables de la pathologie :

- *Mycobacterium tuberculosis*, qui a une propagation strictement humaine et qui est responsable de la très grande majorité des cas recensés.
- *Mycobacterium bovis*, qui est l'agent de la tuberculose bovine, mais qui peut être également pathogène pour l'homme.
- *Mycobacterium africanum*, qui est présent essentiellement en Afrique de l'ouest.

3.2 Enveloppe cellulaire des mycobactéries

3.2.1 Description

La caractéristique la plus marquante des mycobactéries est qu'elles possèdent une enveloppe épaisse, beaucoup moins perméable aux molécules hydrophobes que celle d'*Escherichia coli*. Celle-ci leur procure une résistance à diverses molécules antibactériennes. C'est également à cette formidable barrière que le bacille doit sa capacité de quiescence et sa survie au sein d'un environnement aussi hostile que celui de la cellule phagocytaire. A cause de cette singularité, la classification phylogénique des mycobactéries a longtemps été sujette à controverse. De par leur séquence d'ARNr 16S, elles ont été longtemps associées à la catégorie des gram-positif⁵. Plus récemment, le séquençage complet du génome de *M. tuberculosis* a relancé la controverse⁶.

La structure de l'enveloppe mycobactérienne est extrêmement complexe, car elle est constituée d'un ensemble de longues chaînes lipidiques (les acides mycoliques) associées à des lipopolysaccharides, qui sont eux-mêmes en relation avec la membrane plasmique.

De façon schématique, cette enveloppe peut se diviser en trois parties intimement liées les unes aux autres : la membrane cytoplasmique, la paroi cellulaire et la capsule (Figure 4).

⁵ Woese, C. R. *Microbiol Rev* **1987**, *51*, 221-71.

⁶ Fu, L. M.; Fu-Liu, C. S. *Tuberculosis* **2002**, *82*, 85-90.

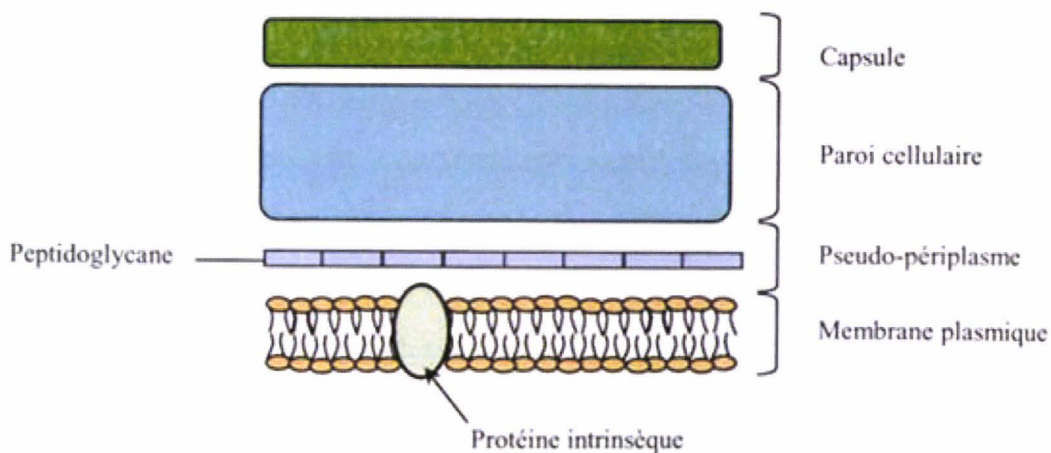


Figure 4 : Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne

3.2.1.1 La membrane plasmique

La membrane plasmique mycobactérienne est une bi-couche lipidique constituée de lipides et phospholipides associés à des protéines. Les lipides présents sont des acides gras de longueur inférieure à 20 atomes de carbone. Les plus fréquemment rencontrés sont l'acide palmitique (C_{16:0}), l'acide oléique (C_{18:1}) et l'acide tuberculostéarique (ou acide 10 méthyl-octadécanoïque). Les phospholipides présents sont la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidyl glycérol et le phosphatidylinositol mannoside.

3.2.1.2 La paroi cellulaire

La paroi cellulaire est constituée de trois composants majeurs (Figure 5⁷):

- Le mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (mAGP) qui expose des résidus lipidiques comme les acides mycoliques vers le milieu extérieur. Les acides mycoliques sont estérifiés sur l'arabinogalactane (AG), qui est lui-même en interaction avec le peptidoglycane (PG).

⁷ Kremer, L. B.; Besra, G. S.; Brennan, P. J.; Baulard, A.R. *médecine/sciences* **1999**, *15*, 842-850.

- Le lipoarabinomannane (LAM) qui est ancré dans la membrane plasmique via une tête phosphatidyl-inositol-mannoside. Il est impliqué dans la reconnaissance par les macrophages, ainsi que dans la réponse immunitaire.
- Le lipomannane (LM) qui est un analogue du LAM dépourvu d'arabinose.

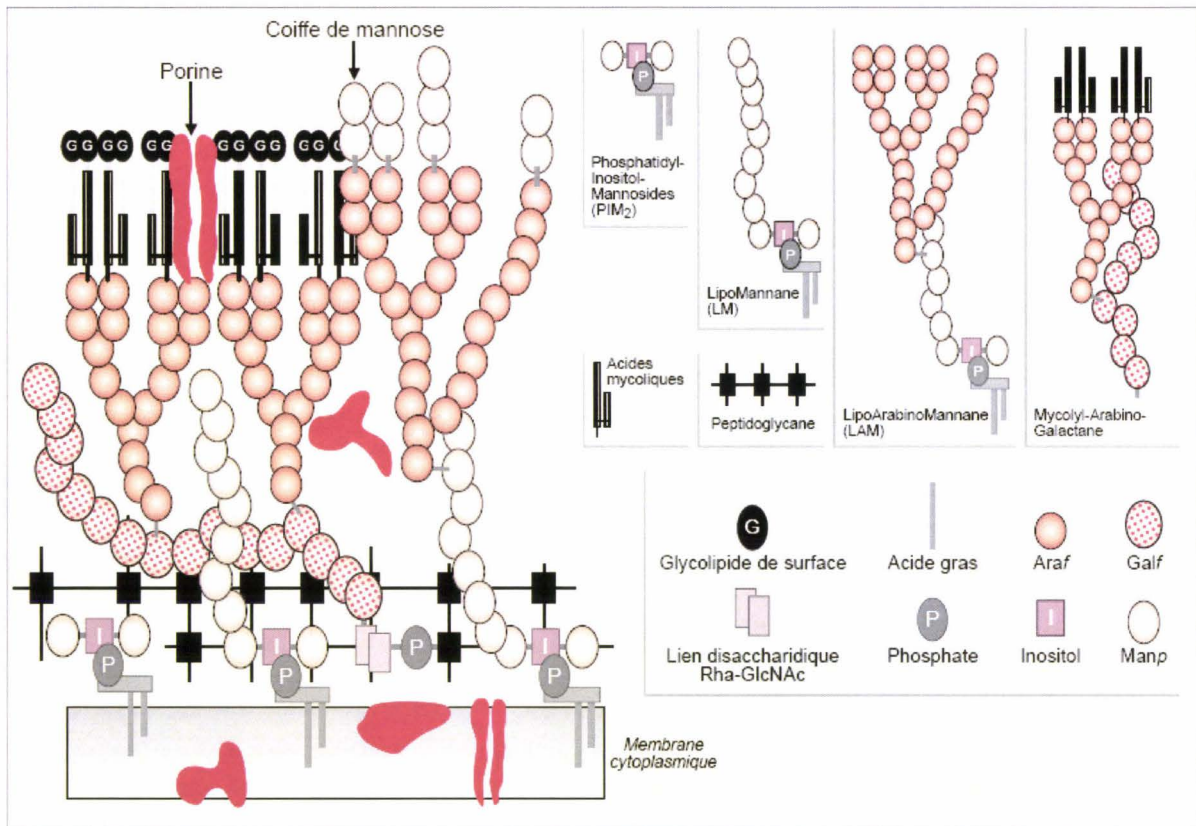


Figure 5 : Structure de la paroi Mycobactérienne selon Kremer *et al*⁷

Afin de permettre la diffusion des nutriments hydrophiles au sein de la mycobactérie, des canaux protéiques transmembranaires appelés porines sont également présents au sein de cette paroi. La porine majoritairement présente chez *M. smegmatis*, MspaA, s'est révélée être un homooctamère en forme de gobelet avec un canal central unique (Figure 6)⁸.

⁸ Faller, M.; Niederweis, M.; Schulz, G. E. *Science* **2004**, *303*, 1189-92.

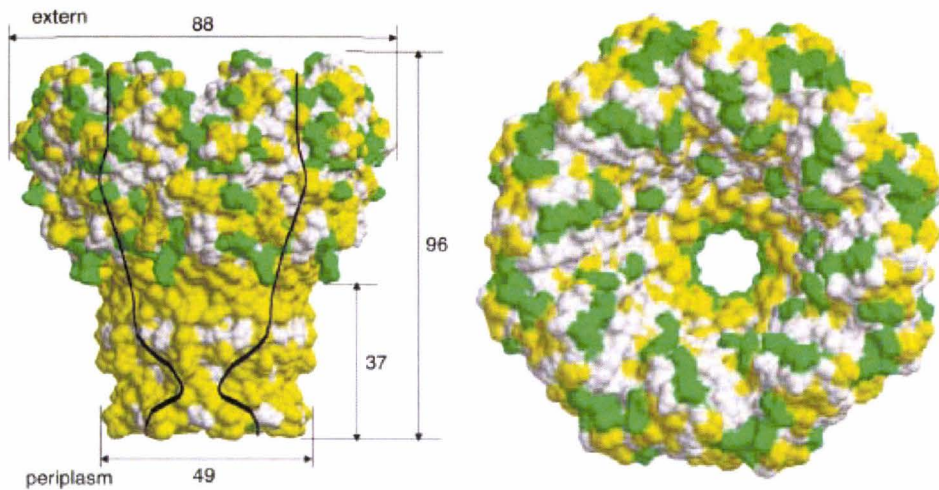


Figure 6 : Représentation de la porine MspaA de *M. smegmatis* selon Faller *et al*⁸

Les porines jouent également un rôle important en thérapeutique, puisque certains antituberculeux hydrophiles (les aminoglycosides par exemple) sont supposés les utiliser pour pénétrer au sein du bacille. Les connaissances sur ces protéines sont cependant encore insuffisantes pour déduire leur influence sur la pharmacocinétique des médicaments en cours de développement.

3.2.1.3 La capsule

La capsule mycobactérienne est principalement constituée de polysaccharides. La plupart sont des glycanes formés par l'adjonction linéaire de D-glucoses liés en α -1,4. Ces derniers peuvent être eux mêmes substitués par un ou deux autres résidus de D-glucose en position 6. D'autres constituants sont également présents au sein de cette capsule, notamment l'arabinomannane (AM) ainsi que de nombreuses protéines.

3.2.2 Biosynthèse des acides mycoliques de la paroi cellulaire

3.2.2.1 Structures des acides mycoliques

Les acides mycoliques sont le constituant majeur de la paroi mycobactérienne. Ils représentent environ un tiers du poids sec de cette dernière. En terme de structures, ce sont des acides gras β -hydroxylés (méroacides en C₅₄ à C₆₃) avec une longue chaîne alkyle en α (C₂₂ à C₂₄). Ils sont, soit estérifiés à l'extrémité du mAGP, soit libres conjugués au tréhalose pour former du tréhalose mono ou di-mycolate (TMM ou TDM). L'empilement linéaire des

chaînes d'acides mycoliques, ainsi que l'insertion de TMM, de TDM et d'autres lipides, forment une pseudo couche lipidique en surface de la paroi bactérienne. C'est cette barrière lipidique qui est en grande partie à l'origine de la résistance des mycobactéries aux agressions de l'environnement.

Chaque souche mycobactérienne contient un mélange différent d'acides mycoliques, ce qui peut constituer un critère d'identification. Pour illustration, 3 classes structurales d'acides mycoliques sont trouvées chez *M. tuberculosis* (figure 7):

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

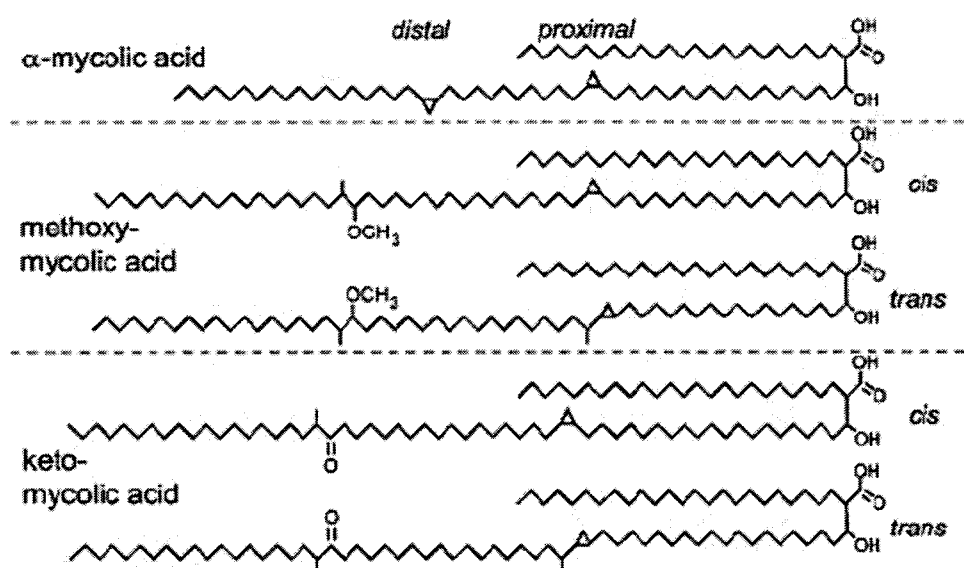


Figure 7 : Structures des acides mycoliques présents chez *M. tuberculosis*

3.2.2.2 Systèmes enzymatiques mis en cause dans la biosynthèse des acides mycoliques

Le rôle prépondérant joué par les acides mycoliques dans la survie du bacille au sein des macrophages, a poussé de nombreuses équipes à étudier leur biosynthèse. De nombreuses enzymes impliquées dans ce processus ont ainsi été mises au jour. Elles sont autant de cibles déjà exploitées ou potentielles dans la recherche de nouveaux anti-tuberculeux. Ces protéines sont regroupées dans des complexes appelés FAS (Fatty Acid Synthetase), au sein desquels elles peuvent jouer successivement leur rôle. *M. tuberculosis* possède deux systèmes FAS appelés respectivement FAS-I et FAS-II. Le module FAS-I est décrit chez les eucaryotes, et

les mycobactéries sont les seuls procaryotes à le posséder. En revanche, le complexe FAS-II se retrouve chez les bactéries et les végétaux.

La synthèse des acides mycoliques se déroule en cinq étapes :

- synthèse d'acides gras saturés en C₂₀ par le système FAS-I. Ce sont les précurseurs des méroacides.
- synthèse d'acides gras saturés en C₂₆ par le système FAS-I. Ce sont les chaînes α des acides mycoliques.
- modification des méroacides par élongation et fonctionnalisation. Le système FAS-II joue un grand rôle dans cette étape.
- condensation des méroacides et des chaînes α pour former l'acide mycolique.
- transport de l'acide mycolique dans la paroi mycobactérienne.

Récemment, un modèle de l'ensemble de ce processus de synthèse a été proposé par Takayama *et al*, en s'appuyant sur les données décrites à ce jour⁹.

3.2.2.2.1 Le module FAS-I

Le système FAS-I provient du gène unique *fab* (*Rv2524c*) codant pour une protéine qui s'homodimérise afin de former un complexe multifonctionnel. FAS-I intervient dans l'élongation successive des acides gras en les allongeant de deux carbones à la fois¹⁰. Cela se réalise par condensation de l'acétyl-coenzymeA (Acetyl-CoA) ou de l'acide gras en cours d'élongation avec un malonyl-CoA. Le β -cetoacyl ainsi formé subit successivement réduction, déshydratation et réduction afin de fournir un acide gras saturé portant deux carbones supplémentaires (schéma 2). Les acides gras sortant du complexe FAS-I sont couplés au CoenzymeA. Seuls les acides gras en C₂₀ ou C₂₆ produits de cette façon, constituent des précurseurs pour le module FAS-II et interviennent dans la biosynthèse des acides mycoliques. Les autres acides gras plus courts (C₁₆ et C₁₈) sont, eux, impliqués dans la production des phospholipides membranaires.

⁹ Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. *Clin Microbiol Rev* **2005**, *18*, 81-101.

¹⁰ Smith, S.; Witkowski, A.; Joshi, A. K. *Progress in Lipid Research* **2003**, *42*, 289-317.

I. Acetyl transacylation



II. Malonyl transacylation



III. Condensation



IV. Sum of β -ketoacyl reduction, dehydration and enoyl reduction



V. Recycling leads to two key products



Schéma 2: Synthèse des acides gras en C₂₀ ou C₂₆ par le module FAS-I selon Takayama *et al*^p

3.2.2.2.2 Le module FAS-II

Le complexe FAS-II intervient, d'une part dans l'élongation des acides gras C_{20:0} acyl-CoA fournis par le complexe FAS-I, et d'autre part dans l'insertion de deux insaturations en des positions précises de la chaîne carbonée. Ces insaturations permettent, en un second temps, l'introduction des groupements cyclopropyle, méthoxy ou cétone des divers acides mycoliques.

FAS-II intervient sur les chaînes carbonées en cours d'élongation liées à l'Acyl Carrier Protein (ACP). Le lien entre les systèmes FAS-I et FAS-II est réalisé par la protéine mtFabH (une β -cétacyl-ACP synthase III) qui assure le couplage d'un acide gras C_{20:0} acyl-CoA avec un Malonyl-ACP pour former un β -cétiothioester-ACP^{11,12}. Ce dernier pourra, par la suite, subir une élongation de chaîne.

Le module d'élongation est constitué par l'action successive de quatre enzymes qui sont respectivement une β -cétacyl-ACP synthase (KasA/KasB)¹³ (1), une β -cétacyl-ACP

¹¹ Choi, K.-H.; Kremer, L.; Besra, G. S.; Rock, C. O. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28201-7.

¹² Scarsdale, J. N.; Kazanina, G.; He, X.; Reynolds, K. A.; Wright, H. T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20516-22.

¹³ Kremer, L.; Dover, L. G.; Carrere, S.; Nampoothiri, K. M.; Lesjean, S.; Brown, A. K.; Brennan, P. J.; Minnikin, D. E.; Loch, C.; Besra, G. S. *Biochem J* **2002**, *364*, 423-30.

réductase (2), une β -hydroxyacyl-ACP deshydrase (3) et enfin une 2-*trans*-énoyl-ACP réductase (InhA)¹⁴ (4) (schéma 3).

Le mode d'introduction des deux insaturations au sein de la chaîne carbonée est encore discuté. Néanmoins, Takayama *et al*⁹ ont proposé l'action successive d'une β -cétol-ACP réductase (2), d'une β -hydroxyacyl-ACP deshydrase (3) et enfin d'une 2-*trans*-énoyl-ACP isomérase au sein de modules qu'ils ont nommés FAS-IIA et FAS-IIB (schéma 4).

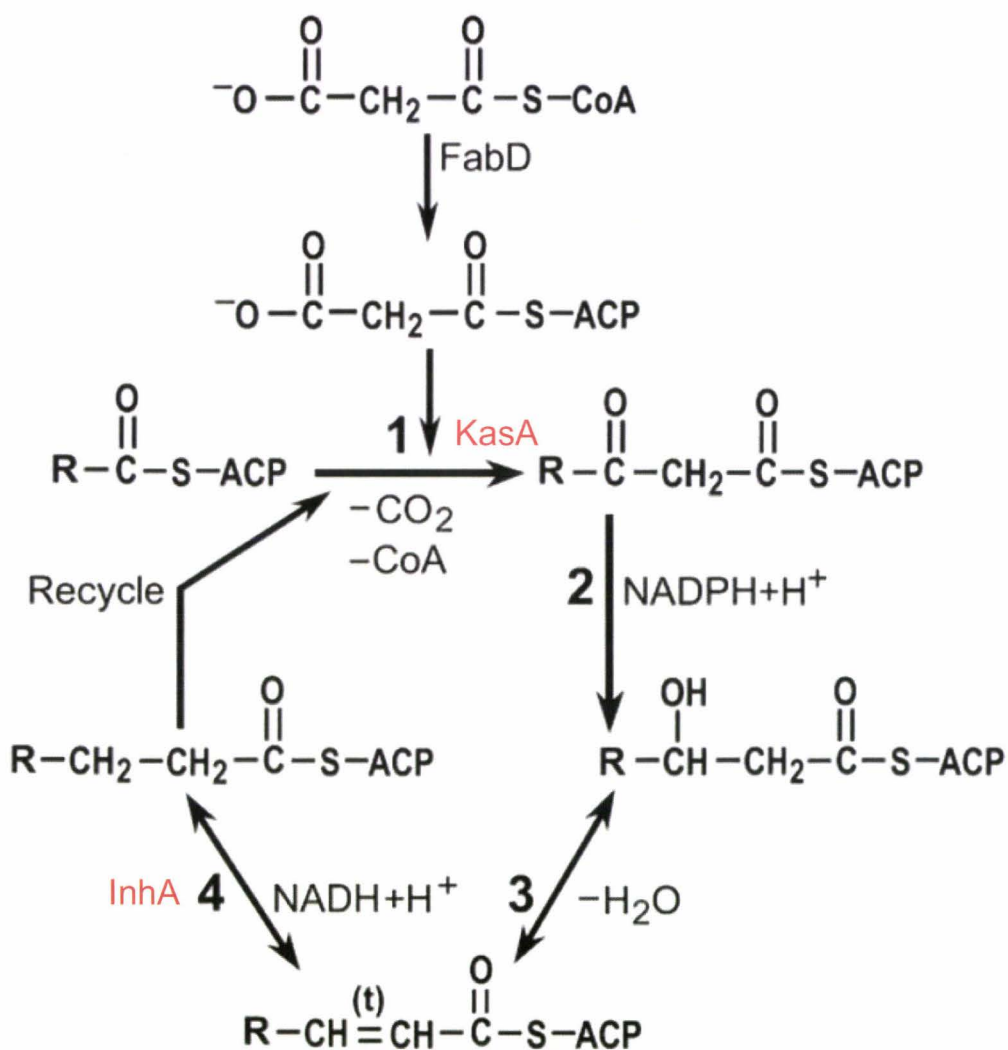


Schéma 3: Fonctionnement du module d'élongation FAS-II selon Takayama *et al*⁹

¹⁴ Marrakchi, H.; Laneelle, G.; Quemard, A. *Microbiology* **2000**, *146*, 289-296.

l'isoniazide ou de l'éthionamide provoque l'inhibition de la synthèse des acides mycoliques, ainsi que l'accumulation d'acides gras en Δ^3 -C_{22:1} au sein de la mycobactérie.

3.2.2.2.3 Fonctionnalisation des insaturations des méroacides

Les méroacides obtenus à partir du module FAS-II portent deux insaturations. Les modifications sont réalisées par diverses enzymes appartenant à deux classes: MmA (méthyltransférases) et Cma (cyclopropanation of mycolic acids)^{15,16,17,18,19,20}.

3.2.2.2.4 Condensation des méroacides et de la chaîne α

La condensation entre les méroacides obtenus par le système FAS-II et la chaîne α provenant du système FAS-I, est réalisée par le complexe enzymatique polyketide synthase 13 (Pks13). Le mode d'assemblage entre les deux acides gras est une condensation de type Claisen²¹.

3.2.2.2.5 Transfert des acides mycoliques dans la paroi bactérienne

Les mécanismes exacts impliqués dans le transfert des acides mycoliques vers la paroi sont inconnus. Néanmoins, il semblerait que les acides mycoliques nouvellement synthétisés soient couplés à du tréhalose pour être transférés en dehors de la cellule par un transporteur de tréhalose monophosphate (TMM)^{22,23}. Ce dernier serait alors couplé à l'arabinogalactane par

¹⁵ Yuan, Y.; Crane, D. C.; Musser, J. M.; Sreevatsan, S.; Barry, C. E., 3rd *J Biol Chem* **1997**, *272*, 10041-9.

¹⁶ Dubnau, E.; Chan, J.; Raynaud, C.; Mohan, V. P.; Laneelle, M. A.; Yu, K.; Quemard, A.; Smith, I.; Daffe, M. *Mol Microbiol* **2000**, *36*, 630-7.

¹⁷ Dinadayala, P.; Laval, F.; Raynaud, C.; Lemassu, A.; Laneelle, M. A.; Laneelle, G.; Daffe, M. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 7310-9.

¹⁸ Yuan, Y.; Barry, C. E., 3rd *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 12828-33.

¹⁹ Glickman, M. S.; Cahill, S. M.; Jacobs, W. R., Jr. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 2228-33.

²⁰ Glickman, M. S. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 7844-9.

²¹ Portevin, D.; De Sousa-D'Auria, C.; Houssin, C.; Grimaldi, C.; Chami, M.; Daffe, M.; Guilhot, C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 314-9.

²² Sathyamoorthy, N.; Takayama, K. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 13417-23.

²³ Shimakata, T.; Minatogawa, Y. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, *380*, 331-8.

l'action du complexe protéique Ag85/Fbp (Fibronectin-binding domain) pour permettre la formation de mycolyl-arabinogalactane^{24,25,26,27}.

4 Prophylaxie et traitement de la tuberculose

La présence des acides mycoliques rend la paroi mycobactérienne beaucoup moins perméable aux antibiotiques classiques. Le traitement de la pathologie nécessite donc l'utilisation de dérivés thérapeutiques particuliers et de mesures sanitaires très strictes.

4.1 Déclaration et mesures d'investigations

La prévention de la tuberculose passe, d'abord et avant tout, par la reconnaissance des cas de tuberculose contagieuse. La tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1964, et tout nouveau cas doit être signalé aux services de lutte antituberculeuse (LAT) et aux autorités sanitaires (DDASS). Cela permet d'avoir un suivi de l'évolution de la maladie au niveau national, et également de réaliser des investigations dans l'environnement des malades déclarés. En effet, les personnes de l'entourage proche des malades sont les plus exposées au risque de contamination. Cela englobe bien évidemment la famille du patient, mais aussi les collectivités dans lesquelles il est présent. A partir de ces investigations, des recherches de cas de primo-infection sont réalisées afin d'envisager la mise en place de traitements prophylactiques.

4.2 La vaccination par le bacille Calmette Guérin

Le bacille Calmette Guérin (BCG) est une souche atténuée vivante de *Mycobacterium bovis* utilisée depuis 1921 comme vaccin de la tuberculose. Son rôle est de protéger les individus en limitant l'étape initiale de dissémination lors de la primo infection. Cela a pour conséquence

²⁴ Belisle, J. T.; Vissa, V. D.; Sievert, T.; Takayama, K.; Brennan, P. J.; Besra, G. S. *Science* **1997**, *276*, 1420-2.

²⁵ Puech, V.; Bayan, N.; Salim, K.; Leblon, G.; Daffe, M. *Mol Microbiol* **2000**, *35*, 1026-41.

²⁶ Puech, V.; Guilhot, C.; Perez, E.; Tropis, M.; Armitige, L. Y.; Gicquel, B.; Daffe, M. *Mol Microbiol* **2002**, *44*, 1109-22.

²⁷ Ronning, D. R.; Klabunde, T.; Besra, G. S.; Vissa, V. D.; Belisle, J. T.; Sacchettini, J. C. *Nat Struct Biol* **2000**, *7*, 141-6.

de réduire le risque d'évolution d'une primo-infection en tuberculose maladie. Du fait de sa large distribution de par le monde, les souches de BCG utilisées dans les différents pays ne sont pas identiques entre elles malgré l'appellation commune. En 2005, l'OMS estimait qu'environ un milliard de personnes avaient reçu le BCG. En dépit de sa forte notoriété, son utilisation est aujourd'hui très controversée pour deux raisons :

- Premièrement, son efficacité s'est révélée être très disparate selon les pays, et quasiment nulle dans les régions à forte endémie de tuberculose.

- Deuxièmement, les personnes vaccinées deviennent réactives au test d'intra dermo réaction (IDR) à la tuberculine. En cas de positivité de ce test, il est donc difficile de distinguer la vaccination par le BCG d'une contamination par *M. tuberculosis*.

En France, la vaccination par le BCG n'est plus obligatoire depuis peu. L'objectif de la vaccination systématique pendant de nombreuses années visait à prévenir les formes graves de la maladie (tuberculose miliaire et méningite), notamment chez l'enfant. L'efficacité estimée du vaccin chez l'adulte est de l'ordre de 50 %. Actuellement de nouveaux vaccins sont en cours d'élaboration dans le monde, avec pour objectif de permettre une immunisation accrue vis à vis du bacille.

4.3 Traitements de la tuberculose

Le traitement anti-tuberculeux est basé sur l'utilisation d'une polychimiothérapie, afin de prévenir la sélection de mutants résistants. La monothérapie est donc à proscrire, sauf en cas de prophylaxie.

Trois populations de bacilles sont visées par le traitement :

- Les bacilles extracellulaires : ils sont la cause des manifestations cliniques de la maladie et sont responsables de la contagiosité de la maladie. Ils représentent plus de 95 % du nombre total des bacilles dans le cas d'une tuberculose pulmonaire classique.

- Les bacilles intracellulaires quiescents au sein des macrophages

- Les bacilles extracellulaires quiescents au sein du caséum : ils peuvent persister pendant des dizaines d'années avant de se réactiver, soit spontanément, soit à l'occasion d'une diminution des défenses immunitaires. Ils sont responsables des rechutes à distance parfois observables et justifient le maintien du traitement pendant plusieurs mois après la disparition des signes cliniques.

4.3.1 Médicaments utilisés dans le traitement de la tuberculose en première intention

4.3.1.1 L'isoniazide

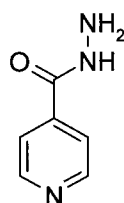


Figure 8 : Structure de l'isoniazide

L'activité bactéricide de l'isoniazide (INH) (Figure 8) fut découverte en 1952²⁸, mais son mécanisme d'action ne fut déterminé que beaucoup plus tard²⁹. Ce n'est que dans les années 70 que son effet sur la biosynthèse des acides mycoliques fut établi³⁰. Par la suite, deux gènes de *M. tuberculosis* furent déterminés comme étant liés aux mécanismes d'action de l'INH. Le premier, *katG*, code pour la catalase-péroxydase KatG et intervient dans l'activation de l'INH^{31,32,33,34}. La structure de l'espèce activée produite *in situ* est un radical isonicotinoyle extrêmement réactif^{35,36}. D'autres espèces radicalaires intermédiaires comme le radical hydrazylisonicotinique, ont également été identifiées (Figure 9)³⁷.

²⁸ Bernstein, J.; Lott, W. A.; Steinberg, B. A.; Yale, H. L. *Am Rev Tuberc* **1952**, *65*, 357-64.

²⁹ Timmins, G. S.; Deretic, V. *Mol Microbiol* **2006**, *62*, 1220-7.

³⁰ Winder, F. G.; Collins, P. B. *J Gen Microbiol* **1970**, *63*, 41-8.

³¹ Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. *Nature* **1992**, *358*, 591-3.

³² Heym, B.; Alzari, P. M.; Honore, N.; Cole, S. T. *Mol Microbiol* **1995**, *15*, 235-45.

³³ Bertrand, T.; Eady, N. A.; Jones, J. N.; Jesmin, J. M.; Jamart-Gregoire, B.; Raven, E. L.; Brown, K. A. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 38991-9.

³⁴ Slayden, R. A.; Barry, r. C. E. *Microbes and Infection* **2000**, *2*, 659-69.

³⁵ Johnsson, K.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7425-6.

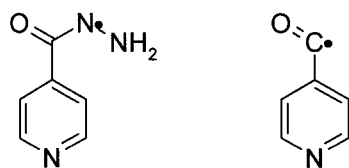


Figure 9 : Espèces radicalaires formées par KatG, issues de l'INH selon Sipe *et al*³⁷

Le second gène, *inhA*, code pour une ényol-ACP réductase du système FAS II (Fatty Acid Synthase) impliquée dans la synthèse des acides mycoliques^{14,38,39}. L'INH sous forme activée réagit avec le NAD (nicotinamide adenine dinucleotides) afin de former un ensemble de dérivés isonicotiniques possédant un adduit NAD⁴⁰. Parmi eux, le composé acyclique **B** de configuration S inhibe l'action de InhA avec une forte affinité^{41,42} ($K_i = 1$ nM) et empêche donc la synthèse des acides mycoliques par la mycobactérie (Figure 10, 11 et schéma 5).

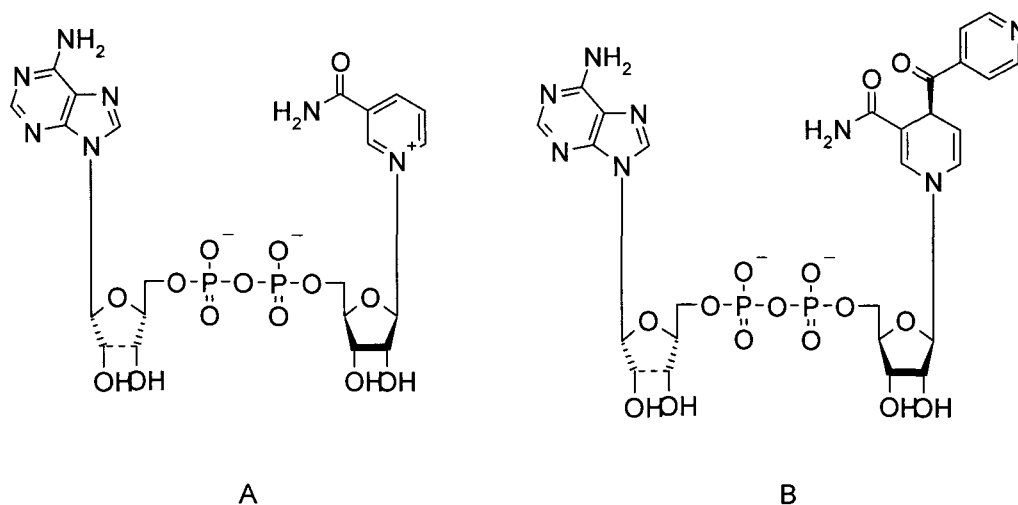


Figure 10 : Structure du NAD (A) et de l'adduit acylé en configuration S (B)

³⁶ Johnsson, K.; King, D. S.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5009-10.

³⁷ Sipe, H. J.; Jaszewski, A. R.; Mason, R. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 226-33.

³⁸ Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W. R., Jr. *Science* **1994**, *263*, 227-30.

³⁹ Rozwarski, D. A.; Vilcheze, C.; Sugantino, M.; Bittman, R.; Sacchettini, J. C. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 15582-9.

⁴⁰ Nguyen, N.; Claparols, C.; Bernadou, J.; Meunier, B. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 877-83.

⁴¹ Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, *100*, 13881-6.

⁴² Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H.; Jacobs, W. R., Jr.; Sacchettini, J. C. *Science* **1998**, *279*, 98-102.

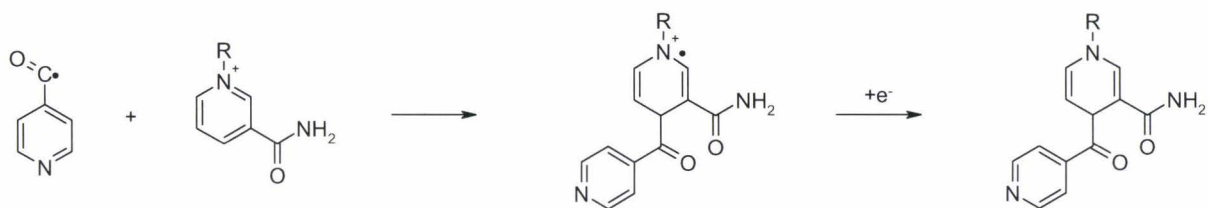


Schéma 5: Formation supposée du composé **B** selon Timmins *et al*²⁹

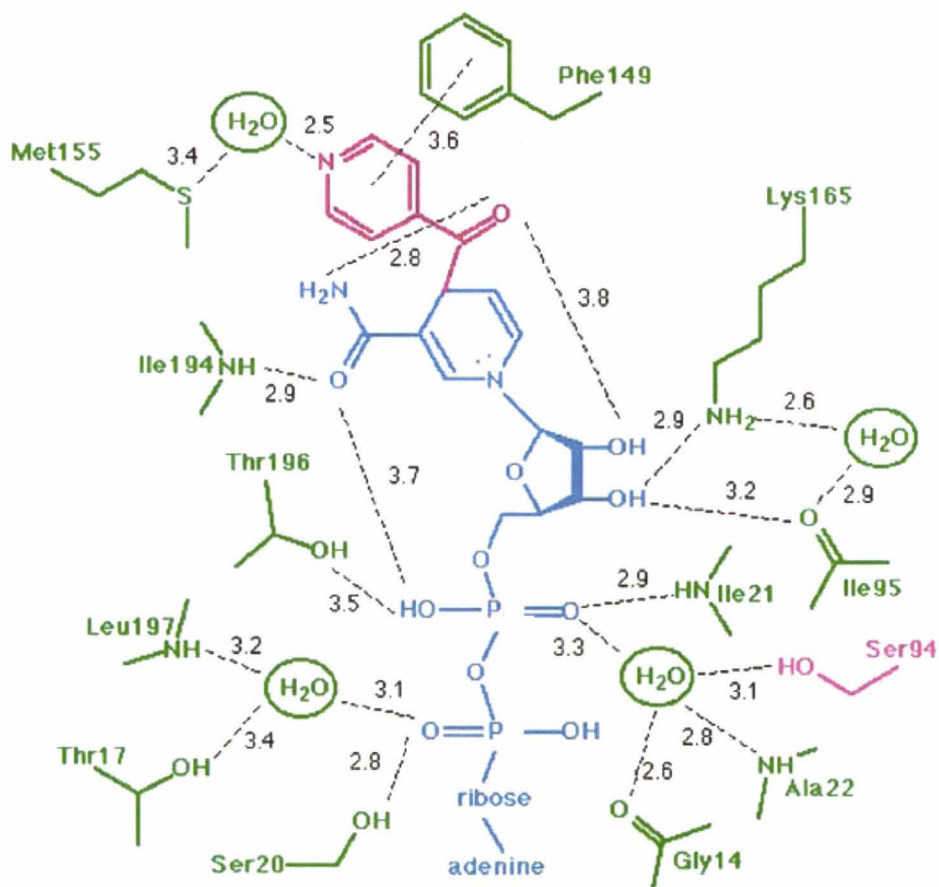


Figure 11 : Interaction du composé **B** au sein de InhA selon Rozwarski *et al*⁴²

L'isoniazide s'est également révélé capable d'inhiber de façon subnanomolaire la dihydrofolate réductase (DHFR), une enzyme impliquée dans la synthèse des acides nucléiques, par formation d'un adduit avec le NADP. A la différence du composé **B** interagissant avec InhA, l'espèce active formée **C** est de configuration R (figure 12) et a pu être cocrystallisée au sein de l'enzyme (Figure 13)⁴³. D'autres protéines de *M. tuberculosis*, principalement des déshydrogénases et des réductases, sont également décrites pour interagir

⁴³ Argyrou, A.; Vetting, M. W.; Aladegebami, B.; Blanchard, J. S. *Nat Struct Mol Biol* **2006**, *13*, 408-13.

avec les formes adduites de l'INH⁴⁴. L'ensemble de ces observations explique la forte activité antituberculeuse de ce composé.

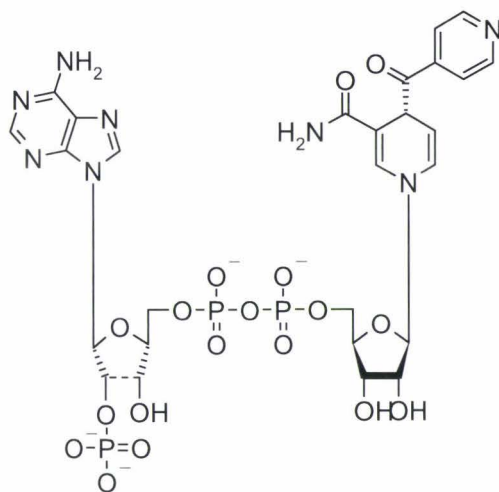


Figure 12 : Structure du composé C selon Argyrou *et al*⁴³

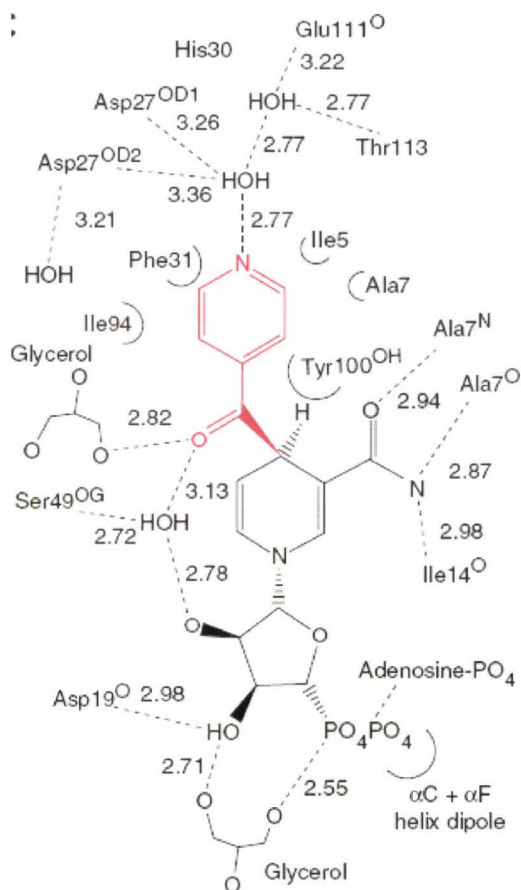


Figure 13 : Interaction du composé C au sein de la DHFR selon Argyrou *et al*⁴³

⁴⁴ Argyrou, A.; Jin, L.; Siconilfi-Baez, L.; Angeletti, R. H.; Blanchard, J. S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 13947-53.

La rifampicine (Figure 14) est un composé héli-synthétique qui a été découvert en 1965 et qui appartient à la classe des rifamycines. Le nom de cette famille de composés vient de la première molécule découverte de cette classe : la rifamycine B, molécule naturelle isolée à partir de *Nocardia mediterranei*. Les différentes molécules de cette famille possèdent des propriétés inhibitrices d'ARN-polymérase-ADN-dépendante, empêchant ainsi les mécanismes de transcription au sein de divers germes⁴⁸. Son utilisation est préconisée dans le traitement des affections à mycobactéries (tuberculose et lèpre), mais aussi dans les cas de brucellose ou dans la prévention d'infections à méningocoques. Les phénomènes de résistance à la rifampicine ont été reliés à la présence de mutations au niveau du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase.

Dans le cadre du traitement de la tuberculose, la rifampicine est active sur toutes les populations du bacille. Elle est d'ailleurs le seul composé de la poly chimiothérapie actif sur les bacilles présents au sein du caséum. Son utilisation est donc préconisée pendant plusieurs mois, afin de prévenir les risques de récives. Elle est, cependant, source de nombreuses interactions médicamenteuses de par son fort caractère inducteur enzymatique.

4.3.1.3 Le pyrazinamide

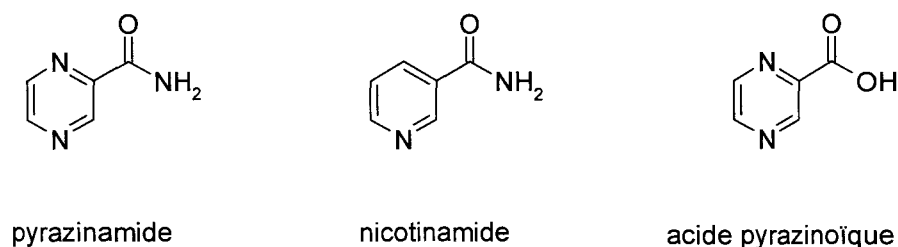


Figure 15 : Structures du nicotinamide, du pyrazinamide et de l'acide pyrazinoïque

En 1945, Chlorine a observé que la vitamine B3 (ou nicotinamide) possédait une activité inhibitrice de *M. tuberculosis*⁴⁹. A partir de cette découverte, de nombreux analogues furent synthétisés dans le but d'augmenter cette activité⁵⁰. Parmi eux, le pyrazinamide (PZA) s'est

⁴⁸ McClure, W. R.; Cech, C. L. *J Biol Chem* **1978**, 253, 8949-56.

⁴⁹ Chorine V. *Comp Rend Acad Sci (Paris)* **1945**, 220, 150-1.

⁵⁰ Kushner, S.; Dalalian, H.; Sanjurjo, J. L.; Bach, F. L.; Safir, S. R.; Smith, V. K.; Williams, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3617-21.

révéler être un analogue très actif sur modèle murin (Figure 15)⁵¹. Il est intéressant de remarquer que l'isoniazide et l'éthionamide ont également été découverts par cette démarche^{52,53}.

Le pyrazinamide est un composé atypique qui, à la différence des autres antibiotiques, montre une activité supérieure sur les bactéries qui ne sont pas en croissance. Son activité est spécifique des bacilles quiescents intramacrophagiques. Ce composé doit d'abord être activé par une nicotinaminidase/pyrazinamidase (PZase), codée par le gène *pncA*, afin de former l'espèce réellement active : l'acide pyrazinoïque (HPOA). Une fois formé, l'acide pyrazinoïque se déprotonne pour donner le pyrazinoate correspondant (POA⁻). *Mycobacterium tuberculosis* possédant un faible système d'efflux de l'espèce pyrazinoate, il va alors pouvoir la rejeter en dehors de la mycobactérie. A ce niveau, si le pH extracellulaire est acide, l'acide pyrazinoïque se reforme et devient ainsi capable de retraverser la membrane bactérienne. La diffusion de l'acide pyrazinoïque étant plus importante que l'efflux du pyrazinoate, le composé s'accumule au sein de la mycobactérie en provoquant une acidification intracellulaire (Figure 16).

Les conséquences de cette accumulation sont une diminution du potentiel membranaire qui entraîne une inhibition de la production d'ATP^{54,55}. Les bacilles quiescents n'étant pas aussi aptes à effluer le pyrazinoate, et possédant une réserve d'ATP plus faible, il est normal qu'ils soient les plus sensibles à ce composé.

Très récemment, Zimhony *et al* ont également mis en évidence l'action de l'acide pyrazinoïque sur la biosynthèse de l'acide palmitique⁵⁶. Le mode d'action du pyrazinamide nécessite encore des études complémentaires.

⁵¹ Zhang, Y.; Mitchison, D. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003**, *7*, 6-21.

⁵² Fox, H. H. *Science* **1952**, *116*, 129-34.

⁵³ Rist, N.; Grumbach, F.; Libermann, D. *Am Rev Tuberc* **1959**, *79*, 1-5.

⁵⁴ Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z. *J Antimicrob Chemother* **2003**, *52*, 790-5.

⁵⁵ Kaim, G.; Dimroth, P. *FEBS Letters* **1998**, *434*, 57-60.

⁵⁶ Zimhony, O.; Vilcheze, C.; Arai, M.; Welch, J. T.; Jacobs, W. R., Jr. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, 752-4.

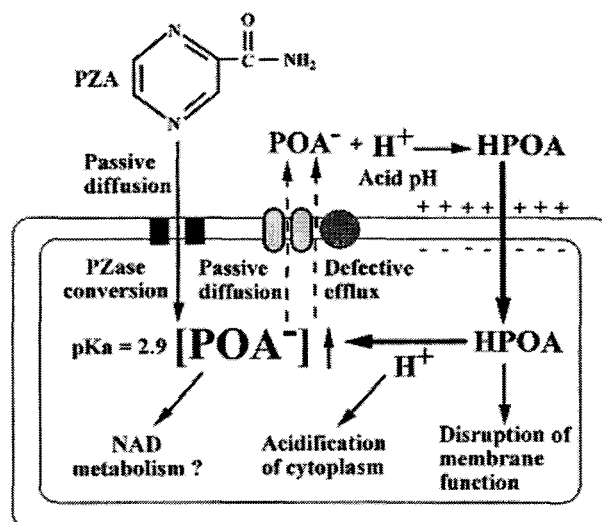


Figure 16 : Mode d'action du pyrazinamide selon Zhang *et al*⁵¹

De par son action particulière, le pyrazinamide a permis une réduction de la durée du traitement antituberculeux à six mois. Les principaux effets secondaires observables sont une toxicité hépatique dose dépendante (moindre que celle de l'isoniazide), des troubles digestifs et une hyperuricémie pouvant se compliquer par la survenue d'une crise de goutte.

4.3.1.4 L'éthambutol

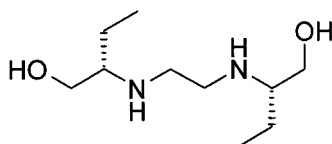


Figure 17 : Structure de l'éthambutol

L'éthambutol (EMB) (Figure 17) est un composé bactériostatique de type éthylènediamine, qui agit sur les bacilles intramacrophagiques et caverneux. Outre son utilisation dans le traitement de la tuberculose, il est également employé pour traiter les infections à *Mycobacterium avium* pouvant survenir chez les immunodéprimés. Il agit par inhibition de la protéine EmbB qui est une arabinosyltransférase impliquée dans la biosynthèse des ArabinoGalactanes et des LipoArabinoMannane^{57,58}, les deux principaux constituants de la

⁵⁷ Belanger, A. E.; Besra, G. S.; Ford, M. E.; Mikusova, K.; Belisle, J. T.; Brennan, P. J.; Inamine, J. M. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, *93*, 11919-24.

⁵⁸ Lety, M. A.; Nair, S.; Berche, P.; Escuyer, V. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, *41*, 2629-33.

paroi mycobactérienne. Récemment, Sharma *et al* ont démontré que l'opéron codant pour les gènes *embABC* était sous la dépendance du régulateur transcriptionnel EmbR et de la sérine/thréonine kinase PknH⁵⁹. Ces deux protéines sont donc suspectées être impliquées dans la résistance à l'EMB.

En thérapeutique, la principale complication de l'EMB est ophtalmologique avec la survenue de névrites optiques se caractérisant par une dyschromatopsie, une diminution de l'acuité visuelle et du champ de vision.

4.3.2 Traitement de la tuberculose : la stratégie DOTS

Afin de progresser dans la détection et le traitement de la tuberculose, l'OMS a défini au début des années 90 une stratégie internationale de lutte spécifique. Cette stratégie a été baptisée DOTS pour « Directly Observed Therapy – Short Course » soit « traitement de courte durée sous observance directe ».

Ce programme a été mis au point par le Docteur Kerel Styblo et repose sur cinq principes :

- engagement des pouvoirs publics en faveur de la lutte antituberculeuse
- dépistage par examen bactériologique et présence d'un réseau de laboratoires efficaces
- chimiothérapie de durée brève avec un soutien total du patient pendant la durée du traitement
- approvisionnement ininterrompu en médicaments de qualité
- mise en place d'un système d'enregistrement et de notification pour permettre l'évaluation des résultats du traitement et des programmes

⁵⁹ Sharma, K.; Gupta, M.; Pathak, M.; Gupta, N.; Koul, A.; Sarangi, S.; Baweja, R.; Singh, Y. *J Bacteriol* **2006**, *188*, 2936-44.

Le but du programme DOTS est de prévenir l'apparition de résistances aux antituberculeux utilisés et de réduire l'importance de la maladie au sein d'une population donnée. Afin d'y parvenir, l'accessibilité à ce programme est primordiale, notamment dans les pays où les infrastructures de santé doivent être organisées. Aujourd'hui 155 pays ont mis en place le programme DOTS, ce qui couvre environ 60 % de la population mondiale. Les taux de guérison observés sont deux à trois fois supérieurs à ceux des autres pays, avec trois fois moins de pharmacorésistances.

En terme de traitement, le programme DOTS repose sur l'utilisation d'une polychimiothérapie pendant une durée de plusieurs mois. Les quatre antituberculeux majeurs décrits précédemment sont utilisés en polychimiothérapie pendant plusieurs mois. Deux objectifs sont envisagés par cette stratégie : d'une part obtenir la guérison en limitant le risque de récurrences, d'autre part limiter la sélection de mutants résistants. Le schéma thérapeutique utilisé actuellement consiste en six mois de traitement : les deux premiers mois par une polychimiothérapie intense avec la prise d'isoniazide, de rifampicine, de pyrazinamide et d'éthambutol, les quatre mois suivants se limitant à la prise d'isoniazide et de rifampicine.

Il y a encore quelques années, un autre schéma thérapeutique en neuf mois était utilisé pour le traitement. Ce schéma a pour particularité de ne pas utiliser le pyrazinamide et il est encore indiqué dans les cas de contre-indications à ce composé (insuffisance hépatique, hyperuricémie). Les trois premiers mois de traitement consistent en la prise d'isoniazide, de rifampicine et d'éthambutol, et uniquement d'isoniazide et de rifampicine les six mois suivants.

Il est à noter qu'un bilan médical doit impérativement être réalisé avant la mise en route du traitement. Les examens à réaliser sont : un bilan ophtalmique, un hémogramme, un bilan hépatique, ainsi que le dosage de la créatinine et de l'uricémie. Il est également capital de bien informer les patients des effets indésirables pouvant survenir, afin d'éviter tout arrêt intempestif du traitement. Lors de ce dernier, une surveillance clinique et radiologique des patients doit être réalisée afin de s'assurer de la disparition du bacille en culture. Pour ce qui est de la tolérance au traitement, une surveillance hépatique hebdomadaire doit être réalisée au cours du premier mois. Le rythme de cette surveillance est discutable au-delà, bien que des analyses mensuelles soient préconisées par certains.

En ce qui concerne le traitement de la tuberculose infection, les politiques sont variables suivant les pays. Les mesures préconisées sont fonction de l'épidémiologie tuberculeuse de la population et du niveau de développement du pays. En France, la tuberculose infection était traitée uniquement chez l'enfant jusqu'en mars 2003. A partir de cette date, le conseil supérieur d'hygiène publique de France a préconisé le traitement supplémentaire de toute tuberculose infection récente chez l'adulte, et également un traitement en cas d'immunodépression. Les deux schémas thérapeutiques envisageables sont, soit l'utilisation de l'isoniazide en monothérapie pendant neuf mois, soit l'utilisation de l'isoniazide et de la rifampicine pendant trois mois. La surveillance du traitement est conduite comme pour un traitement antituberculeux classique.

4.3.3 Les antituberculeux de seconde intention

Les antituberculeux utilisés en seconde intention sont des antibiotiques possédant un rapport bénéfices / risques moins important. Leur utilisation est préconisée en addition des antituberculeux de première ligne dans le cas d'infection par des souches de *M. tuberculosis* multirésistantes, ou chez des patients atteints du VIH.

4.3.3.1 Les fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont une classe d'antibactériens qui ciblent les topoisomérases-ATP-dépendantes de type II et IV. Leur utilisation provoque l'inhibition de la réplication d'un large spectre de germes, dont notamment *M. tuberculosis* qui ne possède qu'une topoisomérase de type II : la DNA gyrase⁶⁰. Les mécanismes de résistances aux fluoroquinolones sont liés à la présence de mutations au niveau des gènes codant pour les deux sous-unités de cette gyrase, *gyrA* et *gyrB*⁶¹.

⁶⁰ Aubry, A.; Pan, X. S.; Fisher, L. M.; Jarlier, V.; Cambau, E. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, *48*, 1281-8.

⁶¹ Takiff, H. E.; Salazar, L.; Guerrero, C.; Philipp, W.; Huang, W. M.; Kreiswirth, B.; Cole, S. T.; Jacobs, W. R., Jr.; Telenti, A. *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, *38*, 773-80.

Historiquement, la découverte de la première quinolone fut accidentelle, puisque due à une impureté chimique présente lors de la synthèse de la chloroquine⁶². Cette observation permit d'aboutir à l'acide nalidixique, qui fut la première quinolone commercialisée (Figure 18).

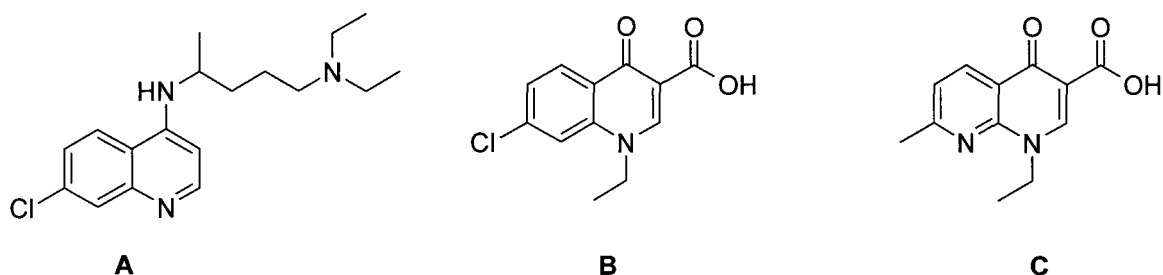


Figure 18 : Structures de la chloroquine (A), de l'impureté présente lors de sa synthèse (B) et de l'acide nalidixique (C)

Par la suite, diverses optimisations de ce composé ont permis de découvrir la première génération de fluoroquinolones avec la norfloxacine (Figure 19)⁶³, puis la seconde génération avec la ciprofloxacine et l'ofloxacine⁶⁴ et enfin la troisième génération avec la gatifloxacine et la moxifloxacine (Figure 20)⁶⁵.

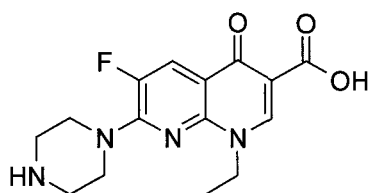


Figure 19 : Structure de la norfloxacine

Les composés utilisés en thérapeutique dans le traitement des souches multirésistantes de *M. tuberculosis* sont la ciprofloxacine et l'ofloxacine⁶⁶. La moxifloxacine a également montré

⁶² Lesher, G. Y.; Froelich, E. J.; Gruett, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R. P. *J Med Pharm Chem* **1962**, *91*, 1063-5.

⁶³ Koga, H.; Itoh, A.; Murayama, S.; Suzue, S.; Irikura, T. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 1358-63.

⁶⁴ Sato, K.; Matsuura, Y.; Inoue, M.; Une, T.; Osada, Y.; Ogawa, H.; Mitsuhashi, S. *Antimicrob Agents Chemother* **1982**, *22*, 548-53.

⁶⁵ Mitscher, L. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 559-92.

⁶⁶ Maher, D. Chaleet, P., Spinaci, S, Harries, A. *Le traitement de la tuberculose. Principes à l'attention des programmes nationaux WHO* **1997**

des effets très intéressants *in vitro*, chez l'animal et chez des patients^{60,67}. Une combinaison de la gatifloxacin avec la rifampicine, l'isoniazide et le pyrazinamide est actuellement développée par Bristol-Myers Squibb et en cours d'essai clinique de phase III.

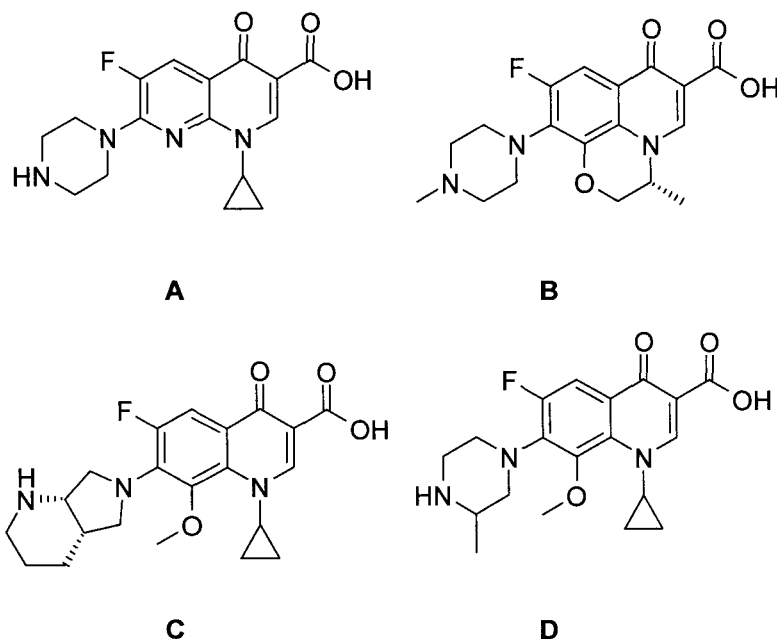


Figure 20 : Structures de la ciprofloxacin (A), de l'ofloxacin (B) de la moxifloxacin (C) et de la gatifloxacin (D)

4.3.3.2 La streptomycine

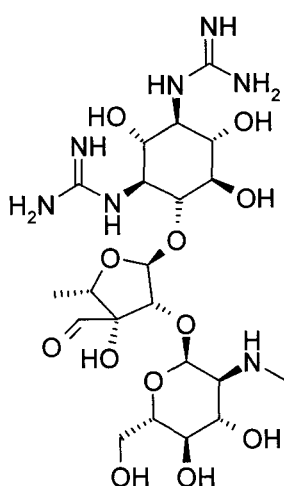


Figure 21 : Structure de la streptomycine

⁶⁷ Pletz, M. W.; De Roux, A.; Roth, A.; Neumann, K. H.; Mauch, H.; Lode, H. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48, 780-2.

La streptomycine (Figure 21) a été isolée pour la première fois à partir de cultures de *Streptomyces griseus*. Elle appartient à la classe des aminoglycosides, dans laquelle se trouvent également la kanamycine et l'amikacine. Son activité est liée à l'inhibition de la synthèse protéique par interaction au niveau de l'ARNr 16S et de la protéine S12⁶⁸ de la sous unité ribosomale 30S.

Elle fut longtemps utilisée en première intention dans le traitement de la tuberculose. En dépit de son activité, ses très fortes toxicités rénales et auditives, ainsi que son administration par voie parentérale font qu'elle n'est plus employée qu'en cas de résistance à la rifampicine ou en cas d'atteinte de la fonction hépatique. Des phénomènes de résistances croisées à l'ensemble des aminoglycosides sont susceptibles de survenir en cas d'utilisation⁶⁹. Des mutations au niveau des gènes *rpsL* et *rrs*, codant respectivement pour la protéine ribosomale S12 et l'ARNr 16S, ont été décrites comme étant liées à ce phénomène⁷⁰.

Son élimination est exclusivement rénale. Il est recommandé d'effectuer une surveillance rénale et auditive durant le traitement.

⁶⁸ Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, *407*, 340-8.

⁶⁹ Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Shinnick, T. M. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49*, 3192-7.

⁷⁰ Sreevatsan, S.; Pan, X.; Stockbauer, K. E.; Williams, D. L.; Kreiswirth, B. N.; Musser, J. M. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**, *40*, 1024-6.

4.3.3.3 La rifapentine et la rifabutine

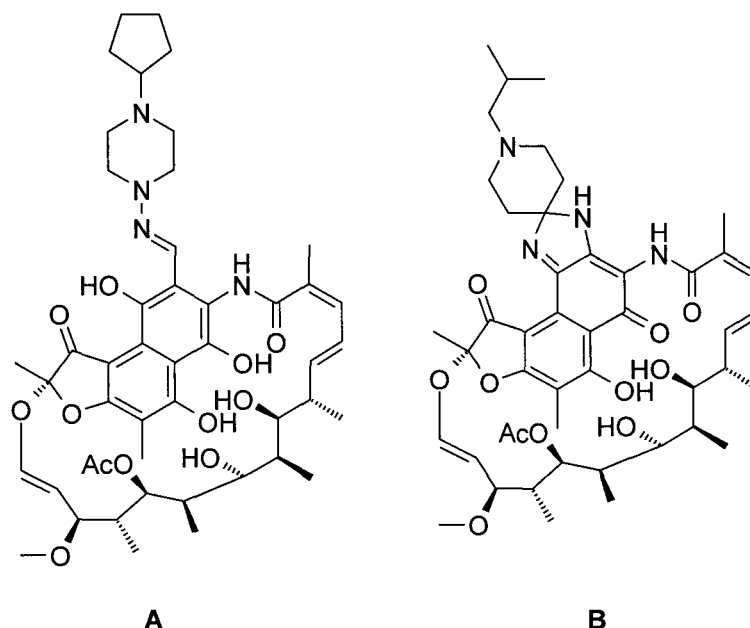


Figure 22 : Structure de la rifapentine (A) et de la rifabutine (B)

La rifapentine et la rifabutine (figure 22) sont des analogues de la rifampicine et possèdent donc un mécanisme d'action similaire. Ces composés sont respectivement utilisés depuis 1998 et 2001 en remplacement de la rifampicine dans le traitement des mycobactéries résistantes à cette dernière. Leur prescription en première intention sur des souches sensibles est déconseillée, car elle n'apporte aucun bénéfice par rapport à la rifampicine⁷¹.

4.3.3.4 La D-cyclosérine

La D-cyclosérine (Figure 23) est un analogue structural de la D-alanine, isolée à partir de *Streptomyces orchidaceus*. Elle appartient à la famille des isoxazolidinones.

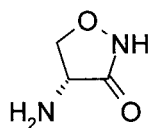


Figure 23 : Structure de la D-cyclosérine

⁷¹ Mukherjee, J. S.; Rich, M. L.; Socci, A. R.; Joseph, J. K.; Viru, F. A.; Shin, S. S.; Furin, J. J.; Becerra, M. C.; Barry, D. J.; Kim, J. Y.; Bayona, J.; Farmer, P.; Fawzi, M. C. S.; Seung, K. J. *The Lancet* **2004**, *363*, 474-81.

Son action bactériostatique intervient par inhibition de la D-alanine racémase et de la D-alanine: D-Alanine ligase, deux enzymes nécessaires à l'élaboration du mucopeptide de la paroi bactérienne^{72,73}. Elle provoque donc une inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne.

Malheureusement, son analogie structurale avec certains acides aminés neuro-exciteurs limite son utilisation à cause de sa forte toxicité sur le système nerveux central. Les effets indésirables les plus fréquents sont des troubles neuropsychiques (dépression ou euphorie), pouvant s'accompagner de somnolence, de vertiges, de myoclonie ou de crise convulsive. La récente publication de la structure radiocristallographique de la D-alanine racémase de *M. tuberculosis* pourrait permettre la découverte d'analogues structurellement différents de la D-cyclosérine⁷⁴.

4.3.3.5 L'acide *para*-aminosalicylique

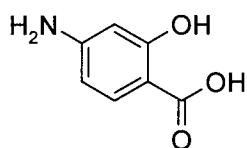


Figure 24 : Structure de l'acide *para*-aminosalicylique

L'acide *para*-aminosalicylique (PAS) (Figure 24) fut utilisé dans le traitement de la tuberculose dès les années 40⁷⁵. En raison de sa toxicité gastrointestinale, son utilisation fut ensuite limitée, avant de réapparaître dans le traitement des souches multirésistantes de *M. tuberculosis*. Malgré sa relative ancienneté, les mécanismes d'action de ce composé sont encore mal définis. Sa structure très proche de l'acide *para*-aminobenzoïque a fait suspecter

⁷² Caceres, N. E.; Harris, N. B.; Wellehan, J. F.; Feng, Z.; Kapur, V.; Barletta, R. G. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5046-55.

⁷³ Feng, Z.; Barletta, R. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 283-91.

⁷⁴ LeMagueres, P.; Im, H.; Ebalunode, J.; Strych, U.; Benedik, M. J.; Briggs, J. M.; Kohn, H.; Krause, K. L. *Biochemistry* **2005**, *44*, 1471-81.

⁷⁵ Lehmann, J. *The Lancet* **1946**, *247*, 15-6.

une action similaire à celle des sulfonamides, c'est-à-dire une inhibition de la dihydroptéroate synthase intervenant dans la synthèse de l'acide folique. Cela a été infirmé par la suite⁷⁶. Récemment, Rengarajan *et al* ont décrit l'implication de la thymidilate synthase, codée par le gène *thyA*, dans la résistance au PAS. Cela indiquerait que l'effet bactéricide soit dû à une inhibition de la synthèse de thymidine monophosphate (dTMP) et donc à une atteinte de la voie « folate »⁷⁷. Une interaction au niveau de l'assimilation du fer par la mycobactérie serait également mise en cause. Le PAS interférerait dans la conversion de l'acide salicylique en mycobactine, un sidérophore nécessaire au développement de la mycobactérie^{78,79}.

4.3.3.6 L'éthionamide et le prothionamide

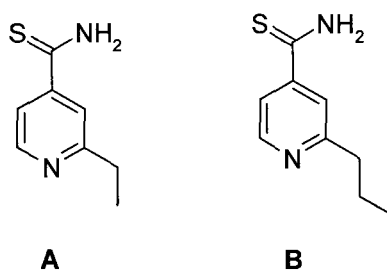


Figure 25 : Structures de l'éthionamide (A) et du prothionamide (B)

L'éthionamide (Figure 25) a été découvert en 1959 lors de la recherche d'analogues du nicotinamide⁵³. De façon comparable à l'isoniazide, ce thioamide est une pro-drogue qui nécessite d'être activée *in situ* pour exercer son activité inhibitrice sur l'énoyl-ACP réductase InhA. L'enzyme responsable de cette activation est la flavoprotéine monooxygénase EthA de *M. tuberculosis*^{80,81}. Une fois activés, ces composés vont réagir avec le NADH afin de former

⁷⁶ Nopponpunnth, V.; Sirawaraporn, W.; Greene, P. J.; Santi, D. V. *J Bacteriol* **1999**, *181*, 6814-21.

⁷⁷ Rengarajan, J.; Sasseti, C. M.; Naroditskaya, V.; Sloutsky, A.; Bloom, B. R.; Rubin, E. J. *Molecular Microbiology* **2004**, *53*, 275-82.

⁷⁸ Adilakshmi, T.; Ayling, P. D.; Ratledge, C. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 264-71.

⁷⁹ Ratledge, C. *Tuberculosis* **2004**, *84*, 110-30.

⁸⁰ Vannelli, T. A.; Dykman, A.; Ortiz de Montellano, P. R. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 12824-9.

⁸¹ Fraaije, M. W.; Kamerbeek, N. M.; Heidekamp, A. J.; Fortin, R.; Janssen, D. B. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 3354-60.

l'espèce qui va interagir avec InhA et exercer l'effet antituberculeux⁸². Le mécanisme de régulation de la production de EthA a récemment été décrit comme étant lié à la présence du répresseur transcriptionnel EthR. Ce dernier diminue la production de EthA et donc l'activation de ces composés^{83,84}. Le travail relaté dans ce mémoire consistant en la découverte de ligand de la protéine EthR, l'ensemble des mécanismes d'activation et de régulation de l'éthionamide est détaillé en fin de chapitre.

Les inconvénients majeurs de ces produits sont les troubles digestifs occasionnés et notamment leur toxicité hépatique importante aux doses thérapeutiques utilisées. Leur utilisation est donc limitée uniquement au traitement des souches multirésistantes de *M. tuberculosis*.

4.3.3.7 Le thiacétazone

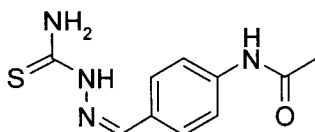


Figure 26 : Structure du thiacétazone

Le thiacétazone (Figure 26) est une thio-urée utilisée en seconde intention dans le traitement de souches multirésistantes de *M. tuberculosis*. Son analogie structurale avec l'éthionamide explique également son activation par la flavoprotéine monooxygénase EthA pour donner les métabolites sulfinique et carbodiimide (Figure 27)⁸⁵. Ce dernier est particulièrement intéressant, puisque c'est un électrophile susceptible de réagir covalamment avec les cystéines des différentes protéines du bacille. Cette observation pourrait être une explication du mode d'action du thiacétazone et de ses effets délétères sur la mycobactérie.

⁸² Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R., Jr.; Sacchetti, J. C. *J Exp Med* **2007**, *204*, 73-8.

⁸³ Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R. A.; Brennan, P. J.; Locht, C.; Besra, G. S. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 28326-31.

⁸⁴ DeBarber, A. E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L. G.; Barry, C. E., 3rd *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 9677-82.

⁸⁵ Qian, L.; OrtizdeMontellano, P. R. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 443-9.

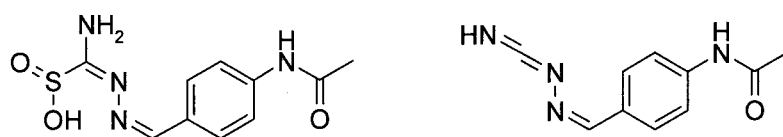


Figure 27 : Formes activées du thiacétazone selon Qian *et al*⁸⁵

4.3.3.8 L'isoxyl / thiocarlide

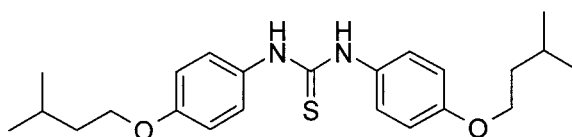


Figure 28 : Structure de l'isoxyl

L'isoxyl (Figure 28) est une autre thiourée qui a été utilisée en clinique il y a quelques années. Ce composé a longtemps été associé à l'éthionamide et au thiacétazone en raison de leur forte analogie structurale et de leurs résistances croisées observables. Récemment, il a été démontré que l'isoxyl interagit avec la $\Delta 9$ -désaturase DesA3 qui intervient dans la synthèse des acides oléiques⁸⁶. Malgré cette découverte, il est possible qu'une seconde cible soit impliquée ou que l'isoxyl soit également une pro-drogue activée *in situ* (notamment par EthA). Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'acide sterculique, un inhibiteur connu des $\Delta 9$ -désaturases, n'a pas d'effet observable sur la synthèse des acides gras à longue chaîne⁸⁷. Une étude récente des analogues de l'isoxyl tend cependant à indiquer l'existence de plusieurs cibles pour les composés de cette classe⁸⁸.

4.3.4 Conclusion sur l'arsenal thérapeutique existant

Les composés utilisés actuellement en thérapeutique ont permis une forte réduction de la contagiosité et du nombre de décès liés à la tuberculose. Malheureusement, la recrudescence de la pathologie observée actuellement est en partie due à l'apparition de souches résistantes aux principaux antituberculeux. Ces derniers devant être utilisés pendant une longue durée, la

⁸⁶ Phetsuksiri, B.; Jackson, M.; Scherman, H.; McNeil, M.; Besra, G. S.; Baulard, A. R.; Slayden, R. A.; DeBarber, A. E.; Barry, C. E., 3rd; Baird, M. S.; Crick, D. C.; Brennan, P. J. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 53123-30.

⁸⁷ Jeffcoat, R.; Pollard, M. R. *Lipids* **1977**, *12*, 480-5.

⁸⁸ Bhowruth, V.; Brown, A. K.; Reynolds, R. C.; Coxon, G. D.; Mackay, S. P.; Minnikin, D. E.; Besra, G. S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 4743-7.

tolérance au traitement peut être mauvaise et l'augmentation des doses, afin d'accroître leur efficacité, est parfois difficilement supportable par le patient. Parallèlement, les composés utilisés en seconde intention possèdent également une toxicité importante, ce qui rend leur utilisation difficilement tolérable sur le long terme.

La découverte de nouveaux antituberculeux actifs sur des souches multirésistantes de *Mycobacterium tuberculosis* est donc devenue une priorité en terme de santé publique. Cette approche est envisageable :

- soit par l'optimisation de composés déjà existants
- soit par la découverte de composés interagissant avec de nouvelles cibles
- soit par l'amélioration de l'efficacité de traitements déjà existants

Actuellement, certains dérivés prometteurs sont en cours d'évaluation clinique. Néanmoins, la probabilité de voir un nouvel antituberculeux sur le marché avant 2010 est inférieure à 5 % (figure 29 gauche) et la recherche de nouvelles séries chimiques est une nécessité afin d'augmenter les chances de réussite⁸⁹. Glickman *et al* ont montré que le doublement du nombre de composés actuellement en essais précliniques et cliniques ne permettrait l'arrivée de nouvelles molécules que dans une dizaine d'années (figure 29 droite). La recherche de nouveaux antituberculeux demeure donc une nécessité sanitaire qui nécessite un partenariat entre les secteurs public et privé.

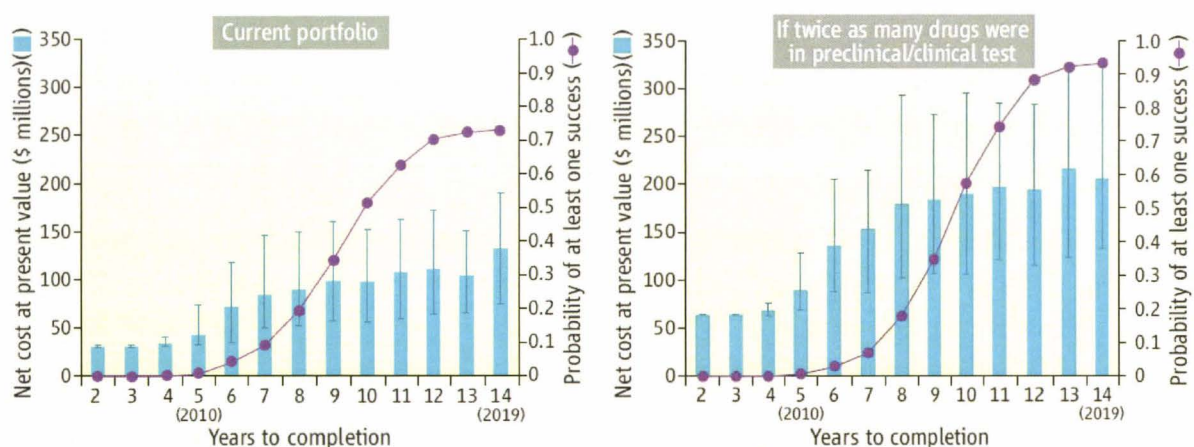


Figure 29 : Gauche : Simulation de l'évolution du portefeuille de la recherche d'antituberculeux et probabilité de succès selon Glickman *et al*⁸⁹

Droite : Simulation impliquant un doublement des composés en essais précliniques et cliniques.

⁸⁹ Glickman, S. W.; Rasiel, E. B.; Hamilton, C. D.; Kubataev, A.; Schulman, K. A. *Science* **2006**, *311*, 1246-7.

4.3.5 Les antituberculeux en cours de développement

4.3.5.1 Le composé R207910 / TMC207

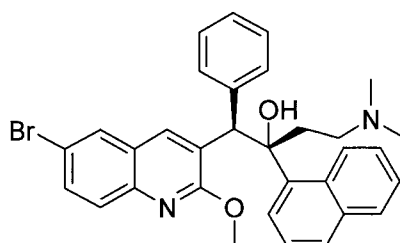


Figure 30 : Structure du composé R207910

Récemment, les effets thérapeutiques du composé R207910 (Figure 30), développé par Johnson et Johnson, ont été décrits chez la souris et chez des patients⁹⁰. Ce composé de structure diarylquinoline cible la sous-unité c (AtpE) de l'ATP synthase⁹¹ de *M. tuberculosis* et se révèle être un des composés les plus prometteurs dans la lutte contre la maladie dans les prochaines années. Il est actuellement en essai clinique de phase IIb.

4.3.5.2 Les composés PA-824 et OPC-67683

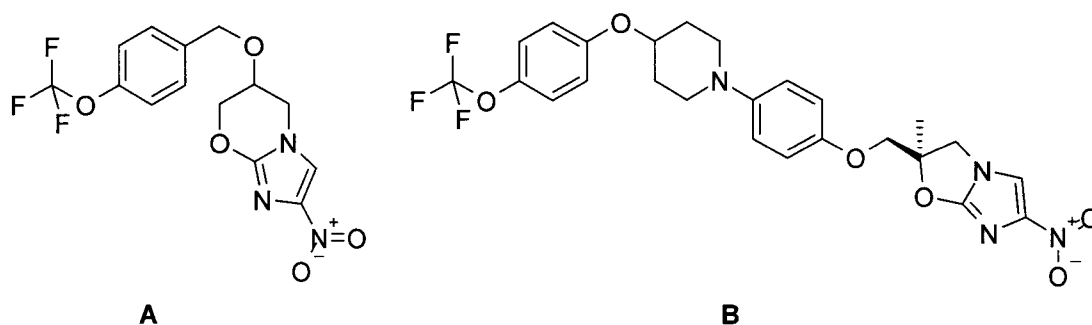


Figure 31 : Structures des composés PA-824 (A) et OPC-67683 (B)

⁹⁰ Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Gohlmann, H. W.; Neefs, J. M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; Williams, P.; de Chaffoy, D.; Huitric, E.; Hoffner, S.; Cambau, E.; Truffot-Pernot, C.; Lounis, N.; Jarlier, V. *Science* **2005**, *307*, 223-7.

⁹¹ Koul, A.; Dendouga, N.; Vergauwen, K.; Molenberghs, B.; Vranckx, L.; Willebrords, R.; Ristic, Z.; Lill, H.; Dorange, I.; Guillemont, J.; Bald, D.; Andries, K. *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 323-4.

Malgré leurs structures 4-nitroimidazooxazine et 2-nitroimidazooxazole, et leur analogie avec la classe des nitroimidazoles, le mécanisme d'action des composés PA-824 et OPC-67683 (Figure 31) n'est pas encore clairement défini. L'hypothèse d'une bioréduction par l'intermédiaire de la protéine F₄₂₀-glucose-6-phosphate déshydrogénase-dépendante et de la protéine Rv3547 a été émise uniquement pour le composé PA-824⁹². Cela serait cohérent avec l'inactivité de ce composé sur *M. leprae*, dépourvu de la protéine Rv3547⁹³. La perspective que les espèces réactives de ces composés aient de nombreuses cibles est également à envisager. Le dérivé OPC-67683 est développé par Otsuka Pharmaceutical et actuellement en essai clinique de phase II. Le composé PA-824 est développé par Novartis et se trouve en essai clinique de phase I depuis juin 2005.

4.3.5.3 Le rifamétane

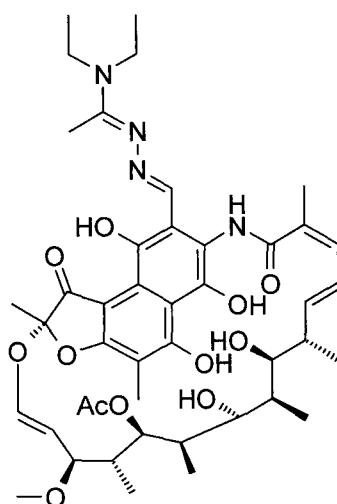


Figure 32 : Structure du rifamétane

Ce composé développé par SPA (Figure 32) est un analogue de la rifamycine actuellement en essais cliniques de phase II⁹⁴. Son mode d'action est similaire à celui de la rifamycine (inhibiteur d'ARN-polymérase-ADN-dépendante), mais son profil pharmacocinétique est plus favorable.

⁹² Manjunatha, U. H.; Boshoff, H.; Dowd, C. S.; Zhang, L.; Albert, T. J.; Norton, J. E.; Daniels, L.; Dick, T.; Pang, S. S.; Barry, C. E., 3rd *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 431-6.

⁹³ Manjunatha, U. H.; Lahiri, R.; Randhawa, B.; Dowd, C. S.; Krahenbuhl, J. L.; Barry, C. E., 3rd *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50*, 3350-4.

⁹⁴ Potkar, C.; Gogtay, N.; Gokhale, P.; Kshirsagar, N. A.; Ajay, S.; Cooverji, N. D.; Bruzzese, T. *Chemotherapy* **1999**, *45*, 147-53.

4.3.5.4 Le composé SQ109

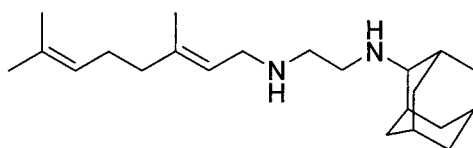


Figure 33 : Structure du composé SQ109

Le composé SQ109 (Figure 33) fait partie des nombreux analogues de l'éthambutol qui ont été synthétisés. Malgré la présence du motif éthylènediamine au sein de sa structure, il semblerait, qu'à la différence de l'éthambutol, le composé SQ109 n'intervienne pas au niveau de l'enveloppe bactérienne⁹⁵. Des études récentes montrent un effet synergique de ce composé en présence des antituberculeux principaux^{96,97}. Il est développé par la société Sequella et se trouve en essai clinique de phase I depuis septembre 2006.

4.3.5.5 Le *n*-octanesulphonylacétamide

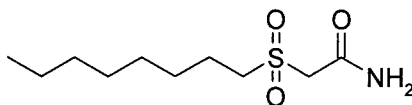


Figure 34 : Structure du *n*-octanesulphonylacétamide

Le *n*-octanesulphonylacétamide (OSA) composé (Figure 34) fut initialement synthétisé pour être un inhibiteur β -cétoacyl-ACP synthase comme la thiolactomycine^{98,99}. Le motif sulphonylacétamide était censé mimer l'état de transition lors de l'étape de condensation. Par la suite, il s'est avéré que le mode d'action de ce composé était différent de celui initialement

⁹⁵ Jia, L.; Coward, L.; Gorman, G. S.; Noker, P. E.; Tomaszewski, J. E. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, *315*, 905-11.

⁹⁶ Chen, P.; Gearhart, J.; Protopopova, M.; Einck, L.; Nacy, C. A. *J Antimicrob Chemother* **2006**, *58*, 332-7.

⁹⁷ Nikonenko, B. V.; Protopopova, M.; Samala, R.; Einck, L.; Nacy, C. A. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, 1563-5.

⁹⁸ Jones, P. B.; Parrish, N. M.; Houston, T. A.; Stapon, A.; Bansal, N. P.; Dick, J. D.; Townsend, C. A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3304-14.

⁹⁹ Parrish, N. M.; Houston, T.; Jones, P. B.; Townsend, C.; Dick, J. D. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45*, 1143-50.

prévu. Il se pourrait qu'il interagisse directement ou indirectement avec les ATP synthases ou d'autres composants de la chaîne respiratoire¹⁰⁰. En 2005, le composé FAS20013, développé par la société FASgen Inc, et possédant une structure proche de celle de l'OSA, était sur le point d'entrer en études cliniques.

4.3.5.6 Les oxazolidinones

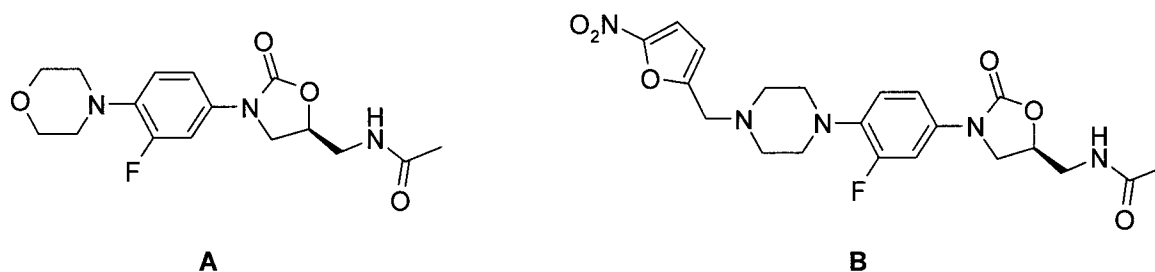


Figure 35 : Structure du linézolide (A) et du ranbézolide (B)

Les oxazolidinones sont une classe d'antibactériens entièrement nouveaux qui cible l'adénine 2602 de l'ARN ribosomique 30S¹⁰¹. Leur chef de file, le linézolide (Figure 35), s'est révélé avoir une activité antituberculeuse chez des souches multi-résistantes¹⁰². Malheureusement, ce composé provoque des effets secondaires incompatibles avec un traitement de longue durée (neuropathie)^{103,104}. En 2003, le développement du ranbézolide, un autre composé appartenant à la même classe et développé par les laboratoires Ranbaxy (Figure 35), a été stoppé en essais cliniques de phase I¹⁰⁵.

¹⁰⁰ Parrish, N. M.; Ko, C. G.; Hughes, M. A.; Townsend, C. A.; Dick, J. D. *J Antimicrob Chemother* **2004**, *54*, 722-9.

¹⁰¹ Colca, J. R.; McDonald, W. G.; Waldon, D. J.; Thomasco, L. M.; Gadwood, R. C.; Lund, E. T.; Cavey, G. S.; Mathews, W. R.; Adams, L. D.; Cecil, E. T.; Pearson, J. D.; Bock, J. H.; Mott, J. E.; Shinabarger, D. L.; Xiong, L.; Mankin, A. S. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 21972-9.

¹⁰² Erturan, Z.; Uzun, M. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2005**, *26*, 78-80.

¹⁰³ Fortun, J.; Martin-Davila, P.; Navas, E.; Perez-Elias, M. J.; Cobo, J.; Tato, M.; De la Pedrosa, E. G.; Gomez-Mampaso, E.; Moreno, S. *J Antimicrob Chemother* **2005**, *56*, 180-5.

¹⁰⁴ Von der Lippe, B.; Sandven, P.; Brubakk, O. *Journal of Infection* **2006**, *52*, 92-6.

¹⁰⁵ Das, B.; Rudra, S.; Yadav, A.; Ray, A.; Rao, A. V. S. R.; Srinivas, A. S. S. V.; Soni, A.; Saini, S.; Shukla, S.; Pandya, M.; Bhateja, P.; Malhotra, S.; Mathur, T.; Arora, S. K.; Rattan, A.; Mehta, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 4261-7.

4.4 Stratégie envisagée dans la découverte d'un nouvel antituberculeux

4.4.1 Opportunité stratégique : amélioration de traitements déjà existants

Devant la recrudescence observée, la découverte de nouveaux composés antituberculeux demeure une nécessité de santé publique. Les composés, dont le développement est le plus avancé, s'appuient, soit sur la détermination de nouvelles cibles thérapeutiques au sein de *Mycobacterium tuberculosis*, soit sur l'optimisation structurale de composés déjà utilisés en thérapeutique.

Une troisième approche basée sur l'étude des mécanismes biologiques des phénomènes de résistance et d'activation pourrait, à ce niveau, être également envisagée. La large utilisation en thérapeutique d'amoxicilline en présence d'un inhibiteur de β -lactamase dans le cas des infections bactériennes résistantes illustre parfaitement le succès de cette stratégie.

Dans le cas présent, l'hypersensibilisation de *Mycobacterium tuberculosis* à un antituberculeux existant permettrait de diminuer les doses thérapeutiques utilisables et d'en limiter les effets secondaires.

4.4.2 Pré-requis pour le succès d'un nouvel antituberculeux

Afin de garantir le succès d'un futur candidat médicament dans le traitement de la tuberculose, plusieurs facteurs doivent d'ores et déjà être pris en compte.

La grande imperméabilité de la paroi mycobactérienne constitue un obstacle majeur lors de l'utilisation de composés en thérapeutique. L'absence de modèle permettant la prédiction du comportement d'un dérivé à ce niveau implique donc la nécessité de tester précocement les composés d'intérêt sur *Mycobacterium tuberculosis*. Néanmoins, il est clair que pour faciliter la diffusion passive d'une molécule chimique à travers cette paroi hydrophobe, le développement de composés de bas poids moléculaire est préférable. Cela est confirmé par l'observation que trois des quatre antituberculeux majeurs possèdent un poids moléculaire inférieur ou égal à 204 g/mole.

Parallèlement, la propagation de l'épidémie dans les pays en voie de développement requiert une relative facilité dans le suivi du traitement, afin de favoriser une bonne observance. Le fait que la prise d'antituberculeux doive s'effectuer pendant une longue durée (plusieurs mois) renforce cette nécessité. L'ingestion par voie orale du médicament avec une prise unique

quotidienne est plus que souhaitable. Les caractéristiques pharmacocinétiques des composés doivent donc être définies très précocement dans le processus de recherche et développement. Enfin, la notion de coût est également importante, puisqu'un traitement trop cher ne pourrait pas être dispensé facilement dans les pays en voie de développement qui sont pourtant les plus touchés par l'épidémie.

4.4.3 Opportunité dans la mise en oeuvre : découverte des mécanismes d'activation et de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* à l'éthionamide

En 2000, l'équipe d'Alain Baulard à l'Institut de Biologie de Lille a mis en évidence, chez *M. tuberculosis*, la présence de deux protéines respectivement impliquées dans l'activation et la résistance à l'éthionamide. Par la suite, la structure radiocristallographique de cette dernière protéine a été déterminée par l'équipe de Vincent Villeret¹⁰⁶. L'établissement d'une collaboration entre biologistes, structuralistes et chimistes était donc naturellement envisageable, afin de découvrir des composés susceptibles d'hypersensibiliser la mycobactérie à l'éthionamide. Le travail réalisé s'appuie sur l'ensemble des découvertes fondamentales réalisées au sein de ces équipes de recherche lors des dernières années.

5 Activation de l'éthionamide chez *M. tuberculosis* et mécanismes de régulation

5.1 Mécanismes d'activation de l'éthionamide

L'éthionamide est un antituberculeux utilisé en seconde intention dans le traitement des souches multirésistantes de *Mycobacterium tuberculosis*. En raison de sa découverte lors de la synthèse d'analogue du nicotinamide, son mécanisme d'action fut pendant longtemps supposé similaire à celui de l'isoniazide. Par la suite, le parallèle entre ces deux antituberculeux fut bien établi, notamment à cause de leur cible thérapeutique commune : l'énoyl-ACP réductase InhA³⁸. Néanmoins, la présence d'une large majorité de souches résistantes à l'isoniazide et

¹⁰⁶ Frenois, F.; Engohang-Ndong, J.; Loch, C.; Baulard, A. R.; Villeret, V. *Molecular Cell* **2004**, *16*, 301-7.

encore sensibles à l'éthionamide, a poussé certaines équipes à étudier les mécanismes d'activation de ce dernier¹⁰⁷.

5.1.1 Découverte du gène *Rv3854c* et de la protéine EthA

L'éthionamide est une pro-drogue qui empêche la biosynthèse des acides mycoliques par inhibition de l'énoyl-ACP réductase InhA du complexe FAS-II de divers *Mycobacterium*. De façon à pouvoir exercer son action antituberculeuse, ce composé nécessite une activation par une enzyme de la mycobactérie. C'est en 2000 que Baulard *et al* et DeBarber *et al* ont déterminé l'importance du gène *Rv3854c* (ou *ethA*) dans l'activation de l'éthionamide^{83,84}. Des souches recombinantes de *M. smegmatis* surexprimant ce gène se sont révélées être particulièrement sensibles à l'antituberculeux (avec des CMI inférieures à 1µg/mL contre 15 µg/mL chez les souches sauvages). Inversement, certaines souches cliniques de *M. tuberculosis* résistantes à l'éthionamide ont présenté des mutations sur ce gène. Cette résistance pourrait s'expliquer par la production d'une protéine non fonctionnelle incapable d'activer l'éthionamide.

La séquence du gène *Rv3854c* présente une forte homologie avec celles de diverses monooxygénases¹⁰⁸. En 2002, Vannelli *et al* ont pu purifier et étudier la protéine EthA produite par ce gène⁸⁰. EthA est une enzyme de 55 kDa fortement présente au niveau de la paroi mycobactérienne et appartenant à la classe des flavoprotéines monooxygénases. Elle possède une seule molécule de FAD au sein de sa structure comme groupement prosthétique, et sait utiliser uniquement le NADPH.

5.1.2 Substrats et rôle physiologique de EthA

Parallèlement à l'étude de l'activation de l'éthionamide (Cf. Chapitre 1 – 4.3.3.6), Fraaije *et al*⁸¹ ont décrit la capacité de EthA à transformer les fonctions cétones de certaines molécules

¹⁰⁷ Morlock, G. P.; Metchock, B.; Sikes, D.; Crawford, J. T.; Cooksey, R. C. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, *47*, 3799-805.

¹⁰⁸ Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. *Nature* **1998**, *393*, 537-44.

organiques en esters ou en lactones par une réaction de type Baeyer-Villiger. Le rôle physiologique de EthA au sein de la mycobactérie, ainsi que la nature de son substrat, restent cependant encore à déterminer. Sa conservation au sein du génome réduit de *M. leprae* aurait tendance à démontrer qu'elle exerce un rôle important. L'hypothèse qu'elle soit impliquée dans le métabolisme des acides mycoliques a été émise et serait cohérente avec sa localisation membranaire.

5.1.3 Caractérisation des formes actives de l'éthionamide

L'action de EthA sur l'éthionamide (**1**) a permis de mettre en évidence la formation initiale de l'espèce *S*-oxyde (**2**). Cette dernière subirait à nouveau l'action de l'enzyme pour donner les espèces nitrile (**3**), puis carboxamide (**4**) et alcool primaire (**5**) correspondantes (Figure 36)⁸⁰. Préalablement, DeBarber *et al* avaient déjà décrit la formation de ces espèces au sein de *M. tuberculosis* (Schéma 6), et relié leur apparition au degré d'expression de EthA par utilisation d'éthionamide marqué au ¹⁴C⁸⁴.

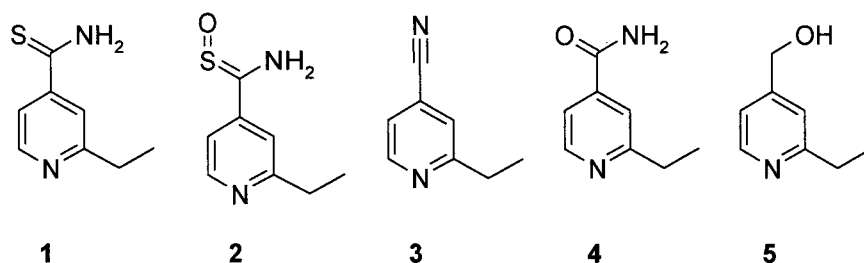


Figure 36 : Éthionamide (**1**) et analogues détectés lors des diverses études

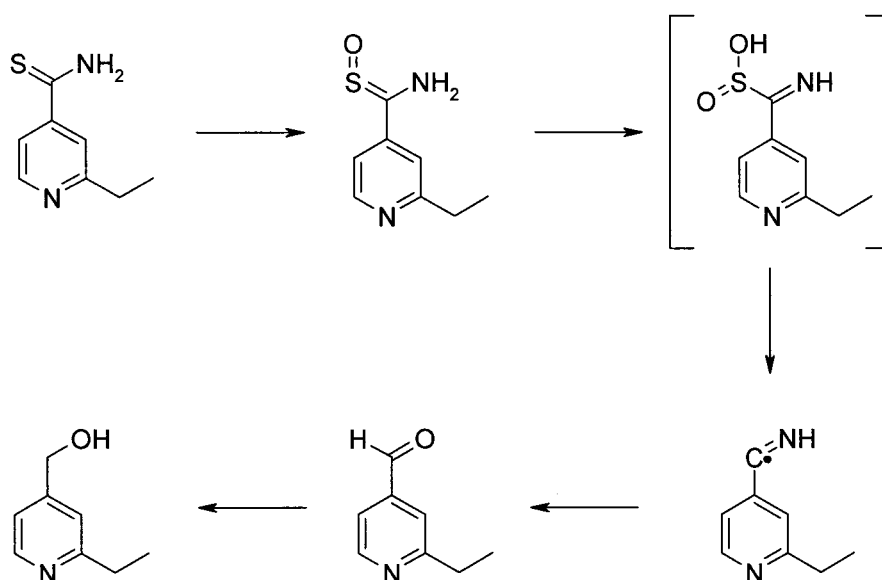


Schéma 6: Mécanisme d'activation de l'éthionamide proposé par DeBarber *et al*⁸⁴

Plus récemment, l'utilisation de la RMN HRMAS par Hanouille *et al* comme technique de détection non invasive, a permis la mise en évidence d'une forme activée unique de l'éthionamide au sein de *M. smegmatis*¹⁰⁹. Cette espèce (ETH*), dont la structure n'est toujours pas définie, est cependant différente de celles qui avaient été décrites par DeBarber et Vanelli^{80,84}.

Les dérivés précédemment indiqués ne seraient, en fait, que des produits de dégradation de l'espèce activée. Ils se seraient formés postérieurement, lors des méthodes d'identification utilisées (CCM et HPLC). Néanmoins, la RMN HRMAS a permis de mettre en évidence l'apparition des analogues *S*-oxyde (**2**), puis alcool (**5**), uniquement dans le milieu extracellulaire. Cette observation, associée au fait que l'éthionamide (**1**) est absent au sein de la mycobactérie, a fait émettre à Hanouille *et al* un modèle pour l'internalisation et l'accumulation de l'éthionamide et de ses dérivés (Figure 37)¹¹⁰.

¹⁰⁹ Hanouille, X.; Wieruszkeski, J.-M.; Rousselot-Pailley, P.; Landrieu, I.; Baulard, A. R.; Lippens, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *331*, 452-8.

¹¹⁰ Hanouille, X.; Wieruszkeski, J. M.; Rousselot-Pailley, P.; Landrieu, I.; Loch, C.; Lippens, G.; Baulard, A. R. *J Antimicrob Chemother* **2006**, *58*, 768-72.

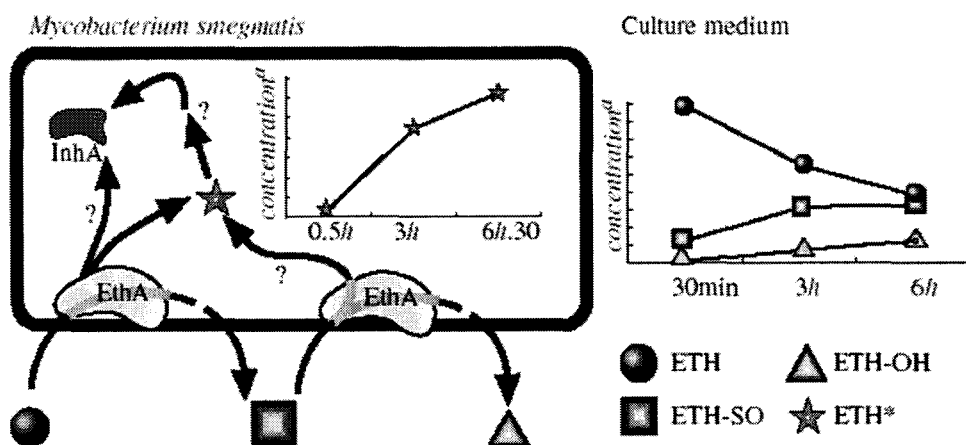


Figure 37 : Modèle pour l'internalisation et l'accumulation de l'éthionamide et de ses dérivés selon Hanouille *et al*¹¹⁰

Dans ce modèle, l'éthionamide est activé par EthA au niveau de la membrane de la mycobactérie, pour donner, soit le métabolite actif (ETH*) qui est internalisé, soit l'analogue *S*-oxyde (2) qui est rejeté dans le milieu de culture. Ce dernier pourrait à nouveau subir l'action de EthA pour donner le dérivé alcool (5), lui aussi présent uniquement au niveau extracellulaire.

Très récemment, Wang *et al* ont montré que l'espèce ETH* n'interagissait pas directement avec la protéine InhA⁸². De façon comparable à l'isoniazide, la formation d'un adduit éthionamide ou prothionamide sur le NAD a été décrite (cf. chapitre 1 – 4.3.3.6). Les espèces actives formées à partir de l'isoniazide (A), de l'éthionamide (B) et du prothionamide (C), sont donc finalement extrêmement proches en terme de structure et interagissent de façon très similaire avec le site actif de InhA (Figures 38 et 39). Néanmoins, cette observation indique également que la recherche d'analogues de ces espèces est peu envisageable en raison de leur profil très peu « drug like ». En effet, la présence de groupements phosphates chargés négativement laisse prévoir une biodisponibilité très réduite et extrêmement pénalisante face à l'épaisse paroi hydrophobe de la mycobactérie. La recherche d'autres familles de composés capables de cibler directement InhA pourrait cependant être une perspective intéressante.

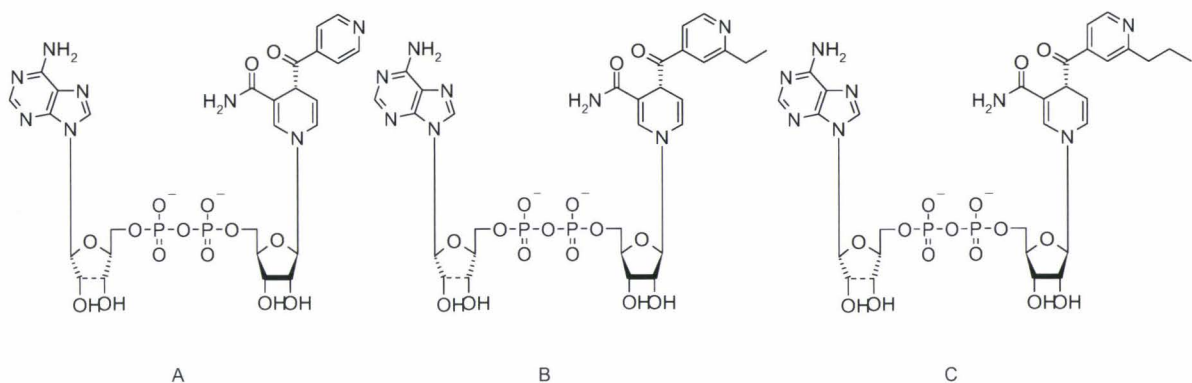


Figure 38 : Structures des composés inhibiteurs d’InhA formés à partir de l’isoniazide (A), de l’éthionamide (B) et du prothionamide (C)

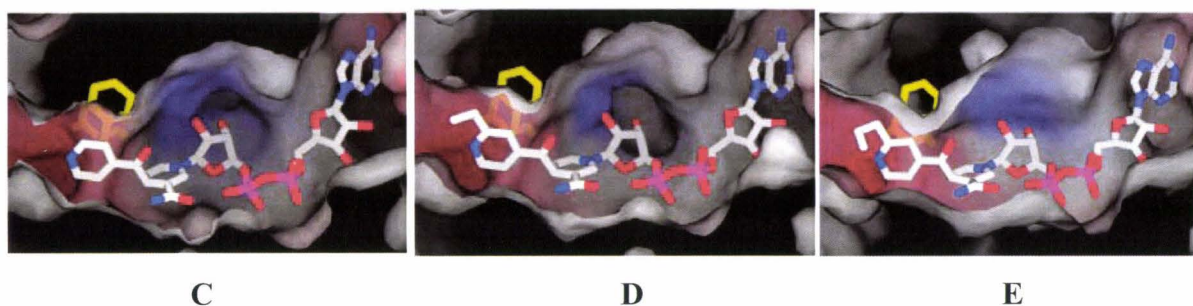


Figure 39 : Site actif de la protéine InhA de *M. tuberculosis* lié au INH-NAD (C), ETH-NAD (D), PTH-NAD (E) par Wang *et al*⁸²

L’activité de EthA n’est cependant pas spécifique de l’éthionamide et du prothionamide. D’autres thiocarboxamides subissent des modifications structurales en présence de cette enzyme⁸⁴. Récemment, Qian *et al* ont démontré que le thiacétazone, un autre antituberculeux de seconde intention (cf. chapitre 1-4.3.3.7), était lui aussi activé par EthA⁸⁵.

5.2 Régulation de l’activation de l’éthionamide

5.2.1 Implication du gène *ethR*

La découverte du gène *ethA*, impliqué dans l’activation de l’éthionamide, fut simultanée à celle d’un autre gène distant de seulement 76 paires de bases : le gène *Rv3855* ou *ethR*. Il s’est avéré que la surexpression de ce gène chez *M. bovis*, *smegmatis* et *tuberculosis* a toujours induit une résistance à cet antituberculeux dans des cultures *in vitro*. Ceci est la preuve formelle que *ethR* est directement impliqué dans les mécanismes de résistance à l’éthionamide^{83,84}. Il est également intéressant de noter qu’en l’absence d’éthionamide, ces souches surexprimant *ethR* ne présentent pas de modification au niveau de la synthèse des

acides mycoliques. Cela indique qu'*ethR* n'est pas impliqué directement dans ce processus, mais doit plutôt jouer un rôle de régulation.

La séquence de *ethR* montre beaucoup d'homologie avec celles des gènes codant pour les répresseurs transcriptionnels de la famille TetR/CamR¹¹¹. Par la suite, il s'est avéré que ce gène code bien pour un répresseur transcriptionnel qui inhibe la transcription de *ethA* et donc, par la même occasion, la production de EthA et l'activation de l'éthionamide.

5.2.2 Les répresseurs transcriptionnels de la famille TetR/CamR

Les régulateurs transcriptionnels jouent un rôle très important dans les phénomènes d'adaptation et dans les changements environnementaux. Leur fonction est d'activer ou de réprimer la transcription de certains gènes selon les stimuli extérieurs^{112,113}.

La famille TetR des répresseurs transcriptionnels tient son nom de la protéine du même nom. Aujourd'hui, les structures radiocristallographiques de quatre protéines appartenant à cette famille ont été déterminées : TetR, QacR, CprB et EthR. Leurs analogies aux niveaux structural et opérationnel sont flagrantes et sont également source d'information pour la compréhension des mécanismes de répression mis en jeu. De façon générale, ces protéines sont des homodimères, dont chaque monomère est constitué de neuf à dix hélices α (figure 40). Ces dernières délimitent un domaine de liaison à l'ADN, ainsi qu'un site de liaison à un ligand. La structure tertiaire utilisée par ces protéines pour se lier à l'ADN est un motif « helix-turn-helix » ou HTH toujours formé par les hélices $\alpha 1$ à $\alpha 3$. TetR et QacR ayant été extrêmement étudiées, l'étude bibliographique de leur rôle physiologique est intéressante pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu.

¹¹¹ Aramaki, H.; Yagi, N.; Suzuki, M. *Protein Eng* **1995**, *8*, 1259-66.

¹¹² Grkovic, S.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *Semin Cell Dev Biol* **2001**, *12*, 225-37.

¹¹³ Ramos, J. L.; Martinez-Bueno, M.; Molina-Henares, A. J.; Teran, W.; Watanabe, K.; Zhang, X.; Gallegos, M. T.; Brennan, R.; Tobes, R. *Microbiol Mol Biol Rev* **2005**, *69*, 326-56.

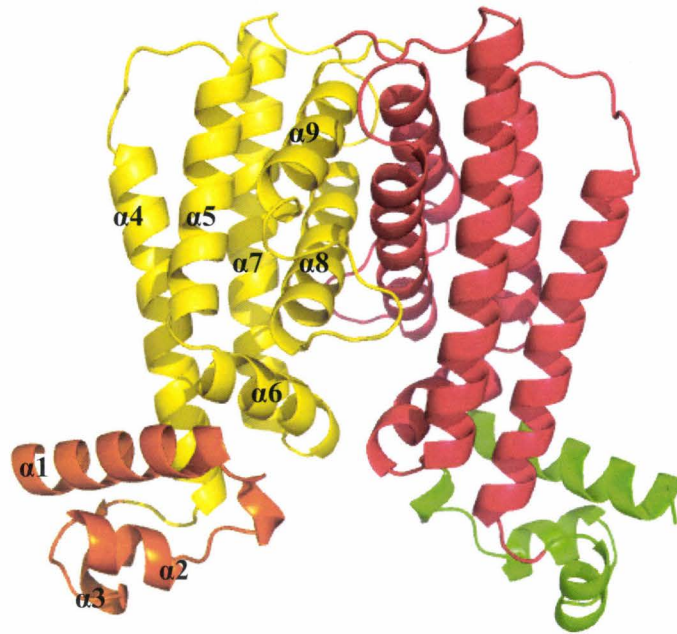


Figure 40 : Homodimère de la protéine EthR de *M. tuberculosis*. Domaines HTH en orange et vert.
Domaines de liaisons à un ligand en jaune et rouge.

5.2.2.1 TetR

TetR est un répresseur transcriptionnel qui empêche la transcription du gène *tetA* et donc la production de TetA. Cette protéine est membranaire et exporte les tétracyclines, complexées avec du magnésium, dans le milieu extracellulaire¹¹⁴. Il convient de noter que les gènes *tetR* et *tetA* sont adjacents et orientés de façon divergente. Leurs opérateurs sont identiques et séparés par seulement 11 paires de bases. En l'absence d'antibiotique, TetR interagit avec chacun d'entre eux et empêche donc sa propre transcription, ainsi que celle de *tetA*. La protéine d'efflux n'est donc pas exprimée. En présence de tétracycline, cette dernière va interagir avec TetR qui va alors devenir incapable de se lier à l'ADN. *tetA* va donc être transcrit et TetA exprimée. L'antibiotique va alors pouvoir être rejeté dans le milieu extracellulaire et la bactérie survivre.

¹¹⁴ Hillen, W.; Berens, C. *Annu Rev Microbiol* **1994**, *48*, 345-69.

Les structures radiocristallographiques de TetR seule¹¹⁵, liée à l'opérateur¹¹⁶ ou interagissant avec le complexe [tétracycline-magnésium] [TcMg]^{+115,117,118}, ont été étudiées afin de comprendre les mécanismes mis en jeu. Les deux domaines HTH d'un homodimère interagissent avec les séquences palindromiques du promoteur de *tetA*, et permettent donc la fixation de la protéine au niveau des grands sillons de l'ADN (Figure 41). Dans cette conformation, la gêne stérique provoquée par la formation de ce complexe empêche la transcription du gène *tetA*.

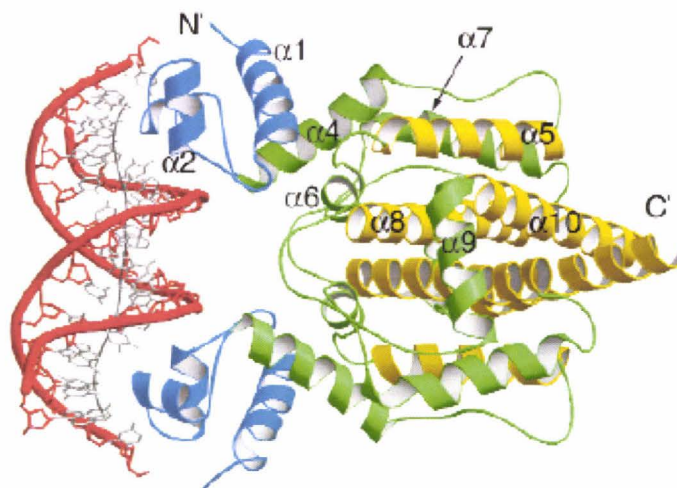


Figure 41 : Interaction d'un homodimère de TetR sur l'opérateur du gène TetA

En présence de tétracycline, un complexe [tétracycline-magnésium] [TcMg]⁺ se forme et interagit avec TetR au niveau du domaine d'interaction avec un ligand. La distance entre les hélices $\alpha 3$ des deux domaines HTH est donc augmentée de 36.6 à 39.9 Å (figure 42). La distance entre les grands sillons de l'ADN étant de 34 Å, TetR est désormais incapable de se lier au promoteur de *tetA* et d'exercer sa fonction de répresseur. Récemment, Kamionka *et al* ont démontré la nécessité de ligander les deux monomères de TetR pour pouvoir empêcher l'interaction protéine-ADN¹¹⁹.

¹¹⁵ Orth, P.; Cordes, F.; Schnappinger, D.; Hillen, W.; Saenger, W.; Hinrichs, W. *Journal of Molecular Biology* **1998**, 279, 439-47.

¹¹⁶ Orth, P.; Schnappinger, D.; Hillen, W.; Saenger, W.; Hinrichs, W. *Nat Struct Biol* **2000**, 7, 215-9.

¹¹⁷ Hinrichs, W.; Kisker, C.; Duvel, M.; Muller, A.; Tovar, K.; Hillen, W.; Saenger, W. *Science* **1994**, 264, 418-20.

¹¹⁸ Orth, P.; Saenger, W.; Hinrichs, W. *Biochemistry* **1999**, 38, 191-8.

¹¹⁹ Kamionka, A.; Majewski, M.; Roth, K.; Bertram, R.; Kraft, C.; Hillen, W. *Nucl. Acids Res.* **2006**, 34, 3834-41.

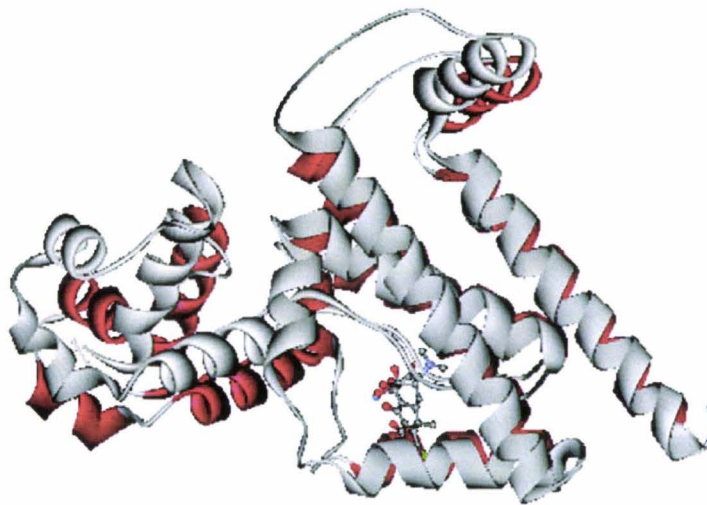


Figure 42 : Superposition d'un monomère de TetR sans (gris) et en présence (rouge) du complexe [Tc-Mg]⁺

5.2.2.2 QacR

Le répresseur transcriptionnel QacR est impliqué dans la résistance de certaines bactéries à différents antiseptiques cationiques lipophiles comme les ammoniums quaternaires (Quaternary Ammonium Compounds, d'où le nom Qac)^{120,121}. QacR joue son rôle de répresseur en empêchant la transcription du gène *qacA*. Ce gène code pour la protéine membranaire QacA de la super famille MFS (Major Facilitator Superfamily). Cette protéine exerce un rôle de pompe à efflux responsable des mécanismes de résistances à divers composés antiseptiques^{122,123}. De façon similaire à TetR, les gènes *qacA* et *qacR* sont adjacents et orientés de façon divergente. La présence de certains ligands (comme par exemple la Rhodamine 6G), provoque un changement conformationnel de QacR avec une augmentation de la distance entre les hélices $\alpha 3$ des deux domaines HTH de 37 à 48 Å. QacR devient alors incapable de jouer son rôle de répresseur et QacA est produite pour effluer l'agent bactéricide.

¹²⁰ Mitchell, B. A.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, *42*, 475-7.

¹²¹ Mitchell, B. A.; Paulsen, I. T.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 3541-8.

¹²² Paulsen, I. T.; Brown, M. H.; Littlejohn, T. G.; Mitchell, B. A.; Skurray, R. A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 3630-5.

¹²³ Paulsen, I. T.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *Microbiol Rev* **1996**, *60*, 575-608.

Ces observations montrent bien les similarités existantes entre TetR et QacR. Néanmoins, QacR se différencie de TetR en plusieurs points.

La première différence importante est que deux dimères de QacR interagissent avec l'opérateur palindromique de *qacA* pour empêcher l'action de l'ARN polymérase (Figure 43)^{124,125}. Cette différence peut s'expliquer par la distance importante de 37 Å entre les deux domaines HTH du répresseur, contre une distance de 34 Å entre deux grands sillons de l'ADN. La fixation du premier dimère provoque un réarrangement de l'ADN favorisant ainsi la fixation du second dimère en vis-à-vis du premier. Le mode de liaison de ce répresseur est donc dit coopératif. Il faut également signaler qu'il n'existe aucune interaction protéine-protéine entre les deux dimères de QacR¹²⁶.

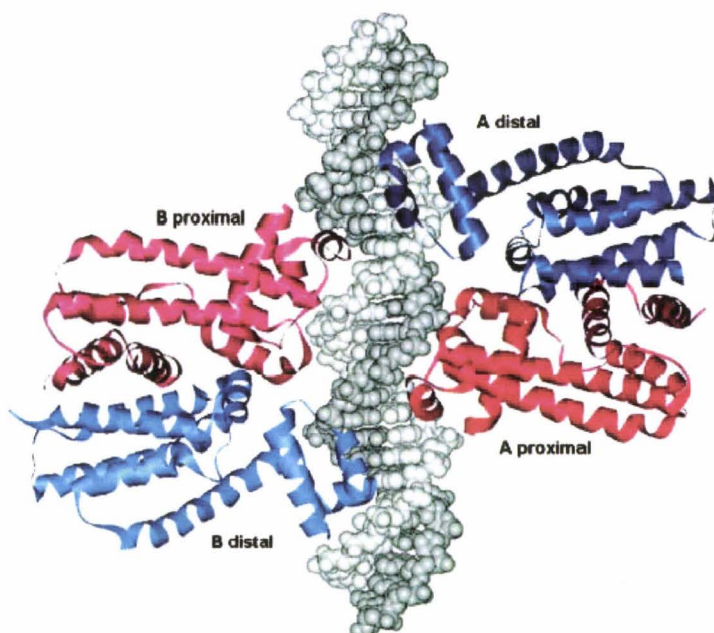


Figure 43 : Interaction de deux homodimères de QacR sur l'opérateur du gène *QacA*

¹²⁴ Grkovic, S.; Brown, M. H.; Schumacher, M. A.; Brennan, R. G.; Skurray, R. A. *J Bacteriol* **2001**, *183*, 7102-9.

¹²⁵ Schumacher, M. A.; Brennan, R. G. *Molecular Microbiology* **2002**, *45*, 885-93.

¹²⁶ Schumacher, M. A.; Miller, M. C.; Grkovic, S.; Brown, M. H.; Skurray, R. A.; Brennan, R. G. *Embo J* **2002**, *21*, 1210-8.

La seconde différence est que QacR n'est pas capable de réguler sa propre transcription. En effet, il n'y a aucune interaction spécifique entre le répresseur transcriptionnel et l'opérateur de son propre gène¹²⁷.

La troisième différence importante vient du fait que l'interaction de QacR avec ses différents ligands décrits ne s'effectue que dans un seul de ses deux monomères. Il est également intéressant de noter que différents domaines de liaison au sein de la poche sont utilisés en fonction du ligand^{128,129,130}.

5.2.3 La protéine EthR de *Mycobacterium tuberculosis*

5.2.3.1 Etude des structures radiocristallographiques de la protéine

En 2004, deux équipes ont indépendamment décrit la structure radiocristallographique de la protéine EthR de *M. tuberculosis* ligandée^{106,131}. De façon comparable aux autres membres décrits de la famille TetR, EthR est un homodimère possédant neuf hélices α constitutives de deux domaines pour chaque monomère. Le domaine de liaison à l'ADN est toujours constitué par les hélices $\alpha 1$ à $\alpha 3$ formant un motif HTH par $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Le domaine de régulation, servant à la dimérisation et à l'interaction avec un ligand, est formé par les hélices $\alpha 4$ à $\alpha 9$. La dimérisation est assurée par l'implication des hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$ de chaque monomère dans une interaction de type hélice-hélice (Figure 44).

¹²⁷ Grkovic, S.; Brown, M. H.; Roberts, N. J.; Paulsen, I. T.; Skurray, R. A. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 18665-73.

¹²⁸ Schumacher, M. A.; Miller, M. C.; Grkovic, S.; Brown, M. H.; Skurray, R. A.; Brennan, R. G. *Science* **2001**, *294*, 2158-63.

¹²⁹ Grkovic, S.; Hardie, K. M.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *Biochemistry* **2003**, *42*, 15226-36.

¹³⁰ Murray, D. S.; Schumacher, M. A.; Brennan, R. G. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 14365-71.

¹³¹ Dover, L. G.; Corsino, P. E.; Daniels, I. R.; Cocklin, S. L.; Tatituri, V.; Besra, G. S.; Futterer, K. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *340*, 1095-1105.

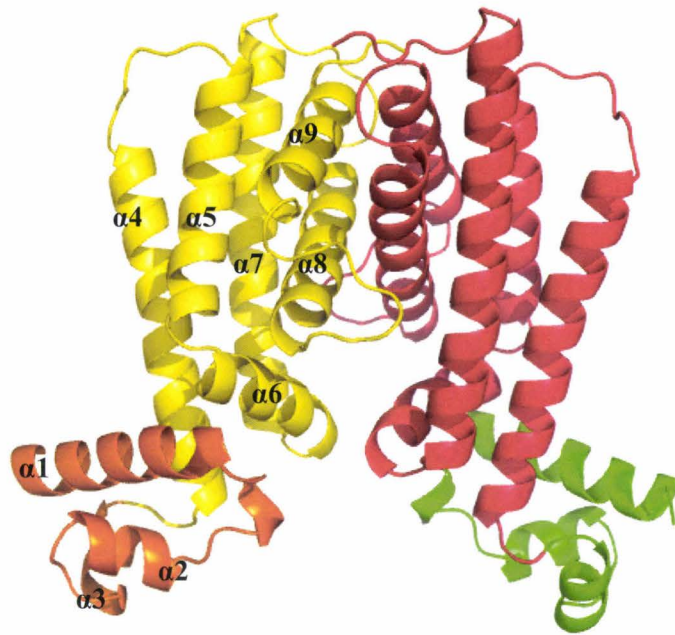


Figure 44 : Homodimère de la protéine EthR de *M. tuberculosis*. Domaines HTH en orange et vert.
Domaines de liaisons à un ligand en jaune et rouge.

5.2.3.1.1 Etude du domaine de régulation

Les acides aminés constitutifs du domaine de régulation sont, dans la très grande majorité, apolaires et forment un tunnel long hydrophobe de 20 Å. Seuls les Asn-176 et 179, la Tyr-148, la Thr-149, le Glu-180 et la Gln-125 sont susceptibles de mettre en jeu des interactions polaires de type liaison hydrogène au sein de ce domaine (Figure 45).

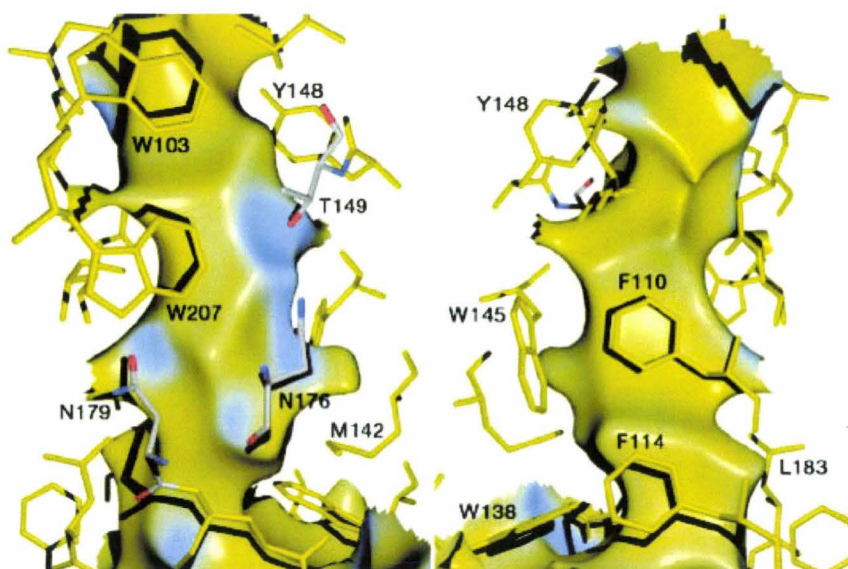


Figure 45 : Environnement des résidus du domaine de régulation de EthR
Surfaces hydrophiles en bleu et surfaces hydrophobes en doré

La comparaison de EthR avec les autres membres de la famille TetR montre une très faible conservation de la séquence protéique au niveau du domaine de régulation. Cette différence dans la nature des résidus constitutifs du domaine de régulation empêche l'utilisation des ligands connus de TetR ou de QacR pour déduire un modèle de composé susceptible d'interagir avec EthR. De plus, à la différence de QacR, EthR ne semble posséder qu'un site unique de liaison à un ligand (cf. section suivante).

5.2.3.1.2 Etude des interactions ligands fortuits/protéine

5.2.3.1.2.1 Interactions entre EthR et l'octanoate d'héxadécyle (structure 1U9N)

La structure décrite par Frénois *et al* a montré la présence d'un ligand fortuit au sein de chaque monomère de la protéine¹⁰⁶. L'extraction des cristaux par du chloroforme, l'analyse GC-MS de cet extrait et la comparaison avec le spectre de masse du composé resynthétisé ont permis l'identification de l'octanoate d'héxadécyle (HexOc) (Figure 46).

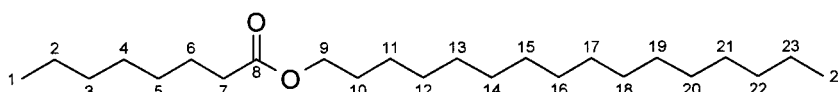


Figure 46 : Structure de l'octanoate d'héxadécyle. Numérotation arbitraire des carbonés.

Les acides aminés hydrophobes effectuant des interactions de type Van der Waals avec l'HexOc appartiennent aux diverses hélices α du domaine de régulation (Figure 47). La courbure prise par le ligand au niveau de ses carbonés C6 à C15 est liée au contournement du Trp-138. L'Asn-179 interagit avec une molécule d'eau.

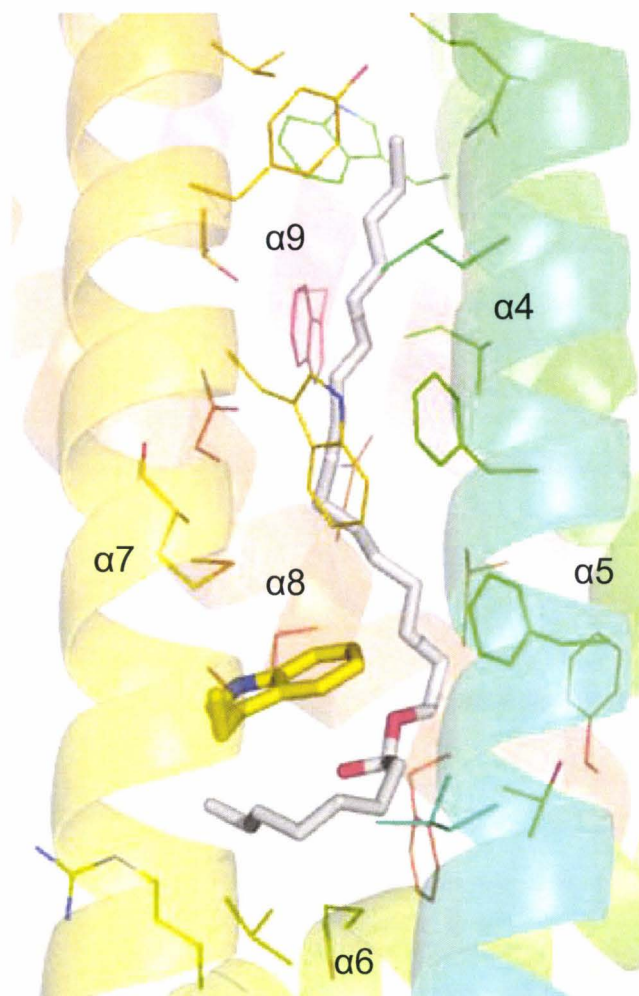


Figure 47 : Visualisation de l'HexOc (blanc) au sein du domaine de liaison à un ligand de EthR.
Représentation des résidus présents à moins de 5 Å du ligand. Trp-138 en bâtonnet

Les interactions de ce composé au sein du domaine de régulation sont principalement de nature hydrophobe. Si l'on numérote les carbones de 1 à 24 (figure 46), trois parties du ligand peuvent être distinguées :

- la partie allant de C1 à C6 qui suit linéairement l'hélice α_6 (Figure 48)

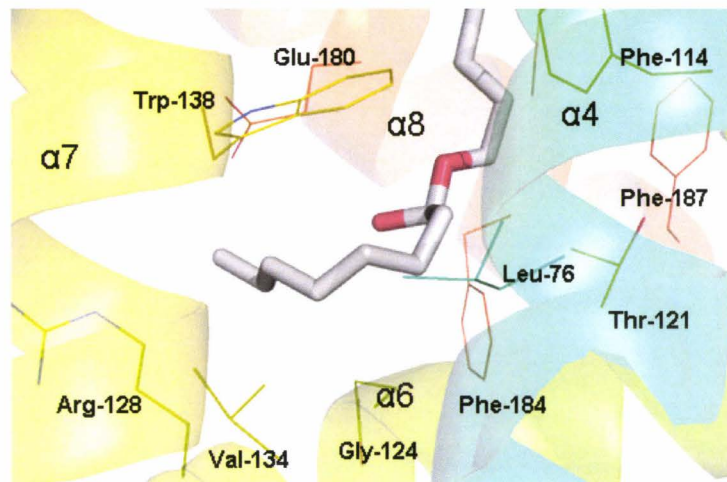


Figure 48 : Visualisation de la partie C1-C6 de l'HexOc (blanc) au sein du domaine de liaison à un ligand de EthR

- la partie allant de C6 à C15 qui contourne le Trp-138 (Figure 49)

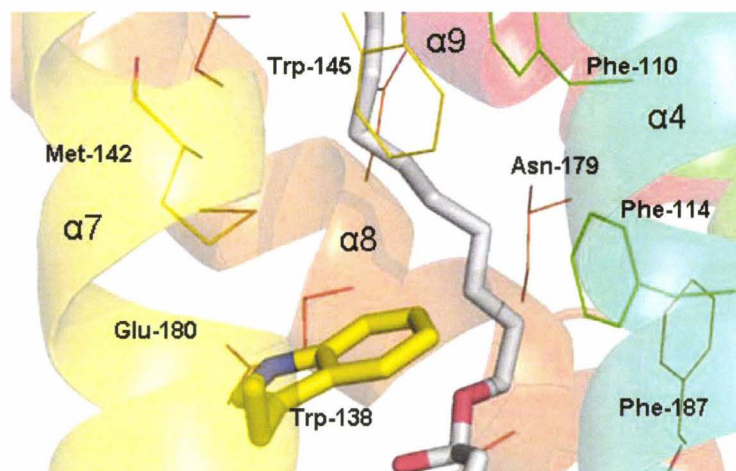


Figure 49 : Visualisation de la partie C6-C15 de l'HexOc (blanc) au sein du domaine de liaison à un ligand de EthR. W138 représenté en bâtonnet

- la partie allant de C15 à C24 qui suit linéairement les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 7$ (Figure 50)

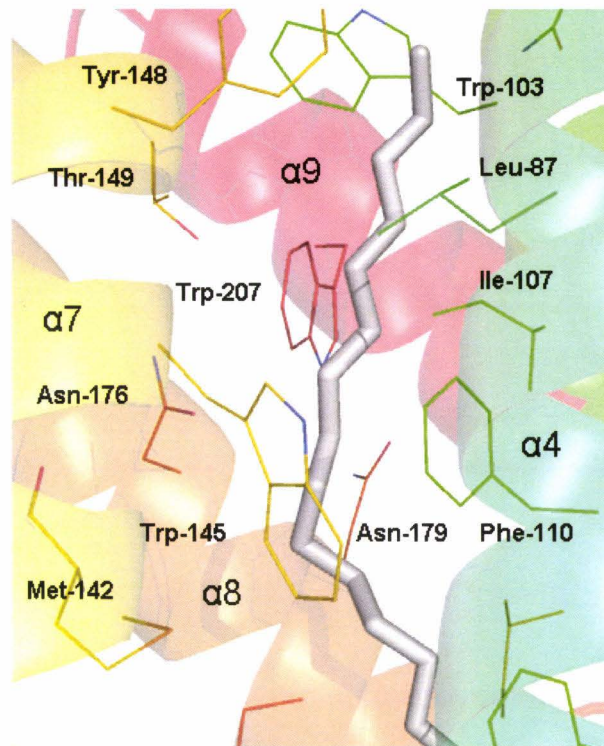


Figure 50 : Visualisation de la partie C15-C24 de l'HexOc (blanc) au sein du domaine de liaison à un ligand de EthR

Dans cette conformation, la distance observée entre les deux hélices $\alpha 3$ de chaque domaine HTH est de 52 Å entre les carbones α des deux Phe-63. Le changement conformationnel de EthR en présence de l'HexOc est donc encore plus important que celui observé pour QacR ligandé (48 Å). Il est donc impossible que la protéine puisse exercer son rôle de répresseur, la distance entre deux grands sillons d'ADN étant de 34 Å. Néanmoins, le parallèle entre QacR et EthR permet de mettre en évidence des différences dans les changements conformationnels observés. Seul un des monomères de QacR interagit avec un ligand pour provoquer une augmentation de la distance $\alpha 3$ - $\alpha 3'$, alors que les deux domaines de EthR sont ligandés (Figure 51).

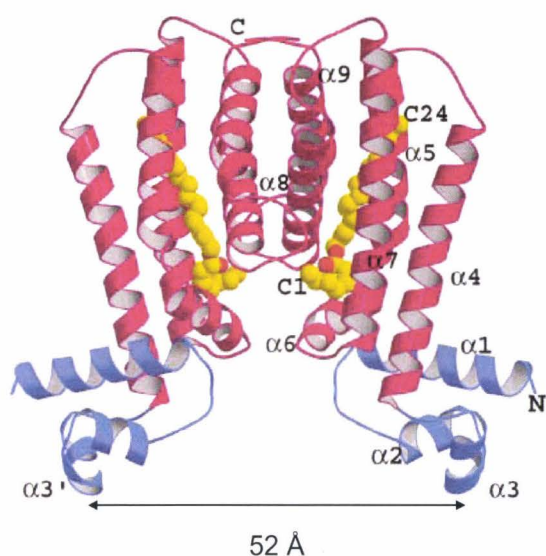


Figure 51 : Homodimère de la protéine EthR de *M. tuberculosis* en présence d'une molécule d'HexOc par monomère

5.2.3.1.2.2 Interactions entre EthR et le présumé 1,4-dioxane (structure 1T56)

Parallèlement à ce travail, une autre structure radiocristallographique de la protéine fut étudiée par Dover *et al*¹³¹. La protéine fut décrite en présence de deux molécules cycliques supposées de 1,4-dioxane au sein de chaque monomère (Figure 52). La première molécule de 1,4-dioxane interagit avec les acides aminés Phe-110, Trp-145, Phe-184, Met-142 et Leu-183, la seconde molécule avec les résidus Trp-103, Ile-107, Thr-149, Trp-207. La Phe-184 est réorientée et referme le site de liaison à un ligand.

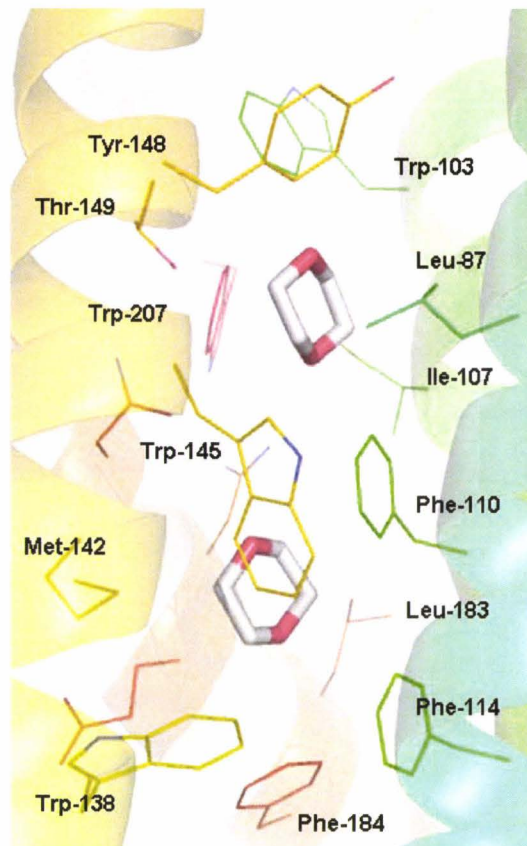


Figure 52 : Visualisation de la partie C1-C6 de l'HexOc (blanc) au sein du domaine de liaison à un ligand de EthR

Dans cette conformation, la distance séparant les deux domaines HTH est de 48 Å, ce qui est toujours incompatible avec une interaction protéine/ADN¹³². Cette observation pourrait signifier que le mouvement de la Phe-184 serait susceptible d'amplifier le changement de conformation de quelques angstroms, mais ne serait pas forcément indispensable pour que ce dernier se produise.

Il est actuellement difficile d'étudier plus finement les réorganisations induites par un ligand au sein de la protéine, car aucune structure radiocristallographique de sa forme non ligandée (ou Apo) seule ou liée à l'ADN n'est décrite. Ces études ont néanmoins permis de montrer la présence d'un site de liaison unique (Figure 53) au sein du domaine de régulation de la protéine. De plus, la capacité d'une molécule à interagir avec EthR et à provoquer son induction, l'empêchant probablement de jouer son rôle de répresseur, a également été observée. Parallèlement à ces données radiocristallographiques, des études fonctionnelles de l'interaction d'EthR avec le promoteur du gène *ethA* ont été décrites.

¹³² Frenois, F.; Baulard, A. R.; Villeret, V. *Tuberculosis* **2006**, 86, 110-4.

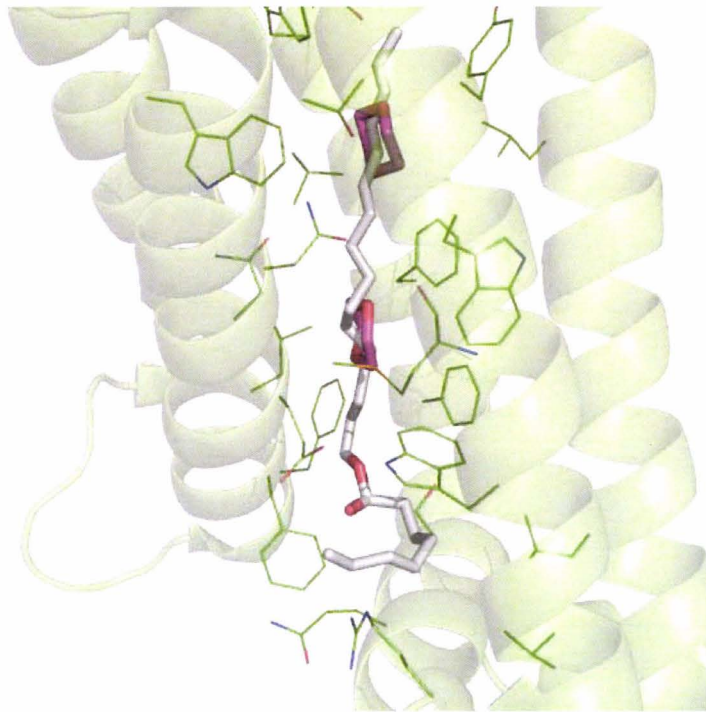


Figure 53 : Superposition de l'HexOc (blanc) et des deux molécules de présumé 1,4-dioxane (mauve) au sein du domaine de régulation de EthR

5.2.3.2 Etude de l'interaction EthR/promoteur *ethA* : étude de la zone intergénique *ethA-R*

La transfection du gène rapporteur *lacZ* sous la dépendance du promoteur du gène *ethA* au sein de *M. smegmatis* et *M. bovis* a donné des colonies de couleur bleue en présence de X-gal. Cela est révélateur de l'activité β -galactosidase liée à l'expression du gène *lacZ*. Lorsque ces mêmes souches sont transfectées par un plasmide exprimant le gène *ethR*, cette activité est fortement diminuée. La protéine EthR interagit donc bien avec le promoteur du gène *ethA* afin de réprimer sa transcription¹³³. Cela a été reconfirmé par des études de retard sur gel entre la protéine et la région intergénique *ethA-R* marquée au ³²P.

L'étude de la zone intergénique *ethA-R* a montré que ces deux gènes étaient séparés par seulement 75 pb. Des études de digestion de cette région par une DNase I en présence de EthR indiquent que le répresseur protège une zone longue de 55 pb comprenant la répétition de deux longues séquences de 15 pb, ainsi que le point de départ de la transcription du gène *ethA*. La longueur du promoteur est importante par rapport aux 15 et 28 pb qui constituent respectivement les promoteurs de *tetA* et *qacA*. Par la suite, des études par résonance plasmonique de surface (RPS) (Biacore®) ont permis de visualiser en temps réel les

¹³³ Engohang-Ndong, J.; Baillat, D.; Aumercier, M.; Bellefontaine, F.; Besra, G. S.; Loch, C.; Baulard, A. R. *Molecular Microbiology* **2004**, *51*, 175-88.

interactions spécifiques existantes entre EthR et cette zone du génome. La fixation coopérative de quatre dimères de EthR sur le promoteur de *ethA* a ainsi pu être mise en évidence. La comparaison avec TetR et QacR, où un et deux dimères se fixent respectivement sur leur promoteur, est intéressante et reste cohérente avec le nombre d'unités impliquées dans l'interaction. Un tel recouvrement de la région intergénique fait penser que EthR réprime également sa propre transcription, mais cela reste encore à démontrer.

6 Validation de EthR comme cible thérapeutique potentielle par analyse SWOT

Il était nécessaire avant d'engager le projet d'évaluer les forces et les faiblesses que possèdent EthR comme cible thérapeutique potentielle. Dans ce cadre, une analyse SWOT a été réalisée afin de préciser les opportunités et les menaces envisageables (tableau 1).

Domaines	Forces	Faiblesses	Opportunités	Menaces
Relation avec la pathologie	Mutant KO très sensible à l'éthionamide	Synergie envisageable uniquement	Portefeuille thérapeutique des antituberculeux limité	R207910 OPC-67683 PA-824 SQ109 OSA
Fonction	Connue (répresseur transcriptionnel)	Absence de ligand décrit	Bonne sélectivité envisageable avec protéines orthologues	
Criblage	Protéine facilement accessible	Mises au point à réaliser		
Nouveauté	Brevetée par l'IPL.			
Développabilité	Structure radiocristallographique déterminée Pharmacophore envisageable	Paroi mycobactérienne	Stratégie déjà utilisée chez l'Homme	

Tableau 1: Analyse SWOT réalisée sur la recherche d'antituberculeux ciblant la protéine EthR

Les études génétiques ont démontré l'implication de la protéine EthR dans le mécanisme de non-activation de l'éthionamide chez *Mycobacterium tuberculosis*. Le fait qu'un mutant *ethR* KO devienne hypersensible à l'antituberculeux en est la meilleure preuve^{83,84}. L'absence de répresseur transcriptionnel appartenant à la famille TetR chez l'Homme est également un

élément intéressant. Les risques d'interactions avec d'autres protéines partageant un fort degré d'homologie et pouvant ainsi être source d'effets indésirables devraient être limités.

L'établissement des structures radiocristallographiques a également montré que la présence d'un composé chimique au sein de la protéine était susceptible de l'empêcher de jouer son rôle de répresseur transcriptionnel¹³². Même si les molécules décrites ne possèdent pas des caractéristiques physico-chimiques permettant leur utilisation en thérapeutique, elles constituent des pistes de choix dans l'établissement d'un pharmacophore et la découverte de composés actifs. La détermination des résidus présents au sein du domaine de liaison montre également que des interactions à ce niveau peuvent être hydrophiles et/ou hydrophobes. Cet équilibre est de bon augure quant aux caractéristiques pharmacocinétiques que doit posséder tout candidat médicament. Une hydrophobie ou hydrophilie trop marquée serait néfaste à la dissolution ou à l'absorption des composés.

Ces résultats valident donc EthR comme cible thérapeutique éventuelle, dans l'optique de potentialiser l'action de l'éthionamide.

Malgré l'ensemble de ces observations encourageantes, il convient de rester attentif à l'environnement actuel dans la recherche de nouveaux antituberculeux. La stratégie envisagée ne permettrait pas la découverte d'un composé actif sur une cible inédite, mais uniquement de potentialiser un antituberculeux déjà existant. Cette stratégie a cependant largement fait ses preuves dans le domaine de l'infectiologie avec la large utilisation d'un inhibiteur de β -lactamase en présence d'amoxiciline. De plus, EthA apparaît de plus en plus comme étant impliquée dans l'activation *in situ* d'autres composés antituberculeux, ce qui laisse envisager des perspectives thérapeutiques intéressantes. Même si certains composés en cours d'études cliniques semblent très prometteurs (Cf. chapitre 1 - 4.3.5), la pénurie de traitement actuelle laisse énormément de possibilités et indique que le traitement de la tuberculose est un créneau peu concurrentiel.

Le travail relaté dans ce mémoire décrit les différentes avancées réalisées au cours des dernières années sur cette stratégie de recherche (cf figure 54). Le chapitre 2 abordera le processus de découverte de ligand de EthR, ainsi que la validation thérapeutique de la cible. Le chapitre 3 relatera le travail de « hit to lead » réalisé sur ces composés et ouvre la perspective d'une potentialisation du traitement par l'éthionamide *in vivo*.

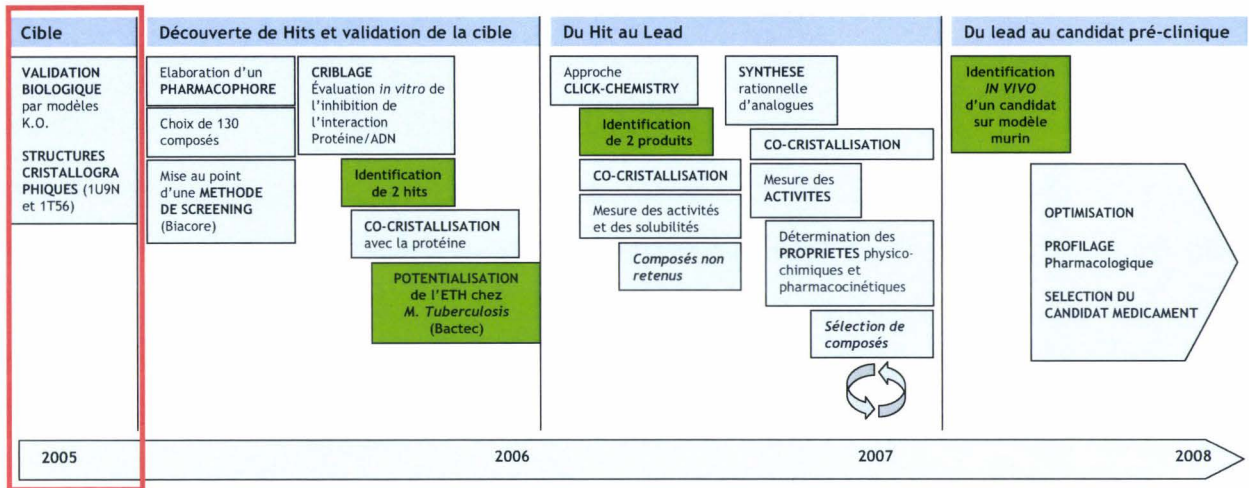


Figure 54 : Avancée du projet lors des dernières années. Début de la recherche encadré en rouge.

Chapitre 2 : Découverte de ligands de la protéine EthR de *Mycobacterium tuberculosis*

La stratégie envisagée consiste en la découverte de composés capables d'empêcher l'interaction de EthR avec le promoteur/opérateur du gène *ethA*. Cela provoquerait une surproduction de EthA et donc une hyperactivation de l'éthionamide (figure 55). L'inconvénient majeur de cet antituberculeux étant lié à sa posologie importante, et donc à ses effets secondaires, la présence d'un ligand d'EthR pourrait permettre de réduire les doses utilisées et ainsi limiter la survenue d'effets indésirables. Ce type d'approche a déjà été utilisé en thérapeutique, puisque l'association d'inhibiteur de β -lactamase (acide clavulanique) avec une pénicilline (amoxicilline) s'est révélée être extrêmement utile dans le traitement des germes multirésistants.

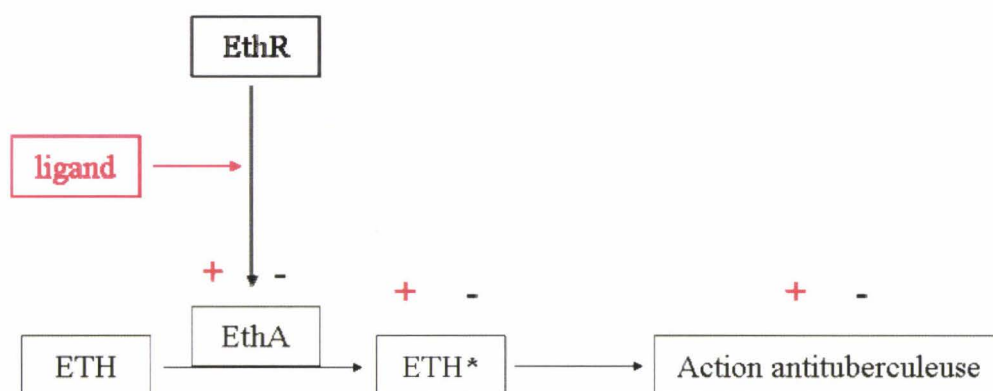


Figure 55 : Stratégie envisagée de potentialisation de l'ETH. Noir : absence de composé. Rouge : effet d'un ligand d'EthR

Des sources d'informations aussi intéressantes que les deux structures radiocristallographiques décrites, ou encore la visualisation de l'interaction protéine/ADN par RPS, sont de précieux atouts dans la réalisation de ce projet. Néanmoins, la difficulté majeure à ce niveau consiste principalement en la découverte de nouveaux composés « drug like » capables de provoquer l'induction de la protéine EthR. Cet objectif est rendu difficile par l'absence de composé connu capable de modifier la conformation du répresseur transcriptionnel, ainsi que par l'absence de méthode de criblage permettant d'identifier les composés. La mise au point de ces méthodes de criblage, ainsi que la détermination d'un pharmacophore constituent donc un préalable indispensable à la réussite du projet. En effet, la détermination directe de la CMI d'éthionamide chez *M. tuberculosis*, en présence ou non de

dérivé à tester, serait beaucoup trop lourde et ne serait pas forcément indicative du phénomène moléculaire mis en jeu. Cette détermination devra donc s'effectuer dans un second temps afin de valider complètement EthR comme cible thérapeutique.

1 Spécifications pour le criblage de composés synthétiques

Dans l'optique de tester un nombre important de composés en limitant le plus possible les facteurs « environnementaux », une méthode rapide, reproductible et indicative du phénomène moléculaire était à envisager. Cette nécessité est cependant handicapée par trois facteurs :

- premièrement, par l'absence d'activité enzymatique de EthR qui empêche de visualiser la diminution d'un substrat ou l'apparition d'un produit fluorescent.
- deuxièmement, par l'inadaptation de méthodes, telle que la microcalorimétrie dans le criblage d'un grand nombre de composés.
- troisièmement, par l'absence de composé connu interagissant avec EthR et l'empêchant de jouer son rôle de répresseur.

L'utilisation de la biologie moléculaire et la mise au point d'un modèle de mycobactérie, pour lequel le gène *ethA* aurait été remplacé par un gène rapporteur (glucuronidase), auraient pu être envisagées. Un composé interagissant avec EthR devrait induire une surexpression de glucuronidase et produire une augmentation de la fluorescence en présence de X-gal (Figure 56).

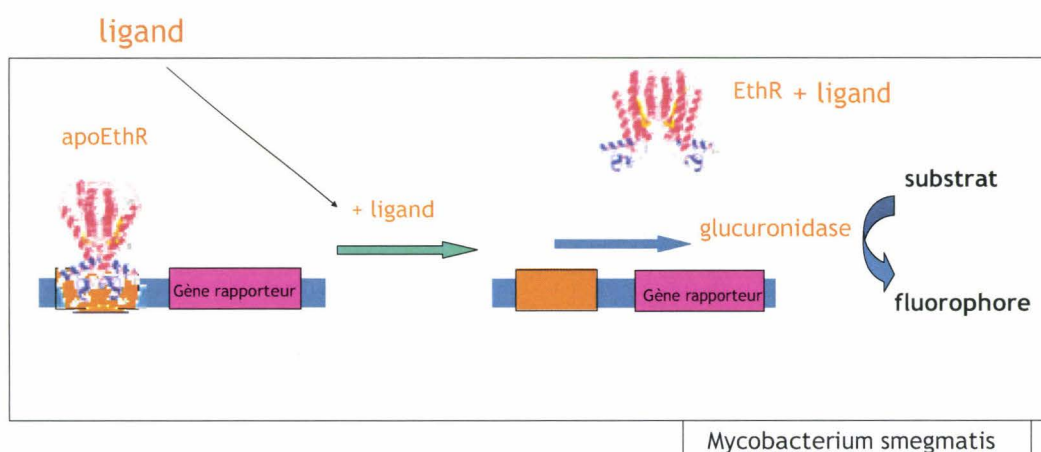


Figure 56 : Principe de la méthode de criblage basée sur la substitution de *ethA* par un gène rapporteur au sein de *M. smegmatis*

Les avantages de cette approche résident dans le haut débit de composés testables, ainsi que dans la prise en compte des notions de disponibilité et d'efficacité des composés au sein de la mycobactérie. L'inconvénient majeur dans cette stratégie réside dans le très grand nombre de facteurs pouvant intervenir. En effet, il est tout à fait envisageable que des composés pouvant interagir avec EthR ne soient pas capables de traverser la paroi hydrophobe. Inversement, des composés inactifs pourraient être activés au sein de la mycobactérie. Les résultats obtenus devraient donc être confrontés à ceux d'une seconde méthode d'évaluation. La mise en place d'un test évitant la machinerie cellulaire des mycobactéries serait donc également souhaitable pour l'élaboration d'un screening primaire.

Les recherches fondamentales réalisées précédemment ont montré que la résonance plasmonique de surface permettait de visualiser en temps réel le phénomène d'interaction moléculaire entre EthR et le promoteur du gène *ethA*¹³³. L'interaction d'un composé avec la protéine devrait donc être visualisable indirectement par cette méthode, puisqu'il limiterait sa fixation sur l'ADN. Dans cette approche, le nombre de facteurs environnementaux pouvant jouer sur les résultats est extrêmement réduit, ce qui permettrait d'élaborer plus sereinement des études de relation-structure-activité. Cette stratégie ne permet cependant pas de visualiser directement l'interaction ligand/protéine et n'est pas révélatrice du comportement des composés au sein de *M. tuberculosis*. De plus, il s'agit d'une méthode de criblage à moyen débit ne pouvant permettre de tester des milliers de composés. Malgré cela, elle est apparue comme étant un bon compromis entre rapidité et fiabilité et a ainsi été développée pour le criblage de composés.

2 Mise au point d'une méthode de criblage de composés synthétiques : Test utilisant la résonance plasmonique de surface (Biacore®)

2.1 Principe du phénomène de résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface permet de mettre en évidence les interactions survenant entre macromolécules. Son principe est basé sur l'utilisation d'un faisceau de lumière polarisée monochromatique. Lorsque ce dernier illumine une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différent, une partie de la lumière est réfléchiée et l'autre réfractée à travers la surface. Il existe cependant un angle pour lequel la réfraction est nulle. A cet angle, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage

perpendiculairement à la surface de l'interface. Lorsque cette onde rencontre une fine couche de métal (or par exemple), les électrons de celle-ci entrent en résonance avec les photons du faisceau incident. La conséquence observable de ce phénomène est une diminution d'énergie au sein du rayon réfléchi pour un angle déterminé : l'angle d'énergie minimale. La valeur de cet angle est fonction de l'indice de réfraction du milieu traversé par l'onde évanescente, là où les interactions entre macromolécules peuvent se produire. Lorsqu'une interaction survient, l'indice de réfraction du milieu et l'angle d'énergie minimale varient. Cette variation observée est mesurée en « response unit » ou RU, et est directement proportionnelle à la quantité de matière en contact avec la couche métallique à un instant donné (Figure 57). Il est établi qu'un RU correspond à une augmentation de masse de 1 pg/mm^2 sur la puce. Par ce système, en fixant un partenaire (ligand) sur une puce métallique (or) fonctionnalisée (dextran ou nickel), son interaction avec un autre partenaire en solution (analyte) sera observable et quantifiable en temps réel.

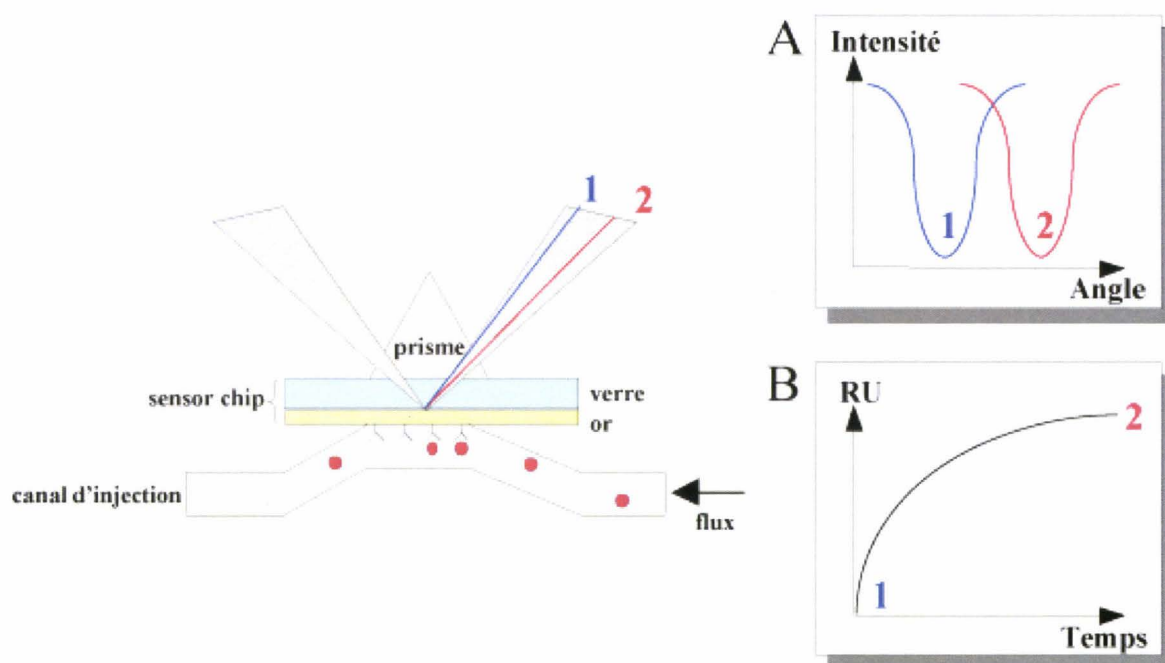


Figure 57 : Mise en évidence des interactions ligand/analyte au sein d'un appareil Biacore®

Les profils d'interaction observés, ou sensorgrammes, permettent d'avoir accès aux constantes d'association (k_a) et de dissociation (k_d) caractéristiques d'une interaction. La constante d'affinité K est donc facilement déterminable par la relation simple $K = k_d / k_a$. L'injection d'analyte sur une puce fonctionnalisée donnera le profil suivant (Figure 58):

- une première phase, où l'analyte a à sa disposition un grand nombre de partenaires avec lesquels il peut interagir. Lors de cette phase, les phénomènes d'association et de dissociation sont tous les deux mis en jeu. L'association prime cependant sur la dissociation, puisque l'analyte est injecté sous un flux continu et sa concentration en solution peut être considérée comme constante au cours du temps.
- une deuxième phase, où l'analyte a saturé l'ensemble des sites auxquels il pouvait avoir accès. Cela se caractérise par un état d'équilibre, où association et dissociation sont équivalentes.
- une troisième phase, où l'injection de l'analyte a cessé. Sa concentration en solution devient alors nulle et l'ensemble des sites occupés se libère au fur et à mesure. Lors de cette phase, seul le phénomène de dissociation intervient.

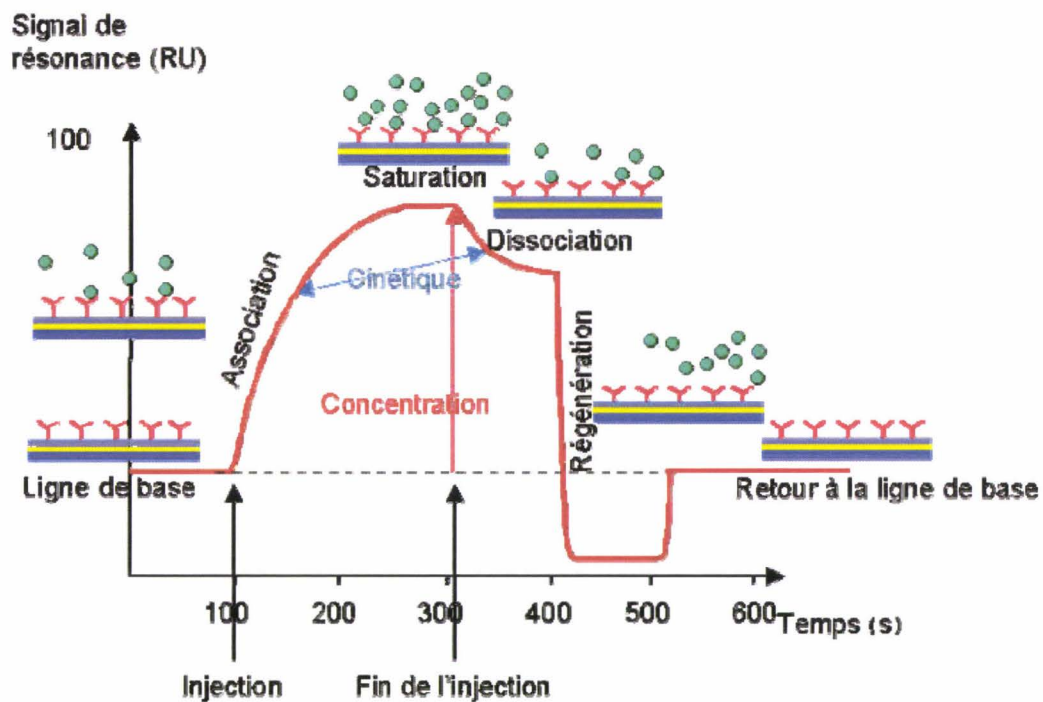


Figure 58 : Visualisation d'une interaction entre macromolécules par RPS

Deux stratégies peuvent être envisageables à ce niveau :

- soit la fixation de EthR sur la puce CM5 et l'injection des composés chimiques à tester. Cette approche est limitée par la stabilité réduite de la protéine et par la faible augmentation de masse induite par la fixation d'un ligand (environ 350 Da).
- soit la fixation de l'ADN sur la puce CM5 et l'injection de la protéine seule ou en présence de composé. Cette approche bénéficie de la grande stabilité de l'ADN et de la forte augmentation de masse lors de la fixation de la protéine (25 kDa par monomère). Elle peut

être limitée par l'apparition de phénomènes parasites comme l'interaction composé/ADN ou la précipitation de la protéine.

2.2 Principe du test envisagé utilisant la résonance plasmonique de surface

Le test que nous avons donc mis au point consiste en l'observation de l'interaction entre la protéine EthR et le promoteur du gène *ethA*. De façon comparable à ce qui a été réalisé précédemment¹³³, un fragment d'ADN double brin comprenant le promoteur de *ethA* a été fixé sur un canal d'une puce CM5. Afin de s'affranchir de l'interaction protéine/ADN non spécifique, un autre fragment d'ADN de même taille a également été fixé sur un second canal de cette même sensor chip. La fonctionnalisation de la puce par de l'ADN double brin se fait par utilisation du couple streptavidine/biotine. Lors de l'injection de protéine sur la sensor chip, il est possible de suivre en temps réel la fixation spécifique de EthR sur le promoteur d'*ethA*, en calculant à chaque instant la différence de fixation entre les deux canaux fonctionnalisés (Figure 59). L'effet d'un composé chimique sur EthR devrait donc être visualisable en comparant l'intensité de cette interaction protéine/ADN. Un composé interagissant avec le répresseur devrait provoquer son induction et ainsi l'empêcher de se fixer sur le promoteur. L'augmentation de masse observée en temps normal devrait alors être réduite. Afin de comparer les produits testés, la quantité de protéine fixée sur la puce lors de chaque injection a été mesurée. Ces valeurs ont été comparées à celles observées lors de l'injection de protéine seule, afin de déterminer un pourcentage d'inhibition de l'interaction EthR/promoteur *ethA* selon la formule

$$\% \text{ inhibition} = \frac{RU_{\text{EthR}} - RU_{\text{EthR+composé}}}{RU_{\text{EthR}}} \times 100$$

RU_{EthR} correspond au degré de fixation spécifique en response unit (RU) de la protéine EthR seule à la concentration déterminée.

$RU_{\text{EthR+composé}}$ correspond au degré de fixation spécifique en response unit de la protéine EthR à la concentration déterminée incubée en présence d'une concentration définie de composé à tester

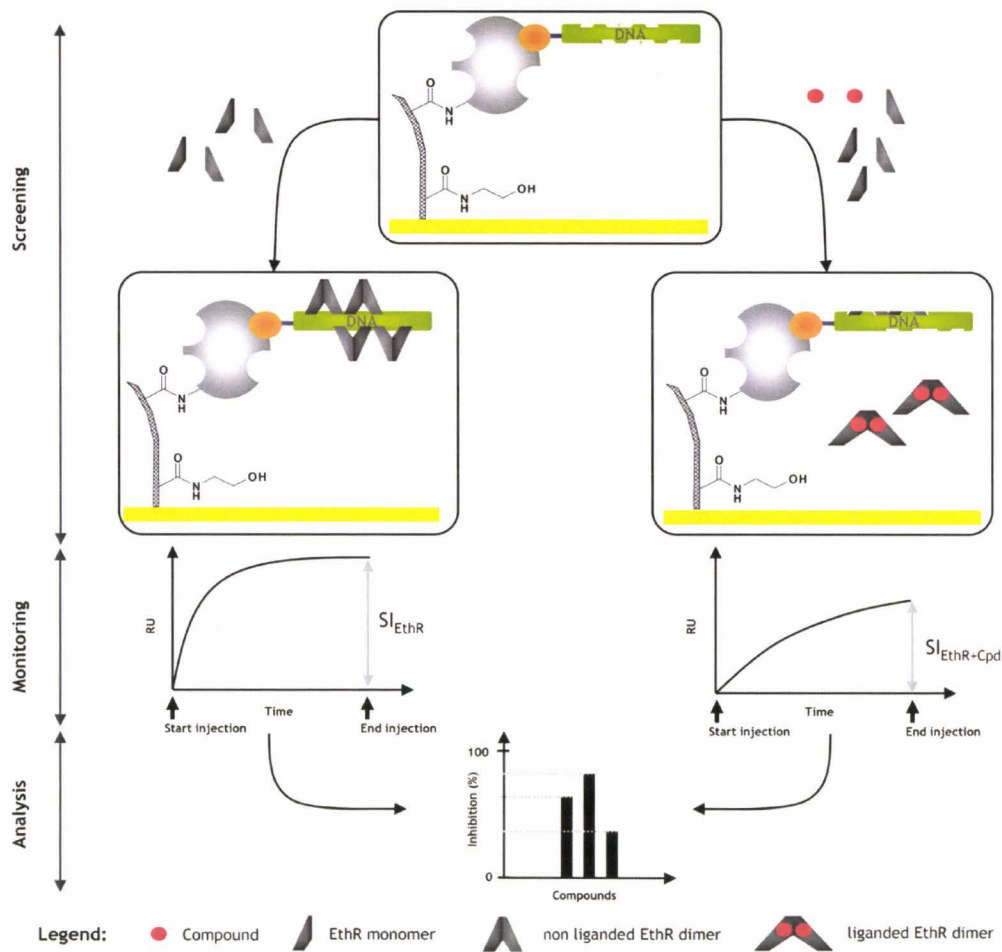


Figure 59 : Interaction de EthR avec le promoteur d'*ethA* en absence (gauche) ou en présence (droite) de ligand. Visualisation du sensorgramme et des résultats

2.3 Mise au point du test utilisant la résonance plasmonique de surface

2.3.1 Fonctionnalisation de la puce CM5 par de l'ADN biotinilé

Les conditions initiales utilisées sont identiques à celles utilisées par Engohang-Ndong *et al* lors de l'étude de l'interaction EthR/promoteur *ethA*¹³³. Le fragment d'ADN IG-106 précédemment utilisé a servi à l'étude de l'interaction spécifique lors de ce test. Le fragment d'ADN témoin, servant à s'affranchir de l'interaction non spécifique EthR/ADN, est le gène *bla* de *E. coli* impliqué dans les phénomènes de résistance à l'ampicilline. La puce CM5 a donc été fonctionnalisée par 200 RU d'ADN double brin sur deux canaux selon les recommandations fournies par le constructeur (Figure 60). Plus précisément, les fonctions carboxyliques de la pellicule de dextran sont activées en ester de succinimide par injection d'un mélange NHS/EDC sur deux canaux de la puce CM5 (A). Ces groupements activés

réagissent alors avec la fonction amine primaire de la streptavidine qui reste fixée à la puce de façon covalente (B). Les esters de succinimide n'ayant pas réagi à ce niveau sont inactivés par injection d'éthanolamine (C). Ce traitement permet de s'affranchir d'une fixation non spécifique pouvant être source d'erreur. Les deux doubles brins d'ADN biotinilés sont finalement fixés respectivement sur chacun des deux canaux fonctionnalisés (D). L'interaction streptavidine/biotine étant extrêmement forte (10^{-15} M), la quantité d'ADN reste quasiment constante au cours du temps.

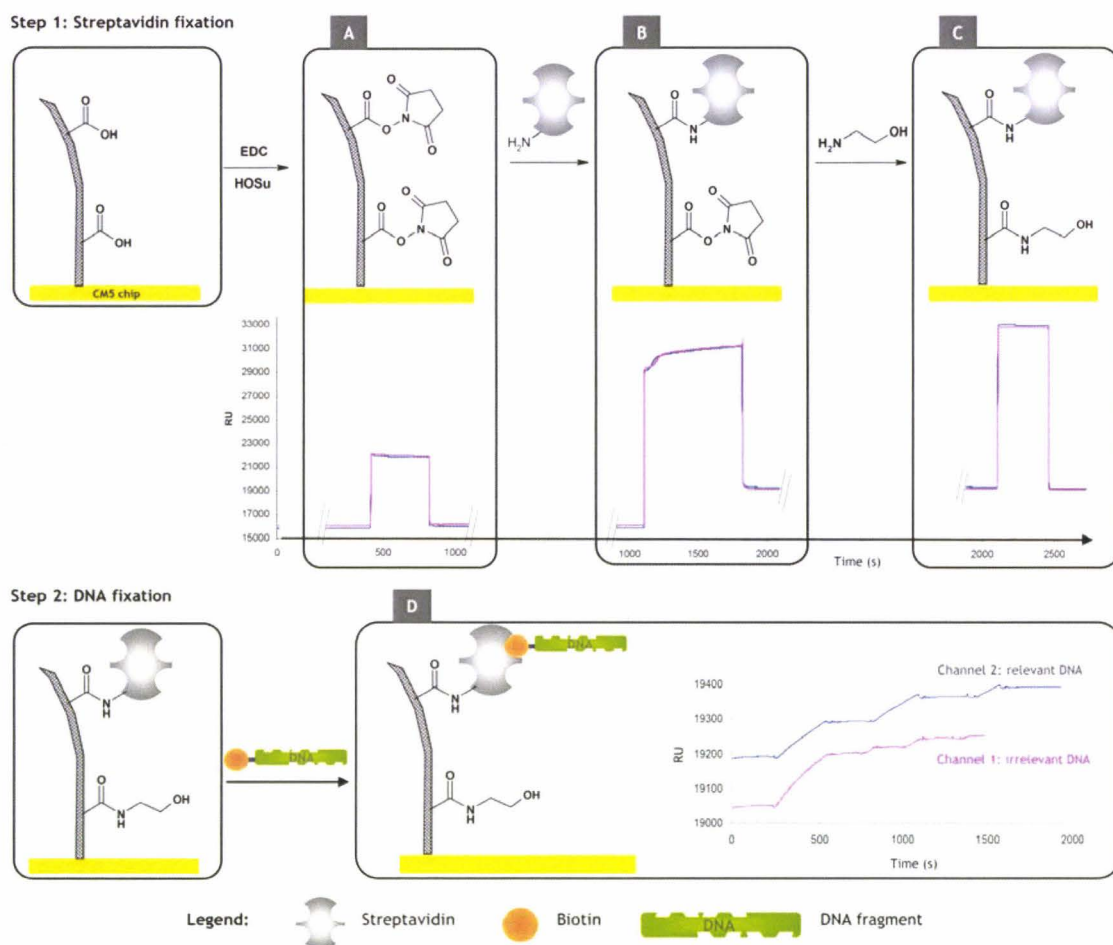


Figure 60 : Fonctionnalisation respective de deux canaux d'une puce CM5 par un fragment du gène *bla* d'*E. coli* et le fragment IG-106

2.3.2 Détermination de la sensibilité du test utilisant la résonance plasmonique de surface

En ce qui concerne le déroulement des expériences, un tampon Tris 10 mM (7.5), NaCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, DMSO 1 % a été préféré à l'utilisation d'un tampon phosphate (7.4) peu adapté à la conservation de la protéine au cours du temps. L'utilisation de

sodium dodécyl sulfate (SDS), préconisée entre les injections de protéine, a été évitée en raison d'une déstabilisation de l'ADN fixé sur la puce.

Une concentration en EthR de 625 nM dans les échantillons a été retenue, car elle permet une bonne reproductibilité entre les injections tout en assurant une bonne sensibilité au test. Cette sensibilité a été déterminée en faisant varier la concentration en protéine et en regardant les conséquences en termes de fixation (Figure 61). Lors de cette expérience, une interaction de 100 % est attribuée à la fixation observable pour une injection d'EthR à 625 nM. Dans ces conditions, une diminution de 7.5 % en protéine (578 nM) entraîne une réduction de l'interaction de 20 %. Le changement conformationnel, par un composé testé, de seulement une fraction de la protéine EthR en solution est donc parfaitement détectable.

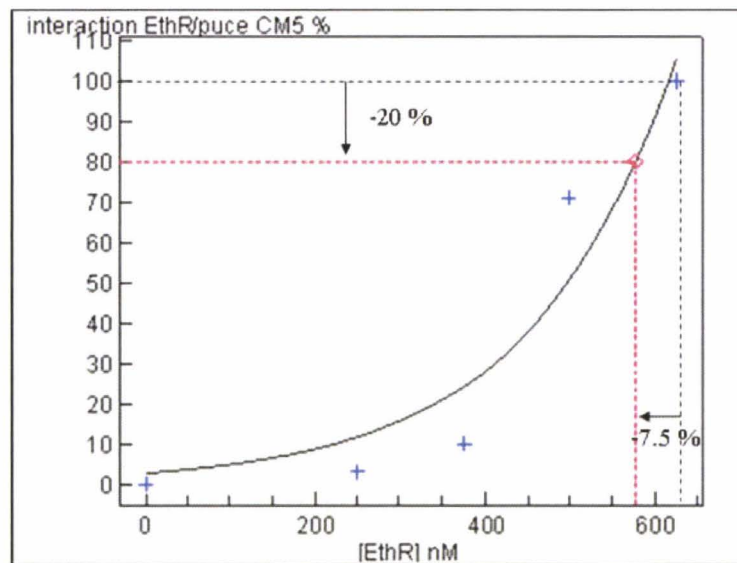


Figure 61 : Variation de l'interaction mesurée par RPS en fonction de la concentration en protéine EthR injectée. Influence d'une réduction de la concentration en Apo-EthR de 7.5 % sur l'interaction mesurée (rouge). Interaction de 100% déterminée pour une concentration de 625 nM. Puce fonctionnalisée avec 200 RU d'ADN *bla* et IG-106

Chaque composé a été testé à une concentration de 100 μ M, c'est-à-dire à une concentration 160 fois supérieure à celle de la protéine. Dans ces conditions, la probabilité de trouver un composé, même faiblement actif, est accrue.

3 Sélection et criblage de composés: découverte du composé BDM_14500

3.1 Détermination du pharmacophore et sélection des composés testés

Le faible degré d'homologie de la protéine EthR avec les répresseurs transcriptionnels TetR et QacR¹³¹ ne permet pas d'utiliser les ligands de ces protéines pour l'établissement d'un modèle structural de composé pouvant interagir avec EthR. De plus, la forme Apo de EthR n'étant pas décrite, il est également impossible d'établir l'origine du changement conformationnel. La meilleure approche pour découvrir des composés susceptibles d'interagir avec EthR était donc de s'inspirer des données disponibles au niveau des structures radiocristallographiques de la protéine en conformation induite.

L'étude des structures radiocristallographiques de EthR en conformation induite^{106,131} et la superposition des ligands fortuits au sein de la protéine¹³² ont permis l'élaboration d'un modèle de composé susceptible d'inhiber l'action du répresseur transcriptionnel (Figure 62). En effet, les deux cycles de présumé 1,4-dioxane présents au sein de la poche pourraient constituer une première piste intéressante. Leurs interactions respectives avec les acides aminés hydrophobes Phe-110, Trp-145, Phe-184, Met-142, Leu-183 et les résidus Trp-103, Ile-107, Thr-149, Trp-207 montrent bien que la présence d'une molécule chimique à ce niveau pourrait provoquer un changement de conformation et empêcher l'interaction protéine/ADN. L'introduction de cycles hydrophobes, aromatiques ou non, au sein de la structure de composés synthétiques pourrait donc favoriser une interaction similaire à celle observée par Dover *et al*¹³¹. Le remplacement de ces cycles par des groupements hydrophobes est également envisageable afin d'établir des interactions de type Van der Waals comparables à celles des fragments C12-C15 et C19-C22 de l'HexOc (Figures 49 et 50).

La distance mesurée entre ces cycles étant de 5.47 Å, cela laisse un espace suffisant pour permettre l'introduction d'un groupement chimique les reliant entre eux. La nature de ce linker et les interactions qu'il pourrait exercer au sein de la protéine sont cependant encore à préciser. Néanmoins, la présence des deux asparagines 176 et 179 à proximité pourrait être utilisée pour la création d'interactions polaires de type liaison hydrogène¹³² qui renforceraient encore l'affinité ligand/protéine.

130 composés synthétiques et commerciaux conformes à ce modèle ont été sélectionnés afin d'évaluer leur capacité à inhiber l'interaction EthR/promoteur *ethA*. Ces composés comportent des cycles de nature aromatique et/ou aliphatique ou des groupements hydrophobes reliés entre eux par diverses fonctions chimiques susceptibles d'établir des liaisons hydrogènes. Parmi elles, des hétérocycles fortement décrits dans la synthèse de molécules à visée thérapeutique, comme les 1,2,4-oxadiazoles^{134,135}, les 1,2,4-triazoles^{136,137}, les 1,3,5-triazines¹³⁸ ou les squamides^{139,140}, peuvent être cités. D'autres fonctions simples comme des carboxamides et des carbamates ont également été sélectionnées pour permettre l'évaluation de linker non cyclique dans l'interaction. Des fonctions éthers et des chaînons alkyles ont également été choisis afin de faire varier la distance et la flexibilité du linker. Ces groupements ont été sélectionnés sachant que les chaînes carbonées linéaires peuvent également interagir au sein du domaine de régulation de la protéine.

¹³⁴ Diana, G. D.; Volkots, D. L.; Nitz, T. J.; Bailey, T. R.; Long, M. A.; Vescio, N.; Aldous, S.; Pevear, D. C.; Dutko, F. J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2421-36.

¹³⁵ Borg, S.; Volling, R. C.; Labarre, M.; Payza, K.; Terenius, L.; Luthman, K. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4331-42.

¹³⁶ Jagerovic, N.; Hernandez-Folgado, L.; Alkorta, I.; Goya, P.; Navarro, M.; Serrano, A.; RodriguezdeFonseca, F.; Dannert, M. T.; Alsasua, A.; Suardiaz, M.; Pascual, D.; Martin, M. I. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2939-42.

¹³⁷ Carroll, W. A.; Kalvin, D. M.; Perez Medrano, A.; Florjancic, A. S.; Wang, Y.; Donnelly-Roberts, D. L.; Namovic, M. T.; Grayson, G.; Honore, P.; Jarvis, M. F. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 4044-8.

¹³⁸ Baidur, N.; Chadha, N.; Brandt, B. M.; Asgari, D.; Patch, R. J.; Schalk-HiHi, C.; Carver, T. E.; Petrounia, I. P.; Baumann, C. A.; Ott, H.; Manthey, C.; Springer, B. A.; Player, M. R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1717-20.

¹³⁹ Butera, J. A.; Antane, M. M.; Antane, S. A.; Argentieri, T. M.; Freeden, C.; Graceffa, R. F.; Hirth, B. H.; Jenkins, D.; Lennox, J. R.; Matelan, E.; Norton, N. W.; Quagliato, D.; Sheldon, J. H.; Spinelli, W.; Warga, D.; Wojdan, A.; Woods, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1187-202.

¹⁴⁰ Gilbert, A. M.; Antane, M. M.; Argentieri, T. M.; Butera, J. A.; Francisco, G. D.; Freeden, C.; Gundersen, E. G.; Graceffa, R. F.; Herbst, D.; Hirth, B. H.; Lennox, J. R.; McFarlane, G.; Norton, N. W.; Quagliato, D.; Sheldon, J. H.; Warga, D.; Wojdan, A.; Woods, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1203-14.

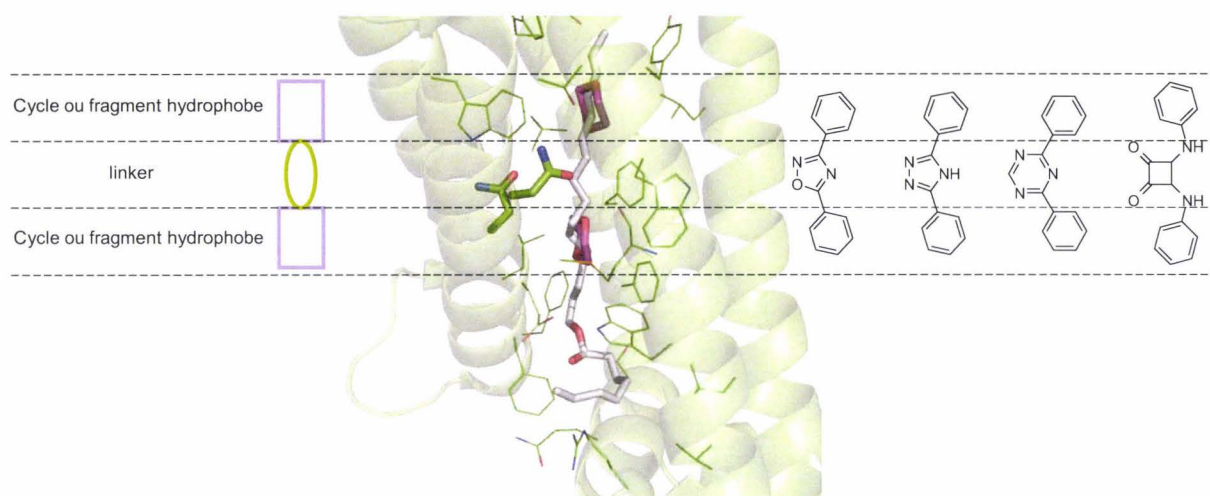


Figure 62 : Pharmacophore des composés sélectionnés. Positionnement théorique des hétérocycles sélectionnés au sein de la protéine. Superposition de l'HexOc et des deux molécules de 1,4-dioxane au sein de la structure 1U9N de EthR. HexOc en blanc, 1,4-dioxane en mauve, Asn-176 et Asn-179 en bâtonnet

3.2 Résultats et discussion

Les mesures d'inhibition de l'interaction EthR/promoteur *ethA* pour chacun des composés testés sont résumées dans la figure 63. Parmi les 130 composés sélectionnés, deux ont montré une inhibition significative et reproductible de l'interaction EthR/promoteur *ethA*. Il s'agit des composés BDM_14500 et BDM_17744. Afin de confirmer l'activité du meilleur composé BDM_14500 et de pouvoir étudier ses interactions avec la protéine, ce composé a été resynthétisé.

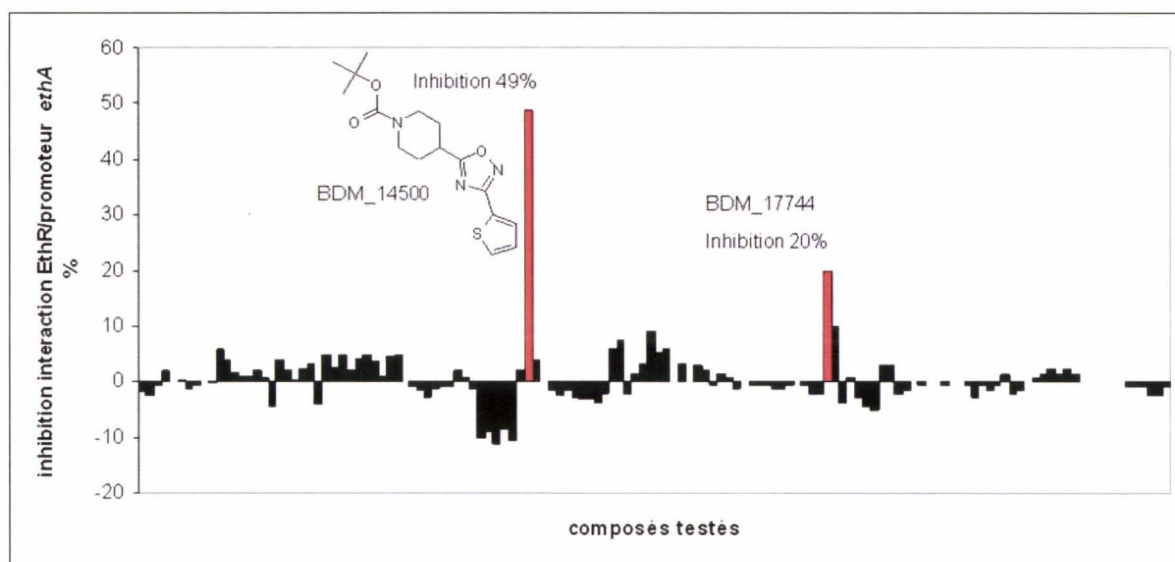


Figure 63 : Inhibition de l'interaction EthR/promoteur *ethA* observée pour chacun des 130 composés testés par résonance plasmonique de surface. Structures et inhibitions mesurées des composés sélectionnés

3.3 Resynthèse du composé BDM_14500

La synthèse du composé BDM_14500 a été réalisée selon le schéma réactionnel préalablement décrit par Poulain et al¹⁴¹ (Schéma 7). L'intermédiaire 2-thiophénamidoxime a été obtenu avec un rendement de 99 % par réaction du 2-thiophénecarbonitrile en présence d'hydroxylamine et de diisopropyléthylamine dans l'éthanol absolu à reflux. Par la suite, ce composé a été acylé par l'acide 1-Boc-pipéridine-4-carboxylique, préalablement activé par l'utilisation d'hydroxybenzotriazole et d'HBTU en milieu basique, pour donner l'intermédiaire non cyclisé. Ce dernier est isolé par précipitation en milieu aqueux et donne l'hétérocycle 1,2,4-oxadiazole avec un rendement de 84 % par chauffage à 110°C dans le DMF.

¹⁴¹ Poulain, R. F.; Tartar, A. L.; Deprez, B. P. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 1495-8.

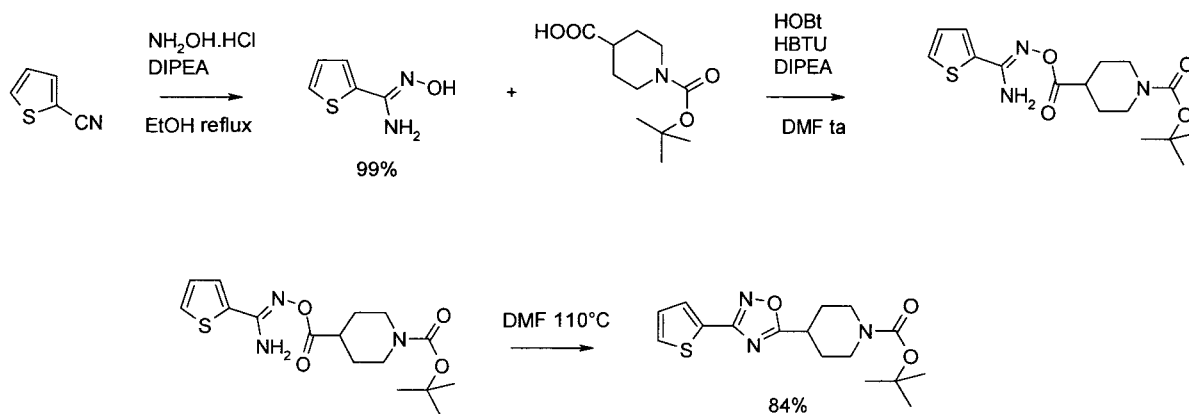


Schéma 7: Synthèse du composé BDM_14500

L'inhibition dose dépendante de l'interaction EthR/promoteur *ethA* induite par ce composé resynthétisés a été étudiée par RPS.

3.4 Comparaison de l'activité des composés sélectionnés par RPS

3.4.1 Adaptation des conditions utilisées pour la détermination de courbes doses-réponses

Dans un premier temps, l'activité de chacun de ces composés a été établie dans des conditions similaires à celles utilisées lors du screening : c'est-à-dire grâce à une puce CM5 fonctionnalisée avec 200 RU d'ADN, une concentration d'EthR de 625 nM et une concentration en composé variable. Malheureusement, l'activité trop faible des composés aurait nécessité de pouvoir augmenter leur concentration au sein des échantillons bien au-delà de leur seuil de solubilité. Afin de contourner ce problème, une seconde puce CM5 a été fonctionnalisée de façon analogue à la première, mais avec une quantité d'ADN dix fois moindre (20 RU). De cette façon, la concentration en protéine EthR au sein des échantillons a pu être réduite à 350 nM et le ratio composé sur protéine augmenté. Des courbes doses-réponses ont ainsi pu être établies pour les deux composés retenus.

3.4.2 Courbe dose-réponse du composé BDM_14500 établie par RPS

La courbe suivante a été obtenue selon les conditions décrites dans le paragraphe précédent. La concentration en composé diminuant l'interaction EthR/promoteur *ethA* de 50 %, ou concentration inhibitrice 50 (CI₅₀), a ainsi pu être déterminée et indique l'affinité des

composés testés pour la protéine. Une CI_{50} de 38 μM a été mesurée pour le composé BDM_14500 (Figure 64).

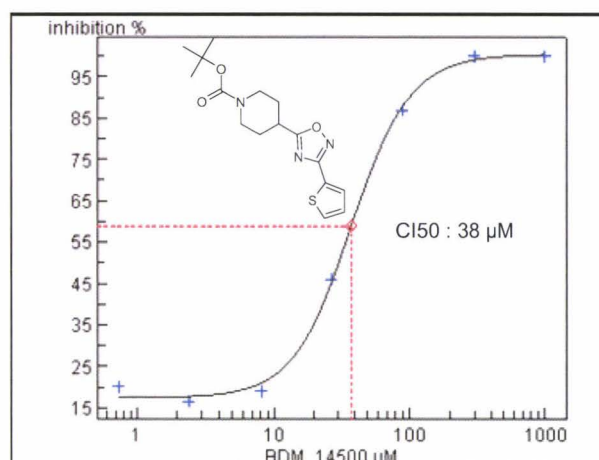


Figure 64 : Courbe dose réponse et CI_{50} (pointillé rouge) du composé BDM_14500 déterminée par RPS (puce CM5 fonctionnalisée avec 20 RU du fragment IG-106. [EthR] = 350 nM)



L'utilisation de la résonance plasmonique de surface a donc permis l'identification de composés capables d'interagir avec le répresseur transcriptionnel EthR. Sur 130 composés sélectionnés, deux d'entre eux ont empêché la protéine de jouer son rôle. Ce résultat extrêmement encourageant valide bien la méthode de criblage utilisée dans la découverte de composés interagissant avec des répresseurs transcriptionnels. A ce niveau, une étude radiocristallographique de l'interaction du composé BDM_14500 avec EthR a été envisagée afin de confirmer la validité des interactions par rapport au pharmacophore établi.

4 Caractérisation de l'interaction EthR/composés par co-cristallisation

4.1 Protocole de co-cristallisation utilisé

Afin de vérifier la pertinence du pharmacophore établi, des études de co-cristallisation des composés identifiés en présence de la protéine ont été mises en oeuvre. Pour ce faire, la protéine EthR a été produite et purifiée dans *E. coli* C41 selon les conditions décrites par Dover *et al*¹³¹. Cette méthode devrait éviter la présence fortuite d'HexOc au sein de la protéine comme Frénois *et al* l'avaient observé dans *E. coli* BL21¹⁰⁶. Une solution à 26

mg/mL (1 mM) de His₆-EthR a ainsi été obtenue dans un tampon Tris 10 mM (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT.

L'affinité des composés identifiés étant relativement faible, ces derniers ont été mis en présence de la solution de protéine en large excès (ratio composé sur protéine de dix). 3 % de DMSO ont également été introduits dans le mélange, afin de favoriser la solubilité des dérivés organiques en milieu aqueux sans pour autant dénaturer la protéine.

La cristallogenèse a ensuite été amorcée par ajout au mélange EthR-ligand de diverses solutions de cristallisation contenant du glycérol et une concentration variable en sulfate d'ammonium. Une diffusion de vapeur en goutte suspendue a ensuite été réalisée.

Le principe de cette méthode est basé sur l'établissement d'un équilibre entre la goutte et le réservoir par diffusion des espèces volatiles. Dans la plupart des cas, la goutte est plus diluée que le réservoir, ce qui entraîne une concentration de la goutte. La protéine qui ne diffuse pas reste dans la goutte et se trouve elle aussi concentrée. L'état de sursaturation s'établit donc progressivement en augmentant simultanément la concentration de la protéine et de l'agent précipitant, ce qui peut conduire à l'obtention de cristaux (Figures 65 et 66).

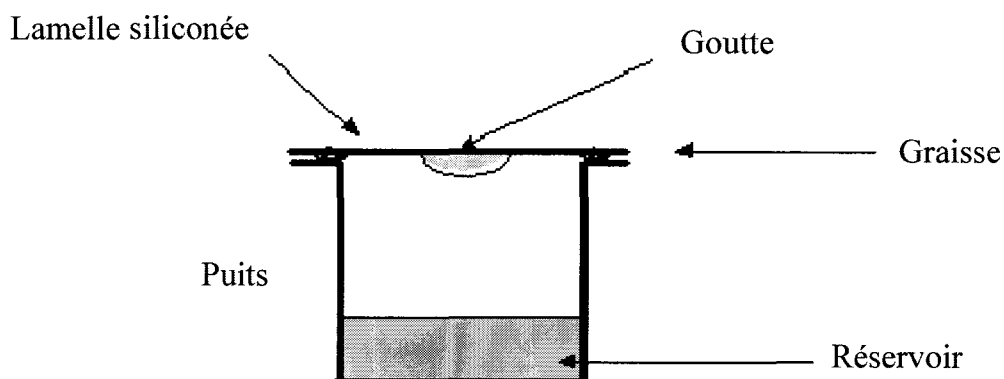


Figure 65 : Mise en œuvre de la diffusion de vapeur en goutte suspendue

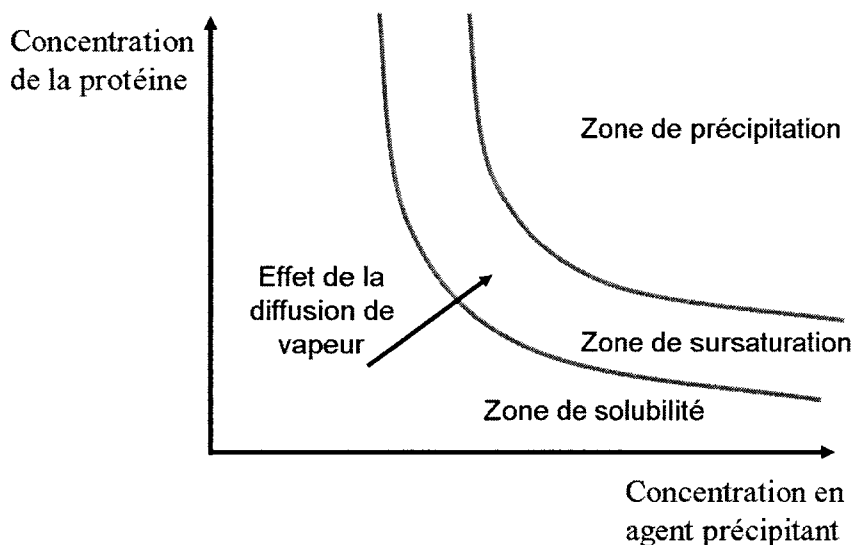


Figure 66 : Diagramme de phase d'une protéine. L'évolution du système lors de l'équilibrage par diffusion de vapeur est indiquée par la flèche

4.2 Co-cristallisation du composé BDM_14500 au sein du domaine de régulation de EthR

La structure radiocristallographique de la protéine EthR de *Mycobacterium tuberculosis* en présence du composé BDM_14500 a été obtenue avec une résolution de 1.85 Å.

L'étude de cette structure montre un positionnement du cycle 1,2,4-oxadiazole conforme à celui attendu lors de l'établissement du pharmacophore (Figures 67). En effet, cet hétérocycle se situe bien à proximité des asparagines 176 et 179 et une liaison hydrogène est réalisée entre cette dernière et l'azote 4 de l'1,2,4-oxadiazole. Cette interaction est caractérisée par une distance de 3.22 Å entre les hétéroatomes et met en jeu une faible énergie. Le positionnement de cet hétérocycle est cependant stabilisé par une interaction de type π stacking avec la Phe-110 se trouvant à une distance de 3.55 à 3.91 Å.

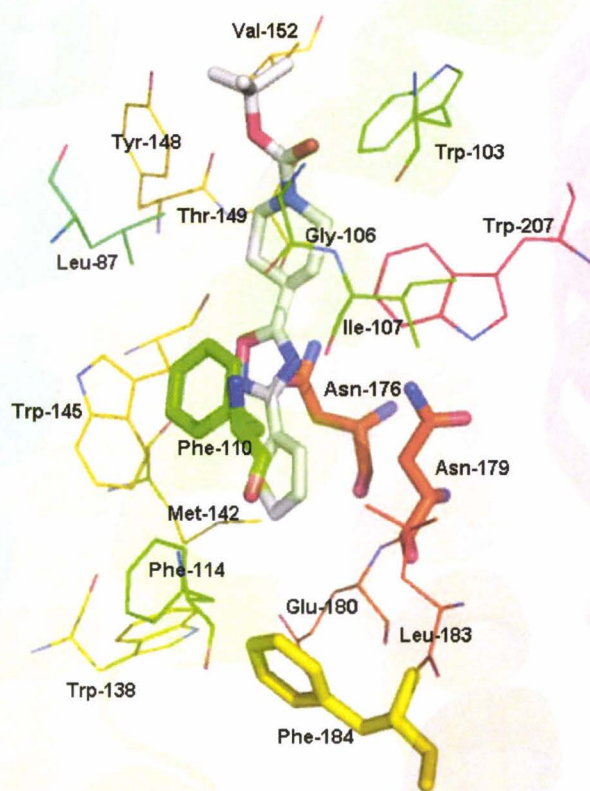


Figure 67 : Structure radiocristallographique du composé BDM_14500 (blanc) au sein de EthR. Les acides aminés Phe-110 (vert), Asn-176, Asn-179 (orange) et Phe-184 (jaune) sont représentés en bâtonnet

Le positionnement des cycles thiophène et pipéridine du composé BDM_14500 est également conforme à celui du pharmacophore établi. Le cycle thiophène interagit dans la partie inférieure du domaine de régulation avec les résidus Phe-114, Trp-138, Met-142, Trp-145, Phe-184 et Leu-183. Le cycle pipéridine se situe à proximité des acides aminés Leu-87, Gly-106, Ile-107, Thr-149, Trp-207 dans la partie supérieure de la protéine. Ces deux cycles sont donc placés exactement à la même position que les deux molécules de présumé 1,4-dioxane décrites par Dover *et al*¹³¹ (Figure 68). Les interactions établies entre ces cycles et la protéine sont de type Van der Waals et aucun phénomène de type « π stacking » n'est observable avec le thiophène.

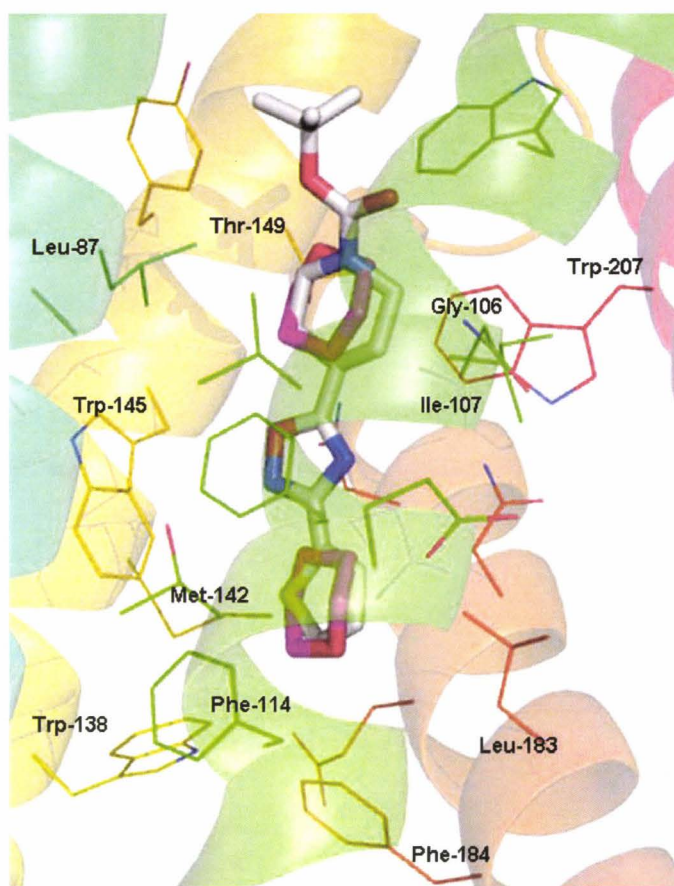


Figure 68 : Superposition de la structure obtenue par Dover *et al*¹³¹ avec le composé BDM_14500 (blanc).
Molécules de présumé 1,4-dioxane représentées en rose

Le groupement *t*Boc interagit dans la partie supérieure du domaine de régulation, là où l'HexOc positionnait son fragment C22-C24¹⁰⁶ (Figure 50). Les résidus se trouvant à sa proximité, Trp-103, Met-142, Tyr-148 et Val-152, établissent des interactions hydrophobes de type Van der Waals avec le volumineux groupement *tertio*-butyle (Figure 69).

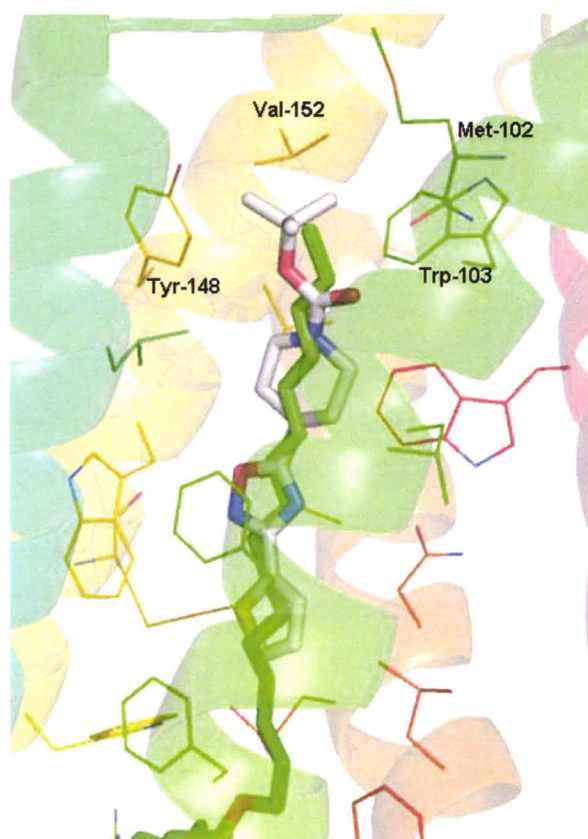


Figure 69 : Superposition de la structure obtenue par Frénois *et al*¹⁰⁶ avec le composé BDM_14500 (blanc). Molécule d'HexOc représentée en vert

Parallèlement à ces observations, une très forte conservation entre cette structure et celle décrite par Dover *et al* est observable. Les différents résidus du domaine de régulation sont parfaitement superposables et la Phe-184 adopte une conformation similaire en empêchant l'accès au domaine inférieur de la protéine. De plus, la stœchiométrie observée du ligand au sein de la protéine est de une molécule par monomère et la distance HTH mesurée entre les deux carbones α des Phe-63 est de 48 Å.

Ces observations confirment donc bien l'hypothèse structurale précédemment établie sur la capacité des composés tricycliques, possédant un hétérocycle donneur et/ou accepteur de liaison hydrogène, à interagir avec EthR et à provoquer son induction. A ce niveau, l'hétérocycle 1,2,4-oxadiazole s'est révélé particulièrement intéressant, car son interaction avec l'asparagine 179 est désormais vérifiée. De nombreux autres composés, présentant ces hétérocycles, ayant été testés lors de ce screening, il était d'ores et déjà possible d'en déduire des données de relation-structure-activité.

5 Etudes de relation-structure-activité à partir des composés testés et des données radiocristallographiques

Le tableau 2 regroupe les résultats observés lors du screening pour les différentes catégories de composés 1,2,4-oxadiazole.

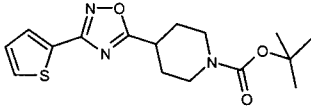
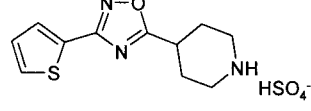
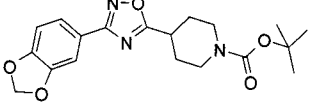
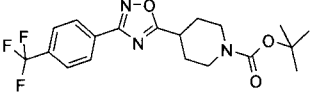
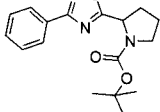
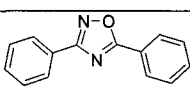
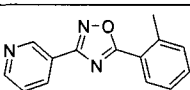
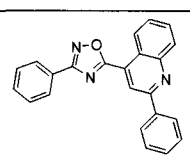
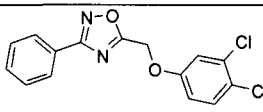
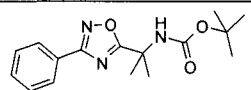
Référence composé	Structure	Inhibition %
BDM_14500		49
1		4
2		-1
3		2
4		4
5		0
6		5
7		4
8		1
9		2

Tableau 2: Evaluation de la capacité de certains composés 1,2,4-oxadiazoles à inhiber l'interaction EthR/promoteur *ethA*. Evaluation réalisée par RPS : puce CM5 fonctionnalisée par 200 RU d'ADN, [EthR] = 625 nM, [composés] = 100 μ M

La première observation importante qui ressort de ce screening est le rôle joué par le groupement *tertio*-butyloxycarbonyl dans l'activité mesurée. En effet, le composé 1, analogue non protégé du composé BDM_14500, se révèle avoir une activité beaucoup plus faible (4 %

d'inhibition contre 49 %). L'étude de la structure radiocristallographique du composé BDM_14500 montre que le groupement *t*Boc se dirige vers l'ouverture supérieure de la poche et interagit alors avec un ensemble de résidus hydrophobes (Val-152, Tyr-148, Met-102 et Leu-87). Cela pourrait indiquer que la partie supérieure du domaine de régulation serait un point favorisant dans la survenue d'interactions de type Van der Waals. Ces dernières seraient alors responsables d'une augmentation de l'affinité. La structure décrite par Dover *et al*¹³¹ montre cependant que ce site de liaison n'est pas nécessaire au phénomène d'induction. La perte très importante de l'activité observée entre BDM_14500 et **1** doit également être due à la présence d'une fonction amine protonée, chargée positivement dans un site riche en résidus aliphatiques.

La seconde observation importante qui ressort de ce screening est l'influence du cycle aromatique et de ses substituants dans l'interaction mise en jeu au sein de la poche hydrophobe. En effet, la substitution du cycle thiophène par un pipéronyle (composé **2**) ou un *p*-trifluorométhylbenzyle (composé **3**) induit une perte complète de l'interaction (respectivement -1 et 2 % d'inhibition contre 49 %). Les données cristallographiques du composé BDM_14500 indiquent que le thiophène est impliqué dans des interactions hydrophobes de type Van der Waals avec les acides aminés Trp-145, Phe-184, Met-142 et Leu-183 de la partie inférieure de la protéine. Aucune interaction de type π stacking n'est cependant observable à ce niveau. Il est donc difficile de préciser davantage la nature de l'interaction mise en jeu. Néanmoins, la présence de substituants (**2**) ou de cycles trop volumineux (**3** et **7**) pourrait induire une gêne stérique et expliquer la perte d'activité observée.

Parallèlement à ces faits, la linéarité des composés semble également importante. La substitution de la pipéridine par une pyrrolidine (composé **4**) n'est pas apparue comme favorable à l'interaction (4 % d'inhibition). Cela pourrait s'expliquer par les grandes étroitesse et linéarité du canal de la protéine.

L'inhibition de 5 % observée avec le composé **6** est également intéressante, puisque le biaryl-1,2,4-oxadiazole **5** ne présente aucune activité. Afin de confirmer ce résultat, la CI_{50} du composé **6** a été déterminée par RPS selon des conditions similaires à celles utilisées pour le dérivé BDM_14500 (puce CM5 fonctionnalisée avec 20 RU d'ADN, [EthR] = 350 nM) (Figure 70). Une valeur de 135 μ M a été observée, ce qui est parfaitement cohérent avec les

valeurs d'inhibition obtenues lors du screening. La présence d'un méthyle en position *ortho* du cycle phényle du composé **6** est cependant intéressante. Il est possible que ce dernier provoque un positionnement du cycle aromatique plus favorable au sein de la protéine avec un basculement par rapport à l'hétérocycle 1,2,4-oxadiazole.

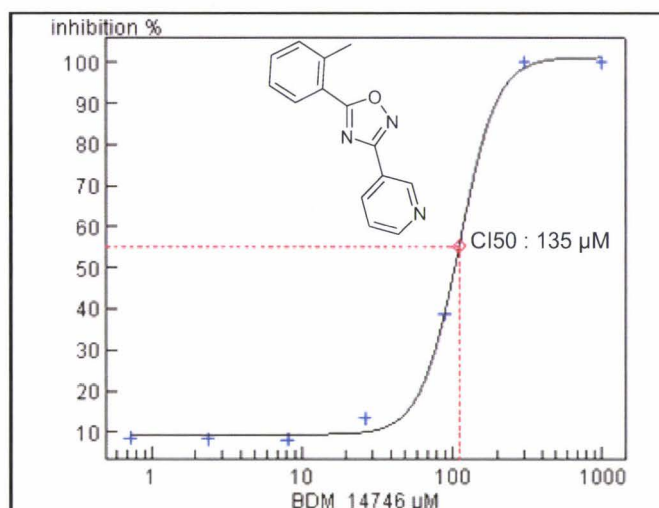


Figure 70 : Courbe doses réponses et CI_{50} (pointillé rouge) du composé **6** (BDM_14476) déterminées par RPS (puce CM5 fonctionnalisée avec 20 RU du fragment IG-106. [EthR] = 350 nM)

Il est également intéressant de constater que l'introduction d'un chaînon méthyle directement lié à l'1,2,4-oxadiazole (composés **8** et **9**), et par conséquent d'un plus grand espacement et d'une plus grande flexibilité dans la structure des ligands, est peu favorable à l'affinité (respectivement 1 et 2 % d'inhibition). Cette observation, ainsi que le haut degré de conservation dans le positionnement des cycles entre les structures radiocristallographiques, montrent bien l'importance qu'ont ces sites hydrophobes dans la survenue du phénomène de changement conformationnel.

6 Bilan sur les études RPS et radiocristallographique des interactions ligands/EthR

Il ressort donc de ce criblage que la présence d'un hétérocycle donneur et/ou accepteur de liaison hydrogène est essentielle à l'interaction avec les Asparagines 176 et 179 de EthR (Figure 67). De plus, le pharmacophore basé sur l'élaboration d'un modèle bicyclique est parfaitement vérifié à la vue des données radiocristallographiques (Figures 68). Le profil des composés susceptibles d'interagir avec la protéine peut cependant être précisé par rapport aux

premières hypothèses. En effet, la grande linéarité du domaine de liaison à un ligand ne favorise pas la présence de composés coudés ou trop larges (tableau 2, composés 4 et 7). De plus, en raison de l'hydrophobicité, la présence de fonctions amines libres chargées est également mal tolérée (tableau 2, composé 1). Enfin, la forte conservation dans le positionnement des acides aminés de la poche lors de l'établissement des différentes structures montre bien à quel point la notion d'encombrement stérique est importante. Cela se vérifie, tant au niveau des substituants (tableau 2, composés 2 et 3) que du positionnement des différents cycles entre eux (tableau 2, composé 8). Il est donc à ce niveau, difficile de prévoir l'impact réel des groupements chimiques sur l'affinité, même si la découverte du composé BDM_14500 constitue une grande avancée dans le projet. La validation d'une méthode de screening, ainsi que du protocole de co-cristallisation de ce composé au sein de la protéine, sera un précieux atout dans la découverte d'inhibiteurs plus actifs.

Ces résultats prometteurs ont justifié l'étude *in bacterio* du composé BDM_14500 afin d'évaluer sa capacité à potentialiser l'action de l'éthionamide sur la mycobactérie.

7 Etude de potentialisation de l'éthionamide sur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Les études réalisées par RPS, ainsi que la co-cristallisation des composés identifiés au sein de la protéine, sont parfaitement convergentes, et présentent le produit BDM_14500 comme ligand de la protéine EthR. Ces résultats ont justifié l'étude *in bacterio* de ce composé, afin de pouvoir juger de son potentiel thérapeutique. Cette évaluation a été réalisée dans un premier temps sur un appareillage Bactec MGIT 960. Cette méthode est utilisée dans la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en antituberculeux d'une souche clinique de *M. tuberculosis*.

L'appareil Bactec MGIT 960 nécessite l'usage de tubes de cultures de milieu 7H9 supplémenté en OADC et contenant un indicateur fluorescent (Tris 4,7-diphényl-1,10-phénanthroline ruthénium pentahydraté). Ce dernier émet une fluorescence qui est inhibée en présence d'oxygène. En cas de développement mycobactérien, l'oxygène présent dans le tube de culture sera consommé et la fluorescence va devenir détectable après un certain temps. En revanche, l'absence de croissance ne va induire aucune modification sur le taux d'oxygène et

la fluorescence va être inhibée. Les tubes de cultures sont mis dans l'appareil par série, le premier tube étant toujours un témoin de croissance correspondant à la pousse d'un inoculum mycobactérien cent fois plus faible que celui introduit dans les autres tubes. Le résultat est donné par l'appareil lorsque la fluorescence produite par ce témoin atteint un certain niveau. A ce moment précis, chaque tube de la série est dit soit « sensible » si aucune croissance mycobactérienne n'est détectée (fluorescence faible), soit « résistant » lorsqu'un développement a bien eu lieu. *Mycobacterium tuberculosis* possédant une durée de division d'une vingtaine d'heures, les résultats sont communiqués en une semaine.

La souche H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* a été utilisée dans ce travail pour évaluer l'effet du composé BDM_14500 sur la potentialisation *in bacterio* de l'éthionamide. Par cette méthode, l'effet bactéricide du composé BDM_14500, ainsi que les CMI de l'éthionamide seul et en présence du ligand, ont été mesurés. L'expérience a été conduite en présence de 0.63 % d'éthanol dans le milieu avec une concentration de 200 μ M en composé BDM_14500.

Dans ces conditions, aucune toxicité liée à l'éthanol ou au composé BDM_14500 n'a été observée sur la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. La CMI de l'éthionamide seul a été déterminée à 1 μ g/mL (Figure 71, histogrammes rouges) et à 0.25 μ g/mL en présence de BDM_14500 (Figure 71, histogrammes bleus). La potentialisation observée est donc d'un facteur quatre.

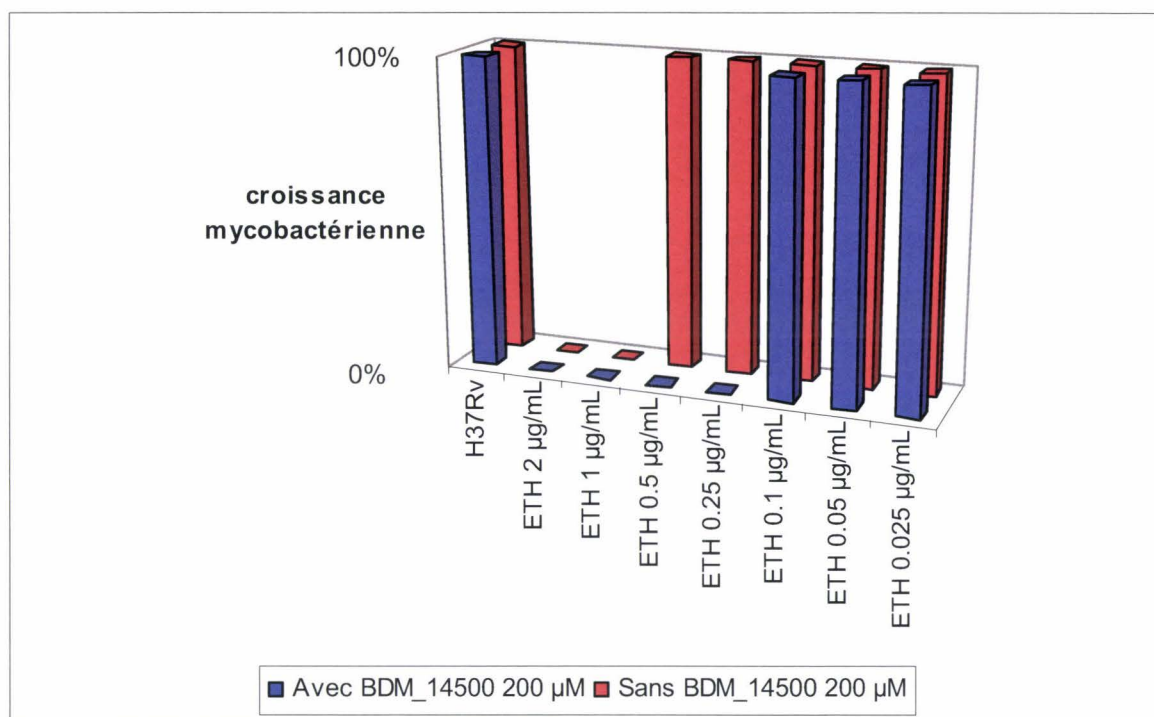


Figure 71 : Détermination de la CMI de l'éthionamide en absence (rouge) et en présence de composé BDM_14500 à 200 µM (bleu) sur *M. tuberculosis* H37Rv par méthode Bactec MGIT 960

Une potentialisation de l'éthionamide d'un facteur quatre est observable pour le composé BDM_14500 par méthode Bactec MGIT 960. Sa trop faible activité et les fortes concentrations nécessaires à son activité demeurent cependant un handicap et l'optimisation de ce composé a donc été entreprise.

8 Bilan sur la découverte du hit BDM_14500 : validation de la cible

Les données préalablement décrites concernant les mécanismes de résistances à l'éthionamide ont permis l'élaboration d'un modèle moléculaire de composé susceptible d'interagir avec le répresseur transcriptionnel EthR de *M. tuberculosis*. La sélection de 130 composés possédant une structure en adéquation avec le profil désiré, et leur test par utilisation d'un criblage à moyen débit basé sur l'utilisation de la RPS, ont abouti à l'identification de composés capables d'interagir avec la protéine. Des études radiocristallographiques ont confirmé l'interaction de ces dérivés avec la cible, et ont démontré l'intérêt de l'hétérocycle 1,2,4-oxadiazole dans l'affinité observée. De plus, l'évaluation *in bacterio* de l'action du composé BDM_14500 a montré des résultats extrêmement encourageants avec une potentialisation de

l'éthionamide d'un facteur quatre chez *M. tuberculosis* H37Rv (0.25 µg/mL au lieu de 1 µg/mL).

Ces résultats valident donc définitivement la protéine EthR comme cible thérapeutique d'intérêt dans la recherche de nouveaux antituberculeux (figure 72). De plus, la fiabilité de la méthode de criblage, ainsi que la pertinence du pharmacophore établi, sont également vérifiées. Néanmoins, la faible activité des composés identifiés reste un facteur limitant et les doses utilisées pour observer une action significative sont bien trop importantes pour une utilisation en thérapeutique (200 µM soit 77.1 µg/mL). L'optimisation du composé BDM_14500 par des études de relation-structure-activité a donc été entreprise afin de renforcer l'affinité pour la protéine.

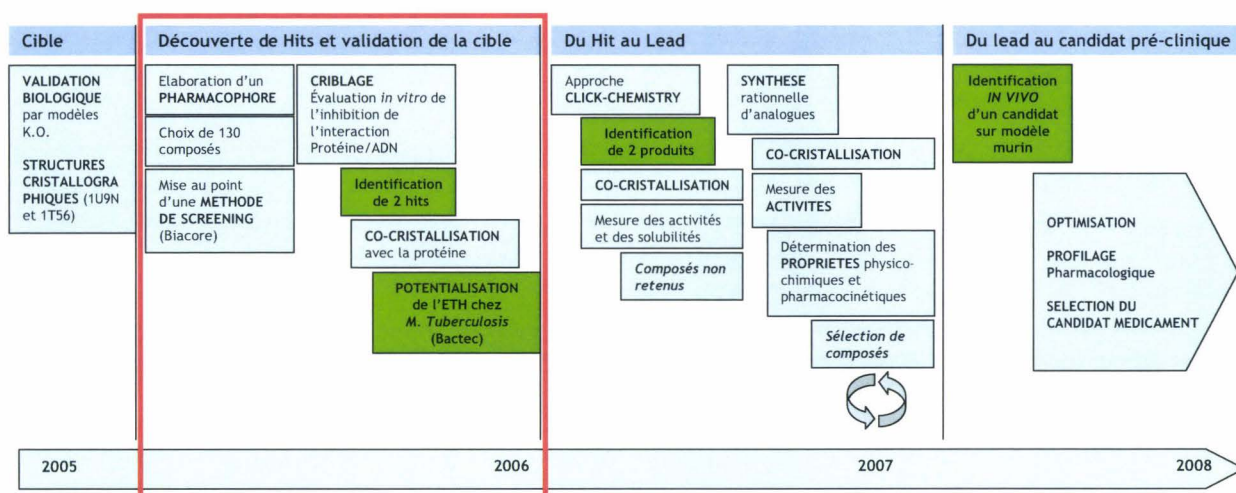


Figure 72 : Avancées réalisées sur le projet au cours du temps. Travail réalisé encadré en rouge.

Chapitre 3 : Optimisation du composé BDM_14500 : vers la découverte d'un lead

1 Contraintes pour l'obtention d'un lead

Afin d'augmenter l'affinité du composé BDM_14500 pour sa cible EthR, il est nécessaire de moduler sa structure chimique afin de renforcer les interactions mises en jeu.

Pour ce faire, deux approches peuvent être envisagées :

- une modification raisonnée élaborée par le chimiste qui, en fonction des possibilités d'interaction présentées par la poche de liaison, essaie de placer certains groupements susceptibles de renforcer l'affinité
- une approche dite orientée par la protéine, qui va elle-même participer au recrutement des meilleurs partenaires dans la synthèse de ligands plus affins (click chemistry *in situ*).

Cette seconde stratégie permettrait une exploration beaucoup plus large du domaine de liaison de la protéine. Cependant, l'établissement de nouvelles interactions s'accompagnerait obligatoirement d'une augmentation du poids moléculaire, au détriment d'autres facteurs importants, telle que la solubilité. Bien qu'une augmentation de l'affinité pour la protéine soit nécessaire, celle-ci ne doit pas se faire aux dépens de la biodisponibilité des composés et des facteurs physico-chimiques qui y sont associés : polarité, flexibilité, stabilité métabolique ...

La règle des cinq décrite par Lipinsky¹⁴² énonce les contraintes structurales auxquelles doit satisfaire un composé pour qu'il ait un profil de lead. Si deux des quatre paramètres suivants ne sont pas respectés, la probabilité que ce composé aille jusqu'aux essais cliniques est très faible :

- nombre de donneurs de liaison hydrogène < 5
- nombre d'accepteurs de liaison hydrogène < 10
- poids moléculaire < 500
- log P < 5

¹⁴² Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; and Feeney, P. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.

Une approche de click chemistry *in situ* va à l'encontre de cette règle en augmentant le nombre de groupements donneurs / accepteurs de liaisons hydrogène, le poids moléculaire et le log P. Néanmoins, à ce niveau du projet, la recherche d'informations sur le domaine de liaison est souhaitable, car elle permettrait un affinement du pharmacophore et l'identification de nouvelles structures chimiques pour les ligands. C'est donc dans ce cadre que la synthèse d'un analogue azoture du composé BDM_14500 a été entreprise. Cette approche devra ensuite laisser place à un travail d'optimisation raisonnée se basant sur les données acquises.

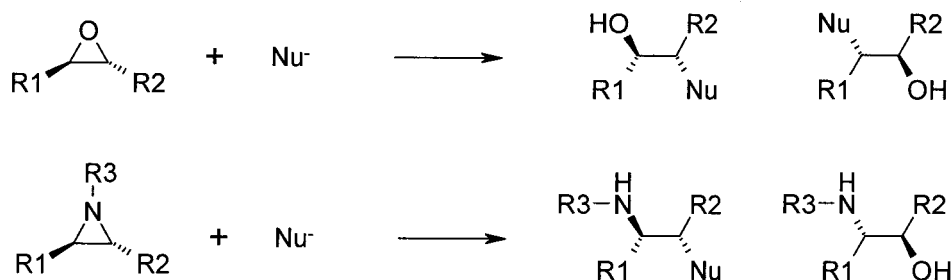
2 Synthèse in situ de ligand d'EthR par cycloaddition de Huisgen : « Click chemistry »

2.1 Principe

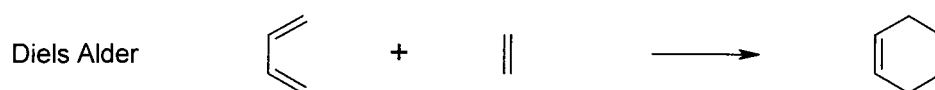
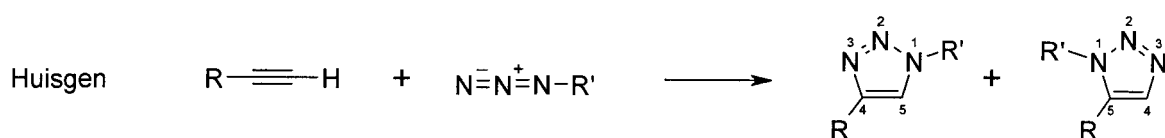
La notion de « Click chemistry » fut évoquée pour la première fois en 2001 par Kolb, Finn et Sharpless¹⁴³. Par ce terme, un ensemble de réactions sélectives, quantitatives, hautement reproductibles et faciles à mettre en œuvre a été décrit. Ces réactions permettent la synthèse de nouveaux composés par assemblage de diverses sous-unités facilement accessibles. Les réactions décrites correspondant à ces critères sont l'ouverture de cycles, tels que les époxydes et les aziridines, les réactions de cycloadditions et la protection des fonctions carbonyles (schéma 8).

¹⁴³ Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, K. Barry Sharpless. *Angewandte Chemie International Edition* 2001, 40, 2004-21.

Ouverture de cycle époxyde et aziridine



Cycloadditions



Protection carbonyles

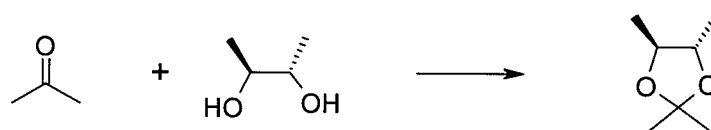


Schéma 8: Réactions de click chemistry selon Kolb *et al*¹⁴³

La réaction de cycloaddition dipolaire de Huisgen¹⁴⁴ entre alcynes et azotures devint la plus célèbre, et le terme « click chemistry » est désormais souvent appliqué à cette réaction.

La réaction de cycloaddition de Huisgen consiste en la synthèse de dérivés comportant un hétérocycle 1,2,3-triazole par réaction d'un alcyne avec un azoture. Deux composés sont ainsi synthétisables : le dérivé substitué en positions 1 et 4 appelé *anti*, et le dérivé substitué en positions 1 et 5 appelé *syn* (Schéma 9).

¹⁴⁴ Huisgen, *Proceedings of the Chemical Society* 1961, 357-96

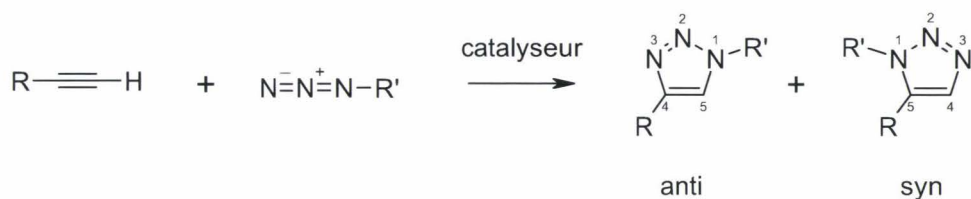


Schéma 9: Cycloaddition [3 + 2] de Huisgen

Cette réaction est extrêmement favorisée d'un point de vue thermodynamique (> 50 kcal/mol), car la structure 1,2,3-triazole est d'une grande stabilité. Néanmoins, l'énergie d'activation nécessaire à ce couplage est élevée (25 kcal/mol), et la réaction est extrêmement lente à température ambiante. La cinétique peut cependant être fortement augmentée si les deux partenaires sont mis à proximité dans une cage moléculaire^{145,146} (Figure 73).

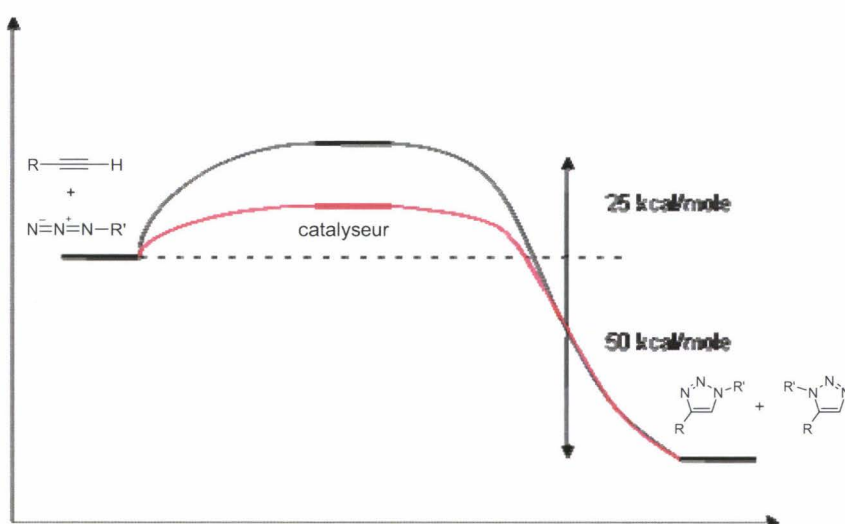


Figure 73 : Diagramme énergétique de la cycloaddition [3 + 2] de Huisgen en l'absence (noir) et en présence de catalyseur (rouge)

En synthèse chimique, un chauffage modéré pendant une longue durée donne un mélange équimolaire des dérivés *syn* et *anti*. L'utilisation du cuivre au degré d'oxydation +I comme catalyseur permet l'obtention sélective de la forme *anti*¹⁴⁷.

¹⁴⁵ Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Manimaran, T. L. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3619-20.

¹⁴⁶ Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Adhya, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5302-8.

¹⁴⁷ Vsevolod V. Rostovtsev, Luke G. Green, Valery V. Fokin, K. Barry Sharpless. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-99.

Le mécanisme proposé de ce couplage implique la formation initiale d'un cuprate d'alcyne (**I**) qui réagit avec l'azoture pour former l'espèce intermédiaire triazolure-cuprate (**II**), libérant finalement le composé 1,2,3-triazole *anti* désiré (Schéma 10)¹⁴⁸. Par la suite, l'utilisation de complexes du ruthénium a été décrite pour l'obtention majoritaire du dérivé *syn*¹⁴⁹.

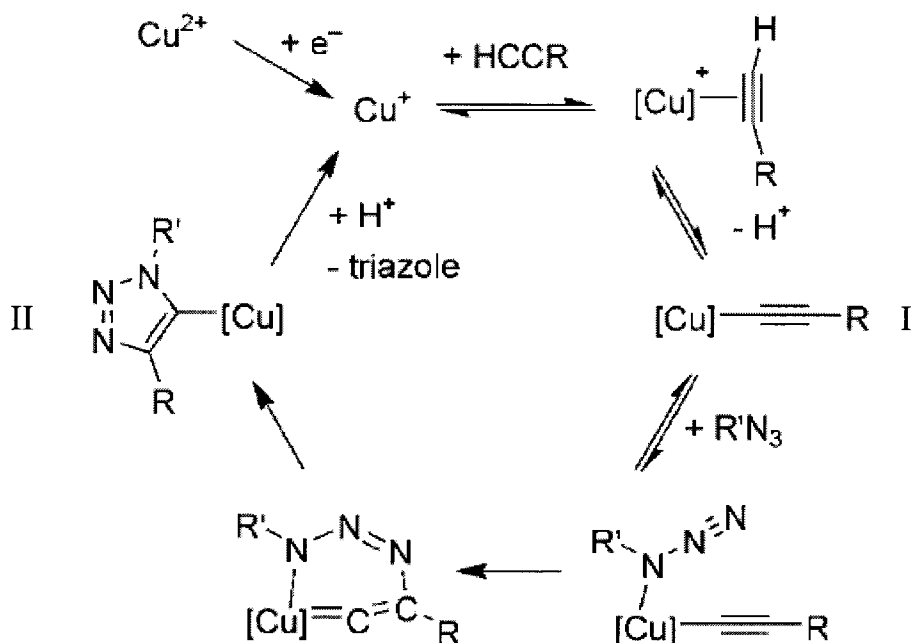


Schéma 10: Mécanisme proposé de la cycloaddition [3 + 2] de Huisgen selon Nolte *et al*¹⁴⁸

Plus récemment, la notion de « click chemistry » *in situ* a été développée. La catalyse de cette réaction n'est alors plus réalisée à l'aide de métaux, mais grâce à une protéine cible. Le recrutement et le rapprochement des deux fragments complémentaires, azoture et alcyne, dans un site accessible de la protéine, favorise la réaction irréversible de 1,2,3-triazole *syn* et/ou *anti*. Cette stratégie s'appuie sur la sélection spécifique de certains fragments par la protéine cible, permettant la synthèse *in situ* de ligands plus affins. De par leur inertie vis-à-vis des biomolécules et l'absence de libération d'éléments parasites dans le milieu, les fonctions azoture et alcyne se sont révélées particulièrement intéressantes dans cette stratégie. Le premier exemple de click chemistry *in situ* fut décrit pour la découverte d'inhibiteurs

¹⁴⁸ Christoph Nolte, Peter Mayer, Bernd F. Straub. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 2101-3.

¹⁴⁹ Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-9.

d'acétylcholinestérase (AChE)¹⁵⁰ (Schéma 11). La synthèse d'analogues alcyne et azoture de deux inhibiteurs connus de cette enzyme (tacrine et phenanthridinium) interagissant avec deux sites proches a permis la validation de ce concept.

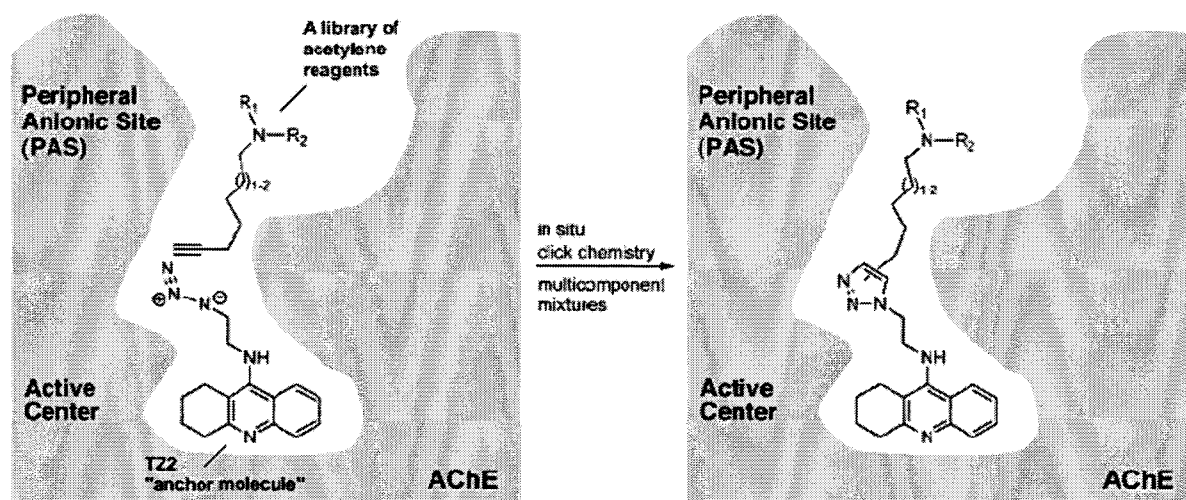


Schéma 11: Principe de la click chemistry *in situ* au sein de l'AChE selon Krasinski *et al*¹⁵³

Quatre composés 1,2,3-triazoles possédant une activité très importante et se positionnant dans le site selon le modèle établi ont ainsi pu être identifiés^{151,152}. Par la suite, le couplage d'un analogue azoture de la tacrine avec une gamme d'alcyne, n'ayant qu'une faible affinité pour l'AChE, a permis la découverte d'autres inhibiteurs totalement inédits¹⁵³. L'optimisation de l'affinité par usage de la click chemistry est donc également envisageable. Parallèlement, des inhibiteurs d'anhydrase carbonique et de la protéase d'HIV-1 ont également été identifiés selon une approche similaire^{154,155}. Ce dernier exemple est particulièrement intéressant, car les

¹⁵⁰ Warren G. Lewis, Luke G. Green, Flavio Grynszpan, Zoran Radic, Paul R. Carlier, Palmer Taylor, M. G. Finn, K. Barry Sharpless. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1053-7.

¹⁵¹ Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radic, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809-18.

¹⁵² Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 1449-54.

¹⁵³ Krasinski, A.; Radic, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686-92.

¹⁵⁴ Vani P. Mocharla, B. C., Lac V. Lee, Stefanie Röper, K. Barry Sharpless, Chi-Huey Wong, Hartmuth C. Kolb *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 116-20.

¹⁵⁵ Matthew Whiting, J. M., Ying-Chuan Lin, Steven M. Silverman, William Lindstrom, Arthur J. Olson, Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, K. Barry Sharpless, John H. Elder, Valery V. Fokin *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1435-9.

fragments sélectionnés n'avaient que des affinités moyennes, voire très faibles, pour la protéase (CI₅₀ de 4.2 et supérieure à 100 µM). Leur cycloaddition *in situ* a néanmoins permis la formation d'un composé possédant une CI₅₀ de 6 nM.

2.2 Mise en œuvre et déroulement des expériences de click chemistry *in situ* au sein de la protéine EthR

Le travail réalisé par Whiting *et al*¹⁵⁵ valide le concept qu'un composé faiblement affiné pour une protéine peut permettre la découverte d'inhibiteurs beaucoup plus actifs en évitant de longues étapes de synthèse, ainsi qu'un criblage. Cette preuve de concept est apparue très intéressante pour l'optimisation de ligands de la protéine EthR. En effet, le screening primaire réalisé a permis la découverte de composés faiblement affins pour la protéine. En synthétisant des analogues de ces composés avec une fonction alcyne ou azoture, la protéine pourrait être capable de produire *in situ* des composés encore plus intéressants. Cette stratégie est renforcée par le fait que le domaine de liaison à un ligand de EthR est une longue cavité étroite. Cette similitude avec le site actif de l'AChE devrait être favorable au rapprochement des fragments synthétiques (Schéma 12). La synthèse d'analogues du composé BDM_14500 a donc été entreprise.

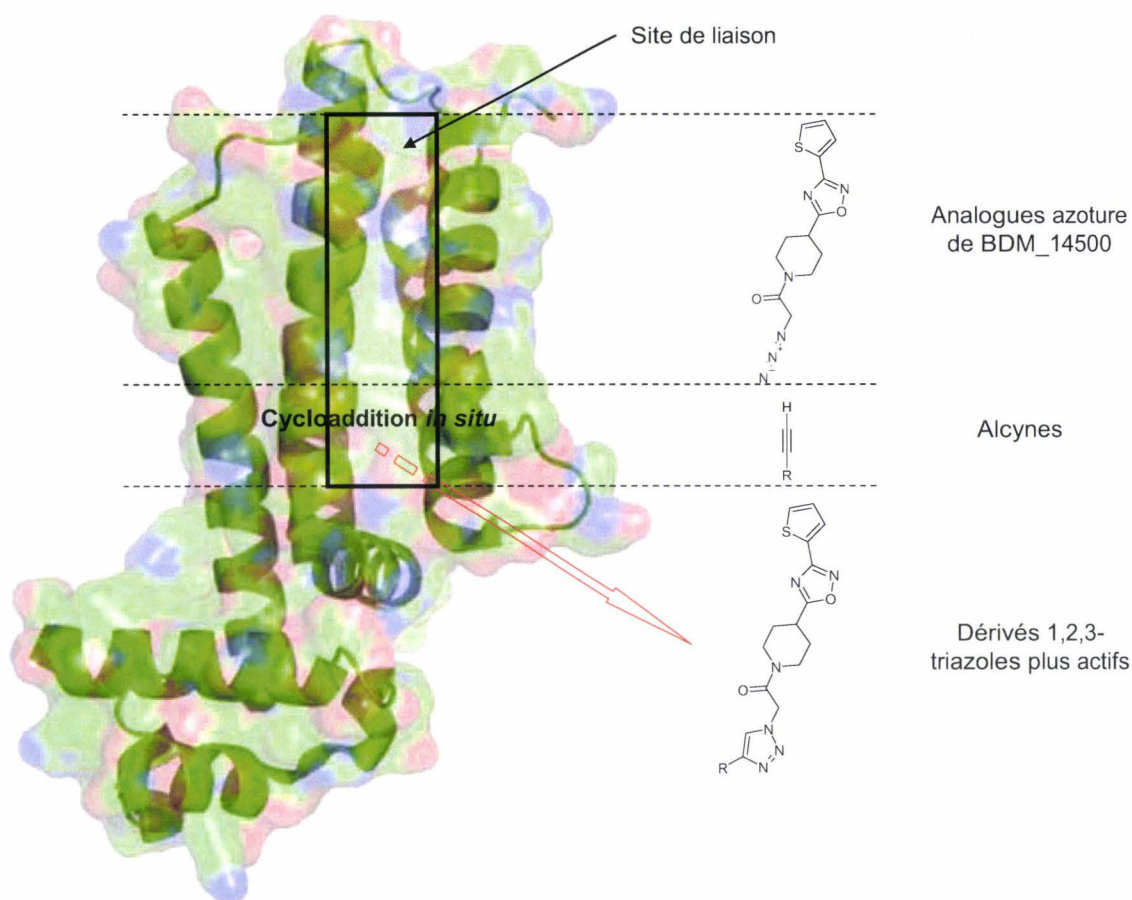


Schéma 12: Principe de la click chemistry *in situ* au sein d'EthR avec des analogues envisageables de BDM_14500 (un seul monomère a été représenté)

2.2.1 Synthèse et évaluation d'un analogue azoture du composé BDM_14500

2.2.1.1 Synthèse du composé BDM_14801

Dans l'optique de découvrir de nouveaux ligands de la protéine EthR par click chemistry *in situ*, la synthèse d'un analogue acétylazoture du composé de référence BDM_14500 a été réalisée (schéma 13).

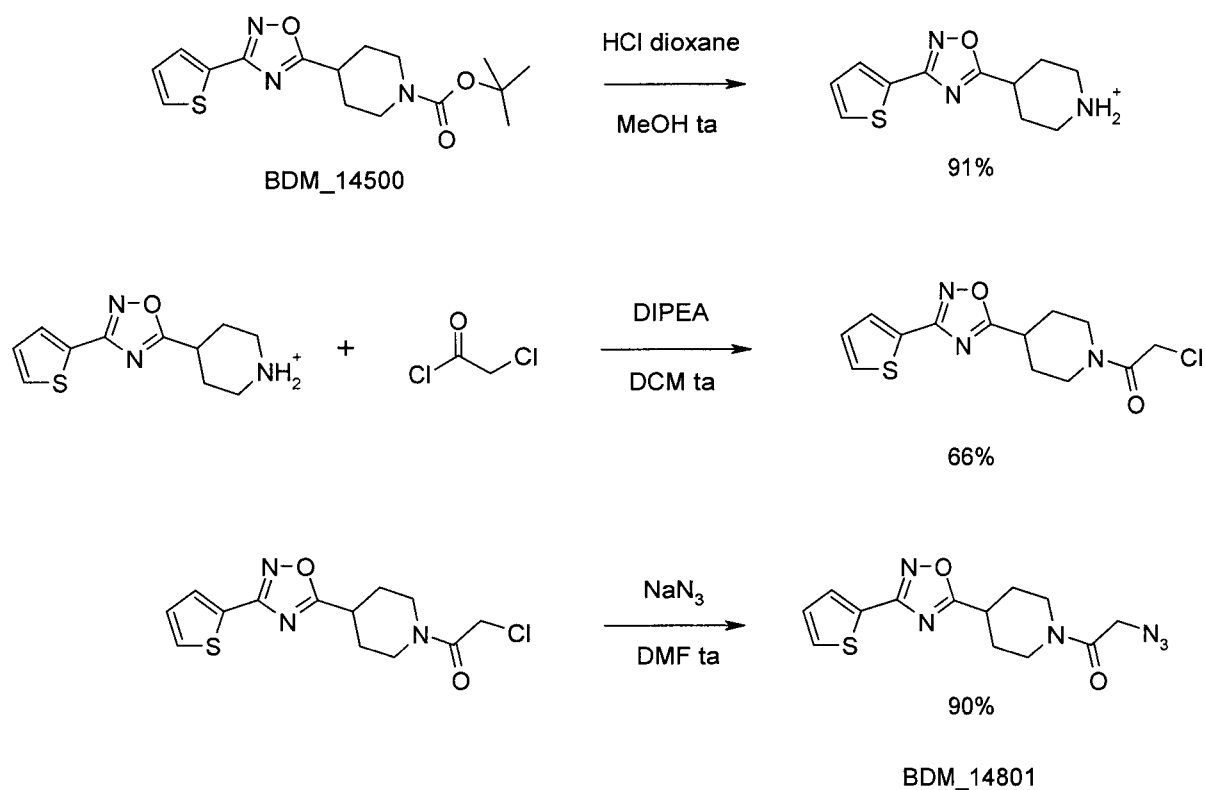


Schéma 13: Synthèse du composé BDM_14801 à partir de BDM_14500

Le clivage de la fonction *t*Boc du composé BDM_14500 a été réalisé dans le méthanol par ajout d'un excès d'une solution d'acide chlorhydrique 4 N dans le 1,4-dioxane. L'intermédiaire déprotégé a été obtenu sous forme de chlorhydrate par filtration avec un rendement de 91 %. Ce composé a ensuite été couplé avec le chlorure de chloracétyle en présence de diisopropyl-éthylamine pour donner après purification par chromatographie flash l'intermédiaire acétyl-chloré attendu avec un rendement de 66 %. Ce dernier a finalement été mis en présence d'un excès d'azoture de sodium dans le diméthylformamide pour donner l'analogue souhaité BDM_14801 avec un rendement de 90 %.

Avant toute utilisation du composé azoture BDM_14801 dans des expériences de click chemistry *in situ*, il fallait s'assurer que ce dernier restait bien un ligand de la protéine EthR. Sa capacité à inhiber l'interaction protéine/ADN a donc été évaluée par RPS.

2.2.1.2 Evaluation de la capacité inhibitrice du composé azoture BDM_14801 par RPS

La courbe dose-réponse du composé BDM_14801 a été réalisée par RPS dans des conditions rigoureusement identiques à celles utilisées précédemment (puce CM5 fonctionnalisée par 20

RU d'ADN, [EthR] = 350 nM). Une CI_{50} de 1.36 μM a ainsi pu être mesurée, ce qui correspond à un gain d'activité d'un facteur 28 par rapport à BDM_14500 possédant une CI_{50} de 38 μM (cf. chapitre 2, section 3.4.2) (Figure 74).

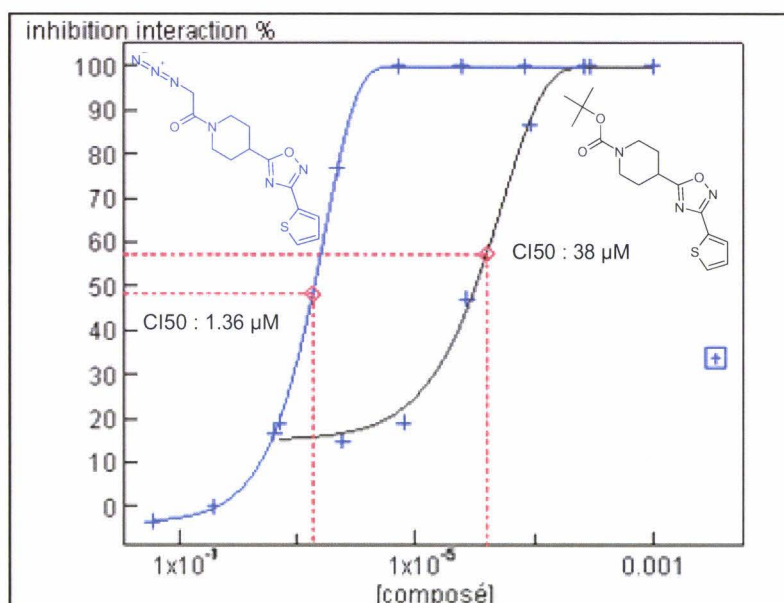


Figure 74 : Superposition des courbes dose réponse de l'inhibition EthR / promoteur *ethA* obtenues par RPS avec les composés BDM_14801 (bleu) et BDM_14500 (noir). Puce CM5 fonctionnalisée avec 20 RU du fragment IG-106. [EthR] = 350 nM

La synthèse d'un analogue azoture du composé BDM_14500, dans le but de réaliser des couplages de cycloaddition de Huisgen *in situ*, a donc permis la découverte fortuite d'un dérivé encore plus actif. Devant un tel résultat, il était intéressant d'établir la nature exacte des interactions établies entre ce composé et la protéine par des études radiocristallographiques. Ces données pourraient également être très utiles dans le choix des alcynes à utiliser pour la suite de l'expérience de click chemistry *in situ*.

2.2.1.3 Etablissement de la structure radiocristallographique du composé BDM_14801 au sein de la protéine EthR

Le composé BDM_14801 a été incubé en présence de la protéine EthR dans des conditions similaires à celles utilisées pour la co-cristallisation de BDM_14500 ([BDM_14500] = 10 * [EthR]). Néanmoins, la formation de cristaux s'est révélée être beaucoup trop rapide et des phénomènes de maillage ont empêché l'obtention d'un jeu de données cohérent. Le ratio

[composé] / [EthR] a donc été réduit à un, de façon à permettre une cristallisation contrôlée de la protéine.

La structure radiocristallographique du composé BDM_14801 au sein de la protéine a ainsi pu être établie avec une résolution de 1.90 Å.

Par rapport aux données radiocristallographiques précédemment obtenues avec le composé BDM_14500, le composé azoture BDM_14801 se lie inversement à la protéine selon un angle de 180° (Figure 75, droite). En effet, l'Asn-179 n'interagit plus avec l'hétérocycle 1,2,4-oxadiazole, mais interagit avec la fonction carboxamide de la pipéridinamide par formation d'une liaison hydrogène. Cette dernière est caractérisée par une distance de 2.97 Å entre les hétéroatomes. Le cycle phényle de la Phe-110 est situé à 3.8 Å du plan de la liaison carboxamide et ne réalise plus de π stacking avec l'hétérocycle 1,2,4-oxadiazole (Figure 75, gauche).

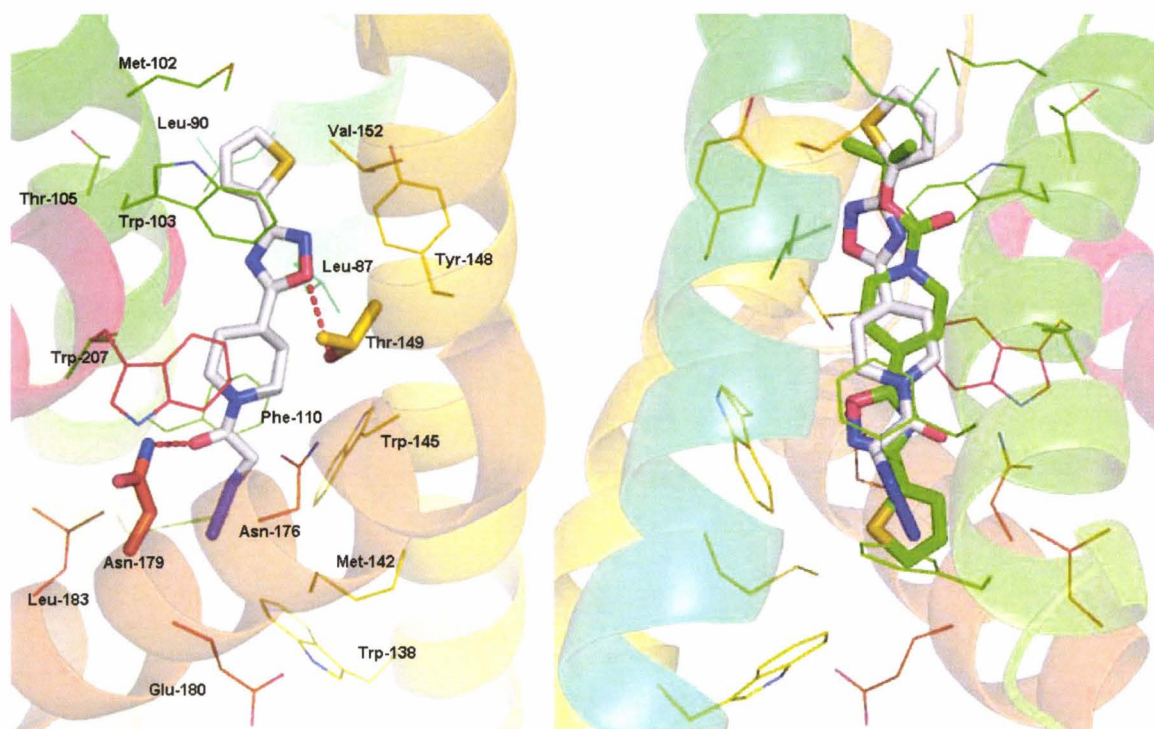


Figure 75 : Gauche : Structure radiocristallographique du composé BDM_14801 (blanc) co-cristallisé en présence de la protéine EthR. Asn-179 (orange) et Thr-149 (jaune) représentés en bâtonnet. Liaison hydrogène entre la fonction carboxamide et Asn-179 en pointillé rouge. Interaction entre la Thr-149 et l'1,2,4-oxadiazole en pointillé bleu.

Droite : superposition du composé BDM14500 au sein de la structure radiocristallographique de EthR en présence du composé BDM_14801

Le cycle 1,2,4-oxadiazole se retrouve à environ 4 Å des dérivés Leu-87, Gly-106 et Thr-149 et établit une liaison hydrogène de faible énergie avec ce dernier résidu (Figure 75, gauche). Cette liaison est caractérisée par une distance de 3.52 Å entre les hétéroatomes. Il est probable que cette dernière interaction, en plus de la formation d'une liaison hydrogène entre l'Asn-179 et la fonction carboxamide, explique le changement de positionnement et la différence d'affinité observable entre les composés BDM_14500 et BDM_14801.

Le groupement azoture se situe dans la poche hydrophobe de la partie inférieure de la protéine, où le thiophène du composé BDM_14500 interagissait auparavant (Figure 75, droite). Les acides aminés se situant à sa proximité (4 à 5 Å) possèdent tous des résidus hydrophobes (Phe-114, Met-142, Trp-145 et Leu-183), ce qui laisse supposer que l'interaction mise en jeu est de type Van der Waals ou π stacking (Figure 76).

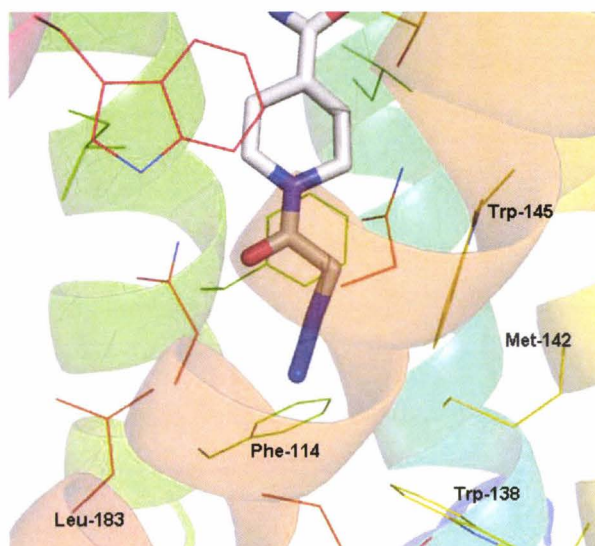


Figure 76 : Structure radiocristallographique du composé BDM_14801 (blanc) co-cristallisé en présence de la protéine EthR. Environnement hydrophobe du groupement azoture

Le cycle thiophène se retrouve dans la partie supérieure de la cavité (où le groupement *tertio*-butyle de BDM_14500 était précédemment logé) et interagit avec les acides aminés hydrophobes Leu-90, Met-102, Trp-103, Tyr-148, Val-152 se trouvant dans une sphère de 5 Å (Figure 77).

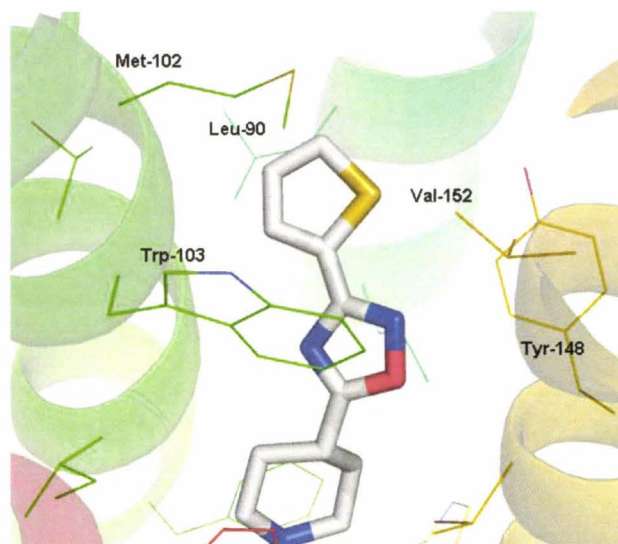


Figure 77 : Structure radiocristallographique du composé BDM_14801 (blanc) co-cristallisé en présence de la protéine EthR. Environnement hydrophobe du cycle thiophène

La Phe-184 reste dans une configuration similaire à celle observée en présence du composé BDM_14500 et referme toujours le domaine de liaison dans sa partie inférieure. La distance

$\alpha 3 - \alpha 3'$ mesurée entre les deux Phe-63 est de 50 Å et n'est pas compatible avec une fixation à l'ADN.

2.2.1.4 Bilan sur la synthèse du composé BDM_14801

La synthèse d'un analogue azoture du composé BDM_14500 a fortuitement conduit à la découverte d'un dérivé beaucoup plus affiné pour la protéine EthR. Des études radiocristallographiques ont par la suite montré que ce gain d'activité était lié à la présence de deux liaisons hydrogène, provoquant un retournement du composé au sein du domaine de régulation. La conséquence majeure de ce changement de configuration est désormais le positionnement de l'azoture vers la partie inférieure du site de liaison. Ces observations offrent de belles perspectives dans la stratégie de click chemistry *in situ* envisagée, puisque le composé BDM_14801 possède une bonne affinité (IC50 : 1.36 μ M) et est parfaitement orienté au sein du domaine de régulation (Figure 75 gauche). Une sélection et des synthèses d'alcyne ont donc été mises en œuvre.

2.2.2 Description et synthèse des alcynes mis en jeu lors du couplage de click chemistry *in situ*

L'environnement de la partie inférieure du site de liaison étant particulièrement apolaire, les alcynes sélectionnés ont été choisis pour leur capacité à mettre en jeu des interactions hydrophobes. Des groupements tels que des cycles aromatiques ou des chaînes carbonées saturées ont ainsi été sélectionnés. Soixante alcynes vrais commerciaux et synthétiques furent retenus afin de permettre le recouvrement d'une large gamme de structures capables d'interagir avec le domaine de liaison de la protéine. Quatre modèles furent ainsi explorés :

- des alcynes aliphatiques et aromatiques commerciaux (figure 78)

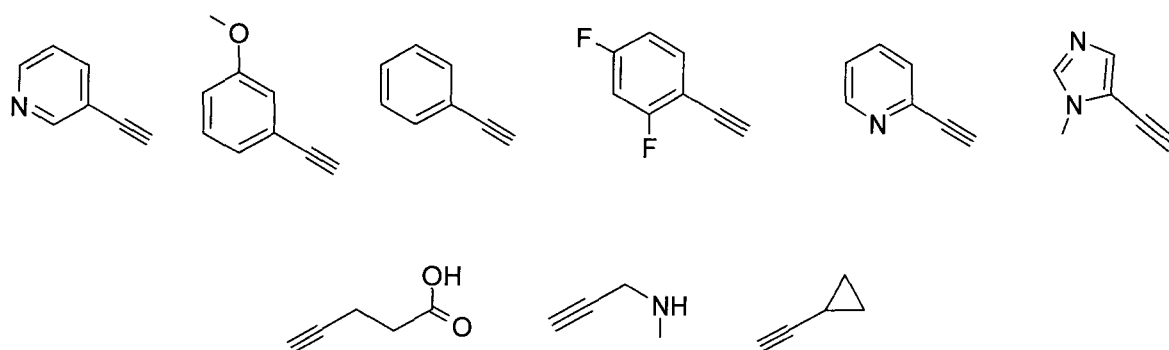


Figure 78 : Structures des alcynes commerciaux sélectionnés

- des alcynes dérivés du propargylamide, obtenus par couplage de la propargylamine en présence de diisopropyléthylamine et de divers chlorures d'acides dans le dichlorométhane (Schéma 14).

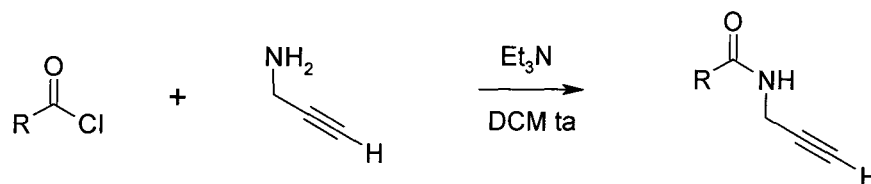


Schéma 14: Synthèse d'alcynes dérivés du propargylamide

- des alcynes dérivés de la propargylamine, obtenus par amination réductrice entre la *N*-méthylpropargylamine et plusieurs aldéhydes en présence de triacétoxyborohydrure de sodium dans le dichlorométhane (Schéma 15).

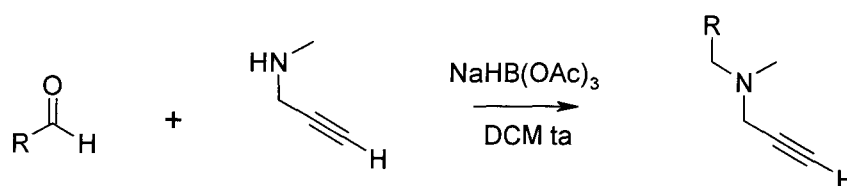


Schéma 15: Synthèse d'alcynes dérivés de la propargylamine

- des alcynes dérivés de la propargyl-sulfonamide, obtenus par couplage de la propargylamine en présence de diisopropyléthylamine et de divers chlorures de sulfonyle dans le dichlorométhane (Schéma 16).

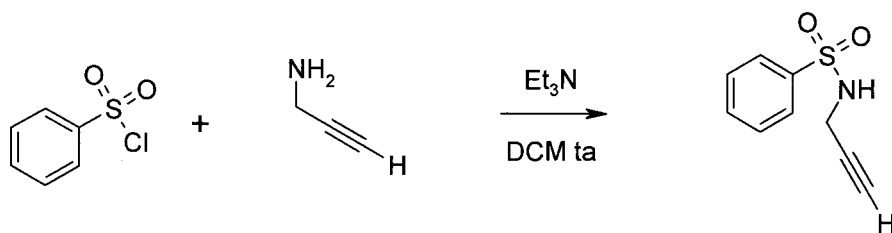
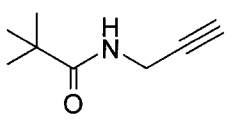
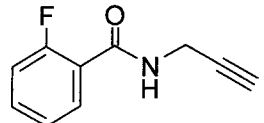
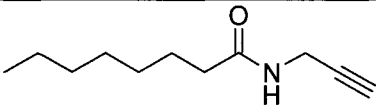
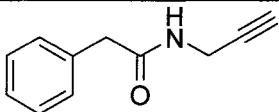
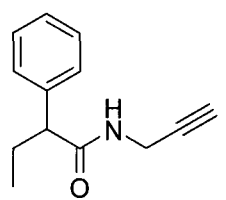
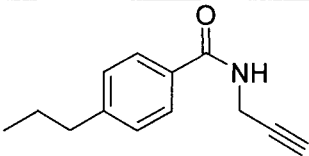
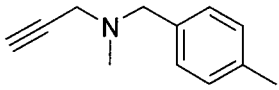
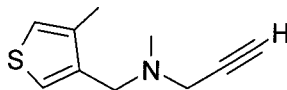
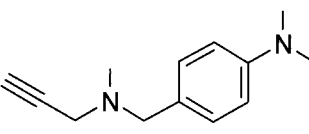
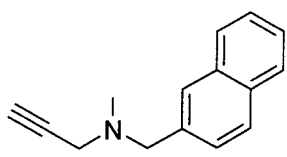
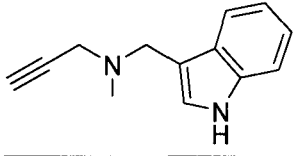
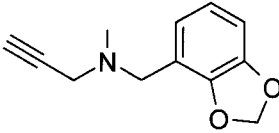
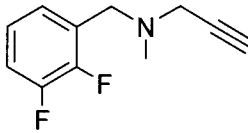
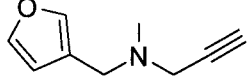
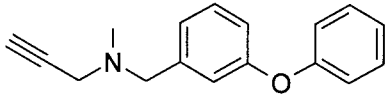
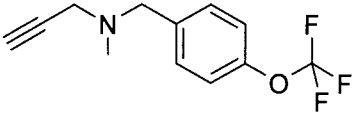
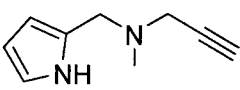
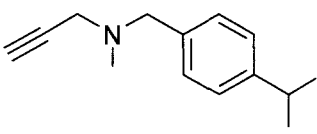
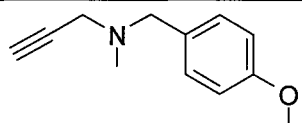
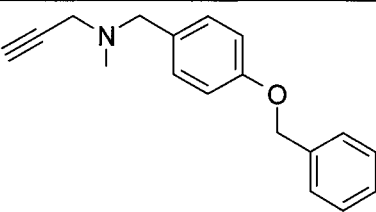
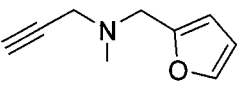
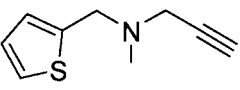


Schéma 16: Synthèse d'alcynes dérivés de la propargylsulfonamide

Les structures des alcynes synthétisés, ainsi que leurs rendements sont résumés dans le tableau 3.

structure	rendement	structure	rendement
	88		89
	35		70
	82		75
	41		56
	55		54
	65		48
	48		17
	66		59

	70		49
	66		81
	97		99
	90		37
	67		36
	67		94
	80		75
	26		80
	86		32
	90		28
	85		85

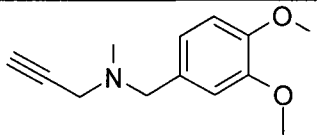
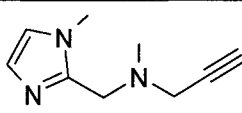
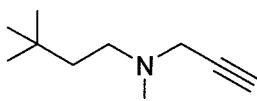
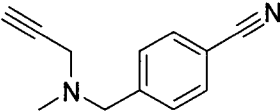
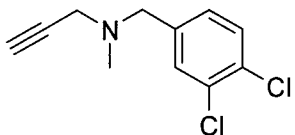
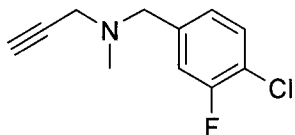
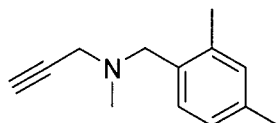
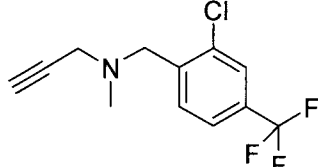
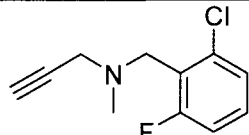
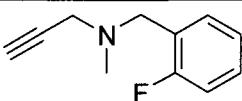
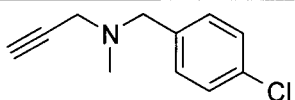
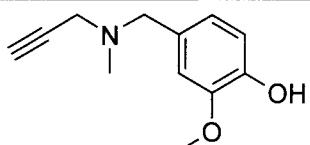
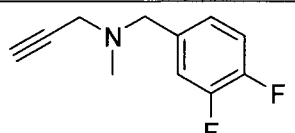
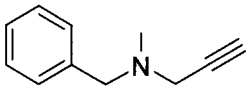
	96		49
	74		91
	44		67
	56		66
	86		92
	78		81
	80		commercial

Tableau 3: Structures et rendements des alcynes synthésés en vue des expériences de click chemistry *in situ*

2.2.3 Cycloadditions de Huisgen *in situ* BDM_14801 / alcynes

2.2.3.1 Formation des clusters d'alcynes servant aux expériences de click chemistry *in situ*

Les soixante alcynes ont été triés en six groupes de dix. Ce regroupement a été réalisé afin de permettre une détection sélective de chacun des alcynes et de leur produit de couplage avec un même azoture. Cette détection peut s'effectuer, soit en fonction de leur temps de rétention HPLC, soit par recherche en mode SIM par LCMS-MS. La figure 82 représente la superposition des chromatogrammes de dix alcynes d'un même cluster à 215 nm. Tous les composés sont parfaitement identifiables indépendamment les uns des autres (figure 79 gauche). De plus, leur couplage en présence d'iodure de cuivre dans l'acétonitrile avec un

même azoture (le *para tertio*-butyl-benzylazoture) donne bien dix composés 1,2,3-triazole tous parfaitement détectables sélectivement par méthode SIM (figure 79, droite).

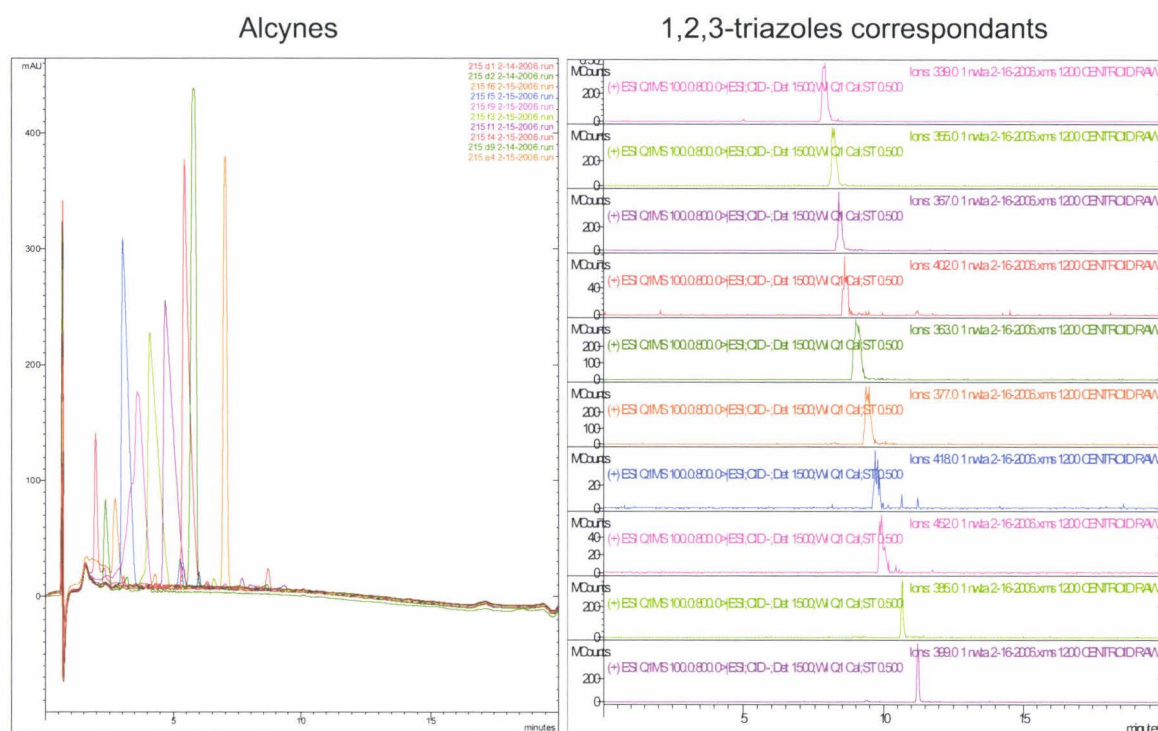


Figure 79 : Gauche : superposition des chromatogrammes à 215 nm des dix alcynes d'un même cluster
Droite : détection par méthode SIM de chaque dérivé 1,2,3-triazole formé par couplage des alcynes précédents avec le *para tertio*-butyl-benzylazoture

2.2.3.2 Réalisation des expériences de click-chemistry *in situ*

Afin de vérifier si EthR était capable d'induire un couplage entre le composé BDM_14801 et un ou plusieurs des alcynes obtenus, la protéine a été mise en contact avec ces composés. Les conditions utilisées sont les suivantes : [alcyne] = 40 μ M, [BDM_14801] = 125 μ M, dans 600 μ L de tampon Tris 10 mM (7.5), NaCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, méthanol 1%, 96 heures à 37°C. Quatre séries d'expériences ont été réalisées en parallèle :

- un mélange alcynes / BDM_14801 en présence de EthR (5 μ M)
- un mélange alcynes / BDM_14801 en présence de sérum albumine bovine (BSA) (5 μ M)
- un mélange alcynes / BDM_14801 sans protéine
- un mélange alcynes / BDM_14801 en présence de CuI (4 mM) dans l'acétonitrile

Le but de ces expériences est d'observer la production sélective de dérivés 1,2,3-triazole par la protéine EthR. L'utilisation de BSA dans la seconde série, ainsi que l'absence de protéine dans la troisième, constituent des contrôles négatifs et visent à confirmer cette sélectivité. La dernière série d'expériences, en présence d'iodure de cuivre dans l'acétonitrile a pour but de caractériser l'ensemble des composés 1,2,3-triazole *anti* susceptibles de se former dans les milieux et de comparer les éventuels produits observés avec leurs temps de rétention. Leur présence et leur identification sont contrôlées par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse qui recherche des ions sélectionnés par méthode SIM (selected ion mode monitoring) (LCMS-SIM). Après 96 heures à 37°C, les milieux sont analysés afin de constater ou non l'apparition de produit de couplage.

2.2.3.3 Résultats des expériences de click-chemistry *in situ*

La production « EthR spécifique » de trois composés 1,2,3-triazole a été décelée. Les dérivés formés possèdent un temps de rétention et un ion moléculaire de masse identique à ceux obtenus en présence d'iodure de cuivre (Figure 80). Cela permet donc bien la détermination de leurs structures en configuration *anti*, ce qui n'est guère surprenant en raison des grandes étroitesse et linéarité du domaine de liaison de la protéine EthR.

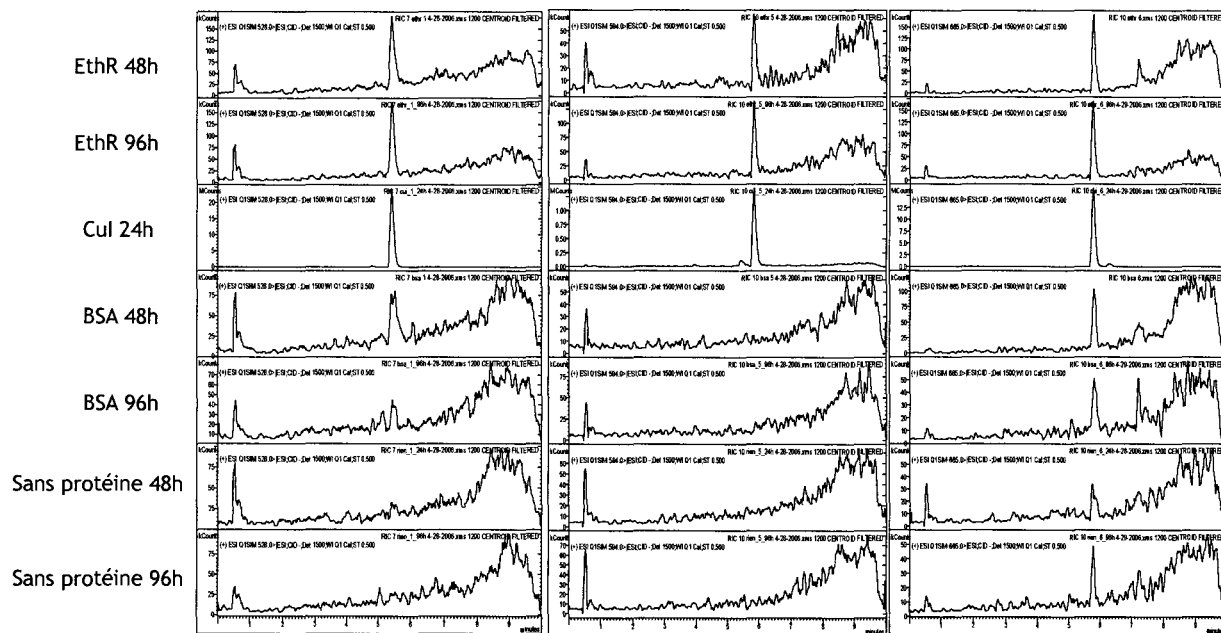
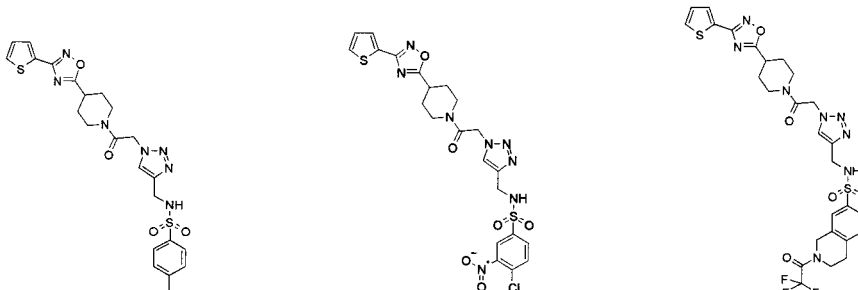


Figure 80 : Observation de la formation des trois composés 1,2,3-triazoles par click chemistry *in situ* en présence d’EthR. Détection réalisée par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse et recherche des ions sélectionnés par méthode SIM.

Ce résultat est particulièrement intéressant, car sur les soixante alcynes utilisés, seuls ceux possédant une fonction arylsulfonamide ont réagi. Ce groupement est donc sûrement impliqué dans une interaction spécifique avec la protéine.

2.2.3.4 Confirmation de l’importance du groupement arylsulfonamide dans les expériences de click-chemistry *in situ*

Afin de confirmer ce résultat, un mélange de huit alcynes possédant une fonction arylsulfonamide et comprenant ceux utilisés lors de l’expérience précédente a été réalisé (Figure 81). Ce mélange a ensuite été mis en présence de BDM_14801 et de protéine EthR selon le protocole précédemment décrit.

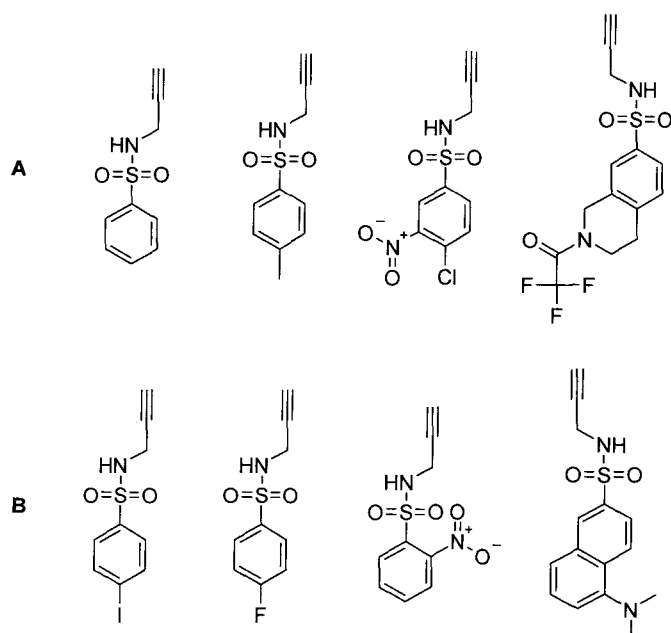


Figure 81 : Alcynes utilisés lors de la reconfirmation de l'expérience de click chemistry *in situ*

A : alcynes déjà utilisés lors des premières expériences

B : nouveaux alcynes

Après 24 heures d'incubation à 37°C, l'analyse du milieu a montré la production sélective de composés 1,2,3-triazoles attendus. Sur les huit dérivés envisageables, cinq ont été détectés dans le milieu et la présence des trois composés initialement détectés lors de la première expérience est à nouveau vérifiée. Parmi ces cinq composés, deux d'entre eux se sont révélés avoir été produits très majoritairement par la protéine : les composés BDM_14949 et BDM_14950 (Figures 82, 83). La structure *anti* du dérivé 1,2,3-triazole BDM_14949 formé a été confirmée par comparaison du milieu réactionnel de click chemistry *in situ* (figure 84 courbe verte) avec des milieux réactionnels obtenus par chauffage (courbe orange) et en présence de cuivre (courbe rouge). Ces derniers formant respectivement un mélange de deux régio-isomères et uniquement le dérivé en configuration *anti*, la formation sélective du dérivé 1,2,3-triazole *anti* est donc vérifiée. Cela est parfaitement cohérent avec la structure linéaire et étroite du domaine de liaison à la protéine.

Alcyne

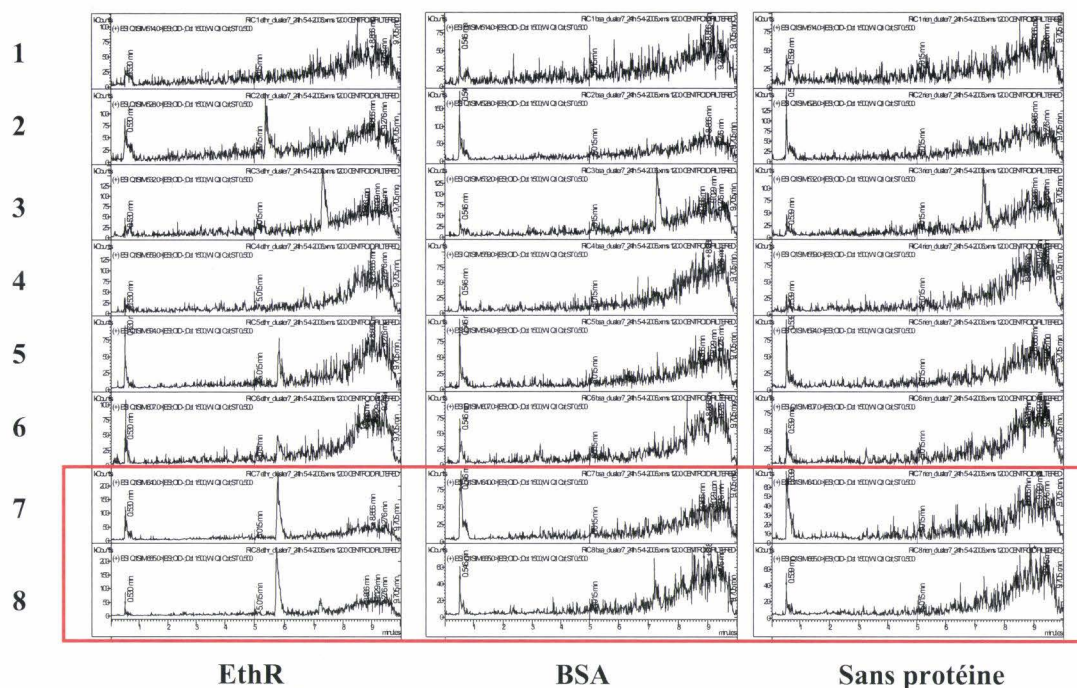


Figure 82 : Recherche de l'ion moléculaire des huit composés 1,2,3-triazoles attendus lors de l'expérience de click chemistry *in situ* en présence de EthR. Détection réalisée par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse et recherche des ions sélectionnés par méthode SIM. Composés formés majoritairement encadrés en rouge.

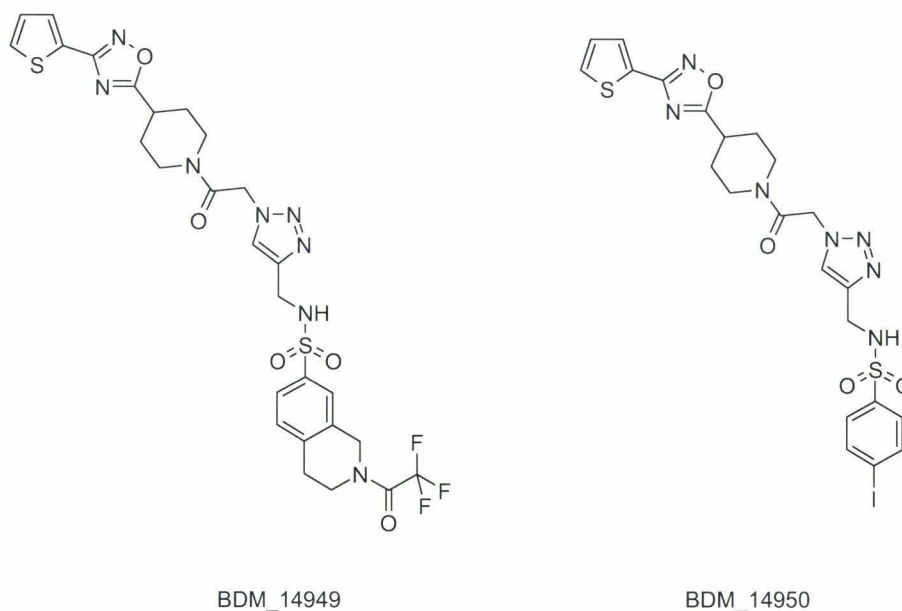


Figure 83 : Structures des composés BDM_1494 et BDM_1495 obtenus lors de la seconde expérience de click chemistry *in situ* avec des alcyne dérivés de la propargylsulfonamide et le composé BDM_14801

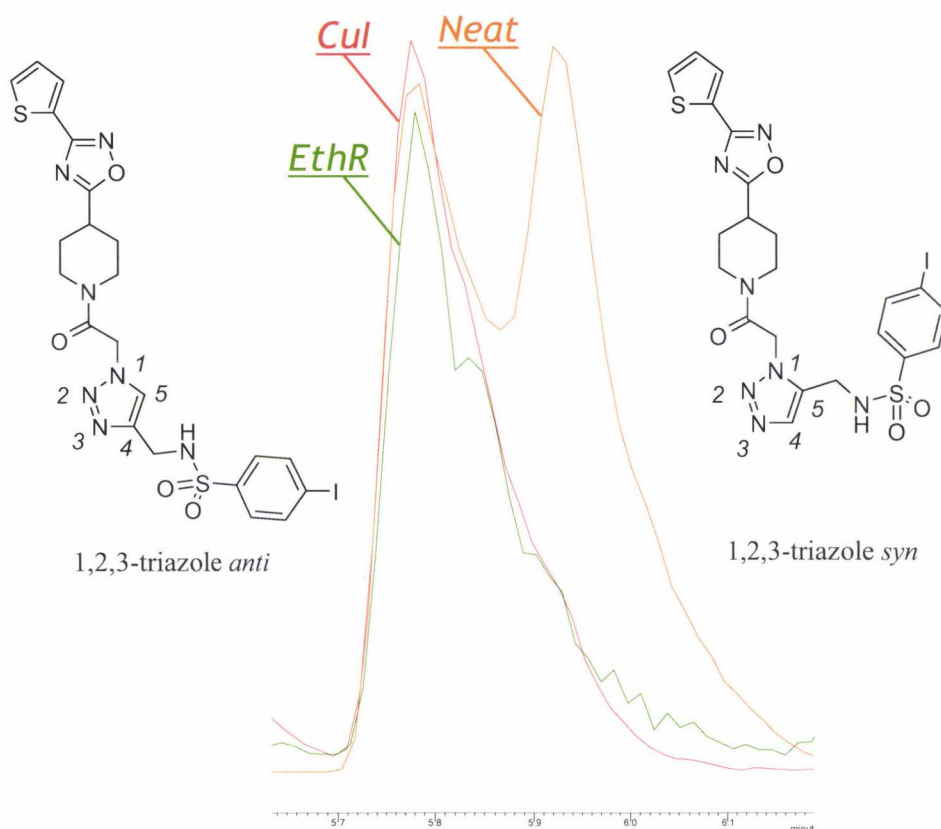


Figure 84 : Confirmation de la formation sélective du composé BDM_14949 au sein de EthR en configuration *anti* par rapport à l'analogue *syn*. Superposition du milieu réactionnel de click chemistry *in situ* en présence d'EthR (vert) avec le milieu réactionnel en présence de cuivre (rouge) et le milieu réactionnel obtenu après chauffage (orange). Détection réalisée par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse et recherche des ions sélectionnés par méthode SIM.

Les deux dérivés BDM_14949 et BDM_14950, ayant été formés très majoritairement par rapport aux autres composés, devraient posséder une plus grande affinité pour la protéine que leurs autres analogues. Il est cependant difficile à ce niveau d'attribuer le rôle de tel ou tel substituant dans l'affinité ligand/EthR.

Les expériences de click chemistry *in situ* ont permis la découverte de deux composés formés sélectivement au sein de la protéine EthR. Ce résultat extrêmement prometteur laisse entrevoir la découverte de composés particulièrement affins pour la protéine, ainsi qu'un gain d'information important dans les études de relation-structure-activité. En effet, la fonction arylsulfonamide semble jouer un rôle capital dans l'interaction ligand/protéine. Il était désormais nécessaire de resynthétiser ces composés, afin de pouvoir déterminer leur capacité inhibitrice de l'interaction EthR/promoteur *ethA*, ainsi que la nature des interactions mises en jeu par l'hétérocycle 1,2,3-triazole et la fonction arylsulfonamide.

2.2.4 Synthèse des composés 1,2,3-triazoles déterminés

Les composés BDM_14949 et BDM_14950 ont été synthétisés à partir du composé BDM_14801 et des alcynes correspondants par cycloaddition de Huisgen en présence d'une quantité catalytique d'iodure de cuivre dans l'acétonitrile¹⁵³. Leur isolement a été réalisé par filtration du milieu réactionnel pour donner les composés BDM_14949 et 14950 avec des rendements respectifs de 60 et 100 % (schéma 17).

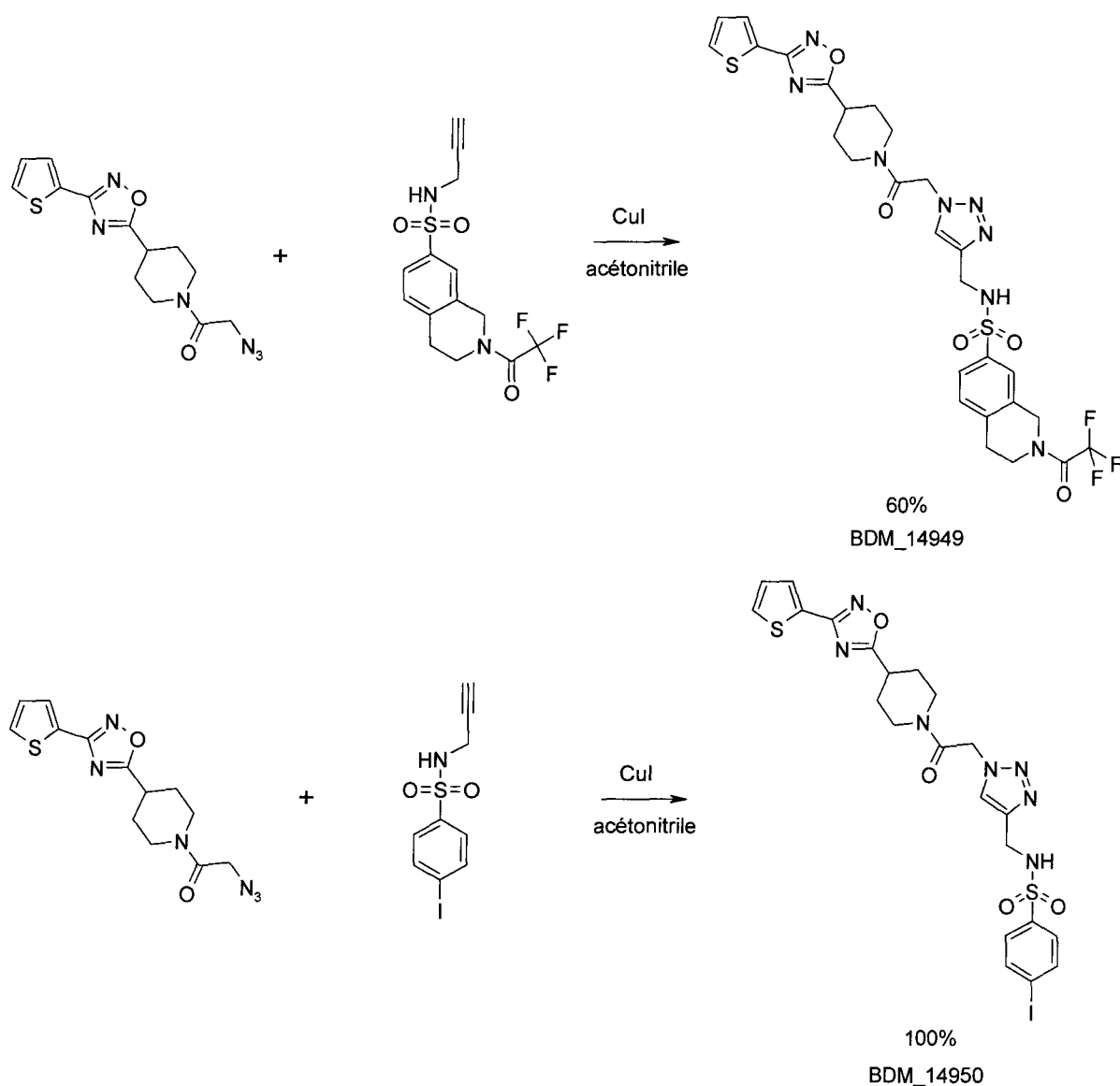


Schéma 17: Synthèse des composés BDM_14949 et BDM_14950 à partir de BDM_14801

2.2.5 Etudes des interactions entre EthR et les composés identifiés par click chemistry *in situ*

2.2.5.1 Optimisation des conditions utilisées pour la détermination par RPS des CI_{50}

Afin de valider entièrement le concept de click chemistry *in situ* au sein de EthR, les CI_{50} des composés BDM_14949, BDM_14950, ainsi que des deux alcynes ayant servi à leur synthèse (BDM_15048 et BDM_15056) ont également été déterminées. Les conditions utilisées pour l'établissement de ces courbes ont cependant été modifiées. En effet, la fonctionnalisation d'une puce CM5 par seulement 20 RU d'ADN biotinylé s'est révélée être source de problèmes :

- au niveau de l'altération accélérée de la fixation de la protéine sur la puce au cours du temps
- au niveau de la reproductibilité entre les injections, en raison de la faible concentration de protéine utilisée
- au niveau de l'interprétation des résultats, en raison d'un nombre important de faux positifs à cause des deux facteurs cités précédemment.

A l'extrême inverse, l'utilisation d'une puce CM5 fonctionnalisée avec 200 RU d'ADN a montré ses limites, en raison de la faible solubilité des produits testés. Afin de pouvoir évaluer les composés dans des conditions adéquates, une puce CM5 a été fonctionnalisée avec une charge d'ADN de 50 RU. Dans ces conditions, la concentration en protéine EthR utilisée dans chaque échantillon est de 540 nM. La valeur de CI_{50} précédemment obtenue pour le composé BDM_14801 n'est donc plus cohérente dans ces nouvelles conditions et a donc dû être redéterminée.

2.2.5.2 Evaluation de la capacité inhibitrice des composés déterminés par RPS

Les valeurs de CI_{50} obtenues et les courbes doses-réponses ainsi établies sont représentées dans les figures 85 et 86 :

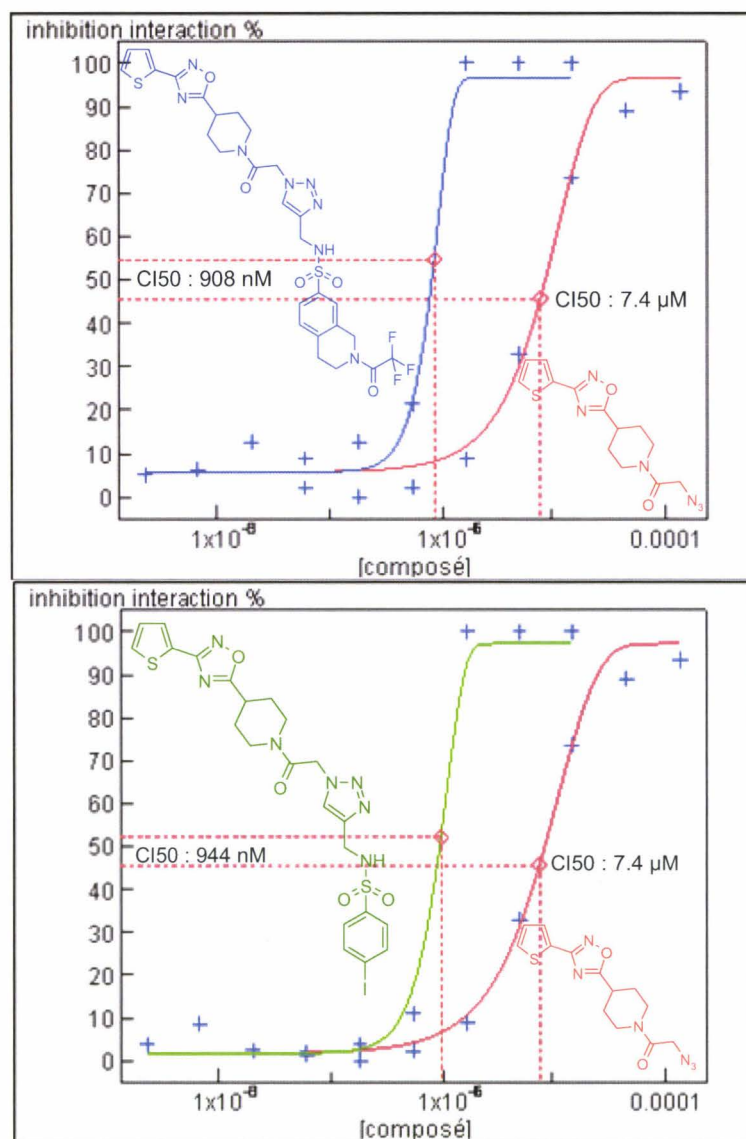


Figure 85 : Superposition de la courbe dose réponse de l'inhibition EthR / promoteur *ethA* obtenue avec le composé BDM_14801 (rouge) et les composés BDM_14949 (bleu) et BDM_14950 (vert).

Détermination de leur CI₅₀ par RPS. Puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU du fragment IG-106. [EthR]
= 540 nM

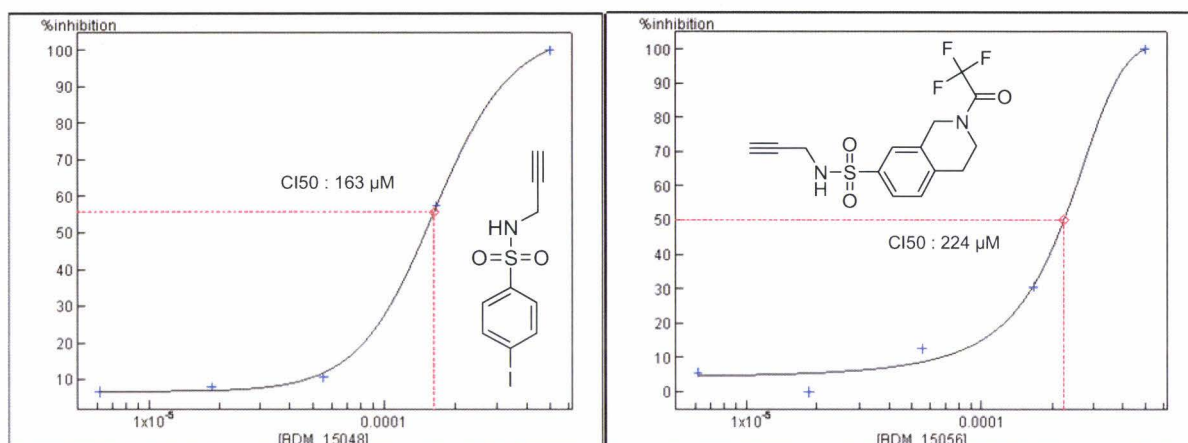


Figure 86 : Courbes doses réponses des composés alcynes BDM_15048 et BDM_15056.

Détermination de leur CI₅₀ par RPS. Puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU du fragment IG-106. [EthR] = 540 nM

Les résultats observés montrent parfaitement la validité du concept de click chemistry *in situ* au sein de la protéine EthR. En effet, les composés BDM_14949 et BDM_14950 présentent une activité environ huit fois supérieure à celle du composé BDM_14801 et environ deux cent fois supérieure à celle des alcynes BDM_15048 et BDM_15056. La protéine EthR a donc bien permis la production de composés 1,2,3-triazole possédant une activité bien supérieure à celle des fragments synthétiques ayant servi à leur production. Il était désormais intéressant d'étudier plus précisément le rôle joué par les nouveaux groupements chimiques mis en jeu dans l'interaction ligand/protéine.

2.3 Etude radiocristallographique du composé 1,2,3-triazole BDM_14950 déterminé lors des expériences de click chemistry *in situ*

La structure cristallographique du composé BDM_14950 au sein de EthR a été déterminée selon des conditions identiques à celles utilisées pour BDM_14801.

Sur les deux composés identifiés par click chemistry, seule la structure radiocristallographique du composé BDM_14950 au sein de EthR a pu être déterminée avec une résolution de 1.9 Å. Cette dernière révèle plusieurs éléments intéressants.

La superposition de la structure obtenue avec le dérivé BDM_14801 montre une très forte conservation dans le positionnement des éléments communs aux deux composés au sein du domaine de liaison (Figure 87). Cela valide définitivement le succès de la stratégie de click chemistry *in situ*, puisqu'un nouveau « fragment » sélectionné par la protéine elle-même a permis d'observer un gain d'activité et un positionnement parfaitement conservé du fragment azoture.

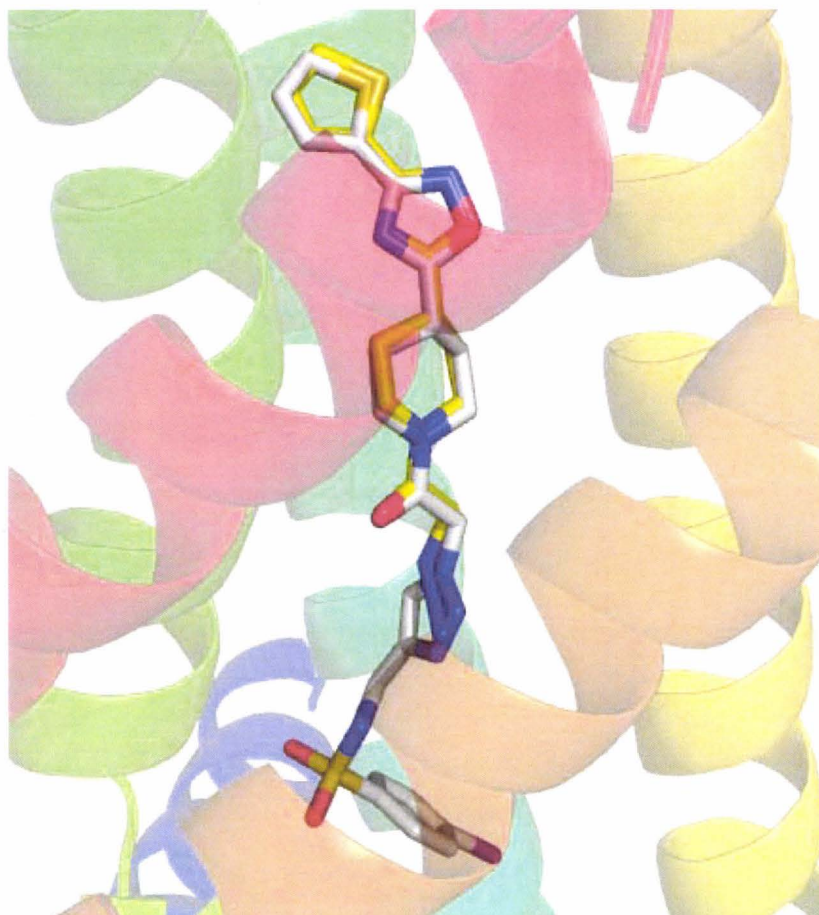


Figure 87 : Superposition du composé BDM_14801 (jaune) au sein de la structure radiocristallographique de EthR en présence du composé BDM_14950 (blanc)

Le rôle du groupement aryl-sulfonamide dans l'interaction est vérifié par l'établissement d'un π stacking entre le cycle phényle et le Trp-138 distant d'environ 3.8 Å (Figure 88).

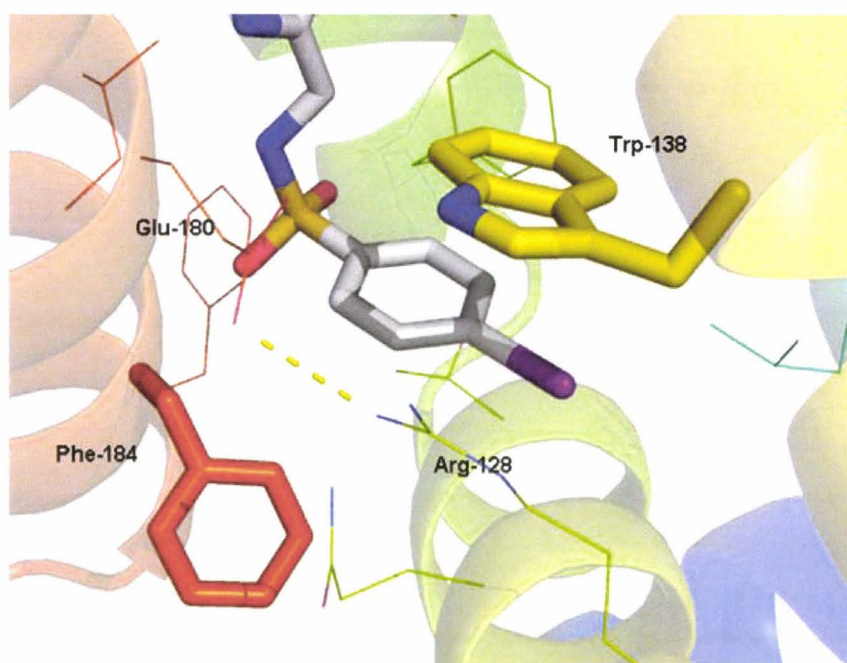


Figure 88 : agrandissement de la partie inférieure du domaine de liaison à un ligand. Trp-138 (jaune) et Phe-184 (orange) représentés en bâtonnet. Liaison hydrogène entre le Glu-180 et l'Arg-128 en pointillé jaune.

Ces observations, couplées à la forte conservation des interactions déjà établies avec le composé BDM_14801 (liaison hydrogène Thr-149/1,2,4-oxadiazole : distance 3.52 Å, liaison hydrogène Asn-179/carboxamide : distance 2,95 Å) justifient parfaitement le gain d'un facteur huit en activité visible par RPS (Figure 89).

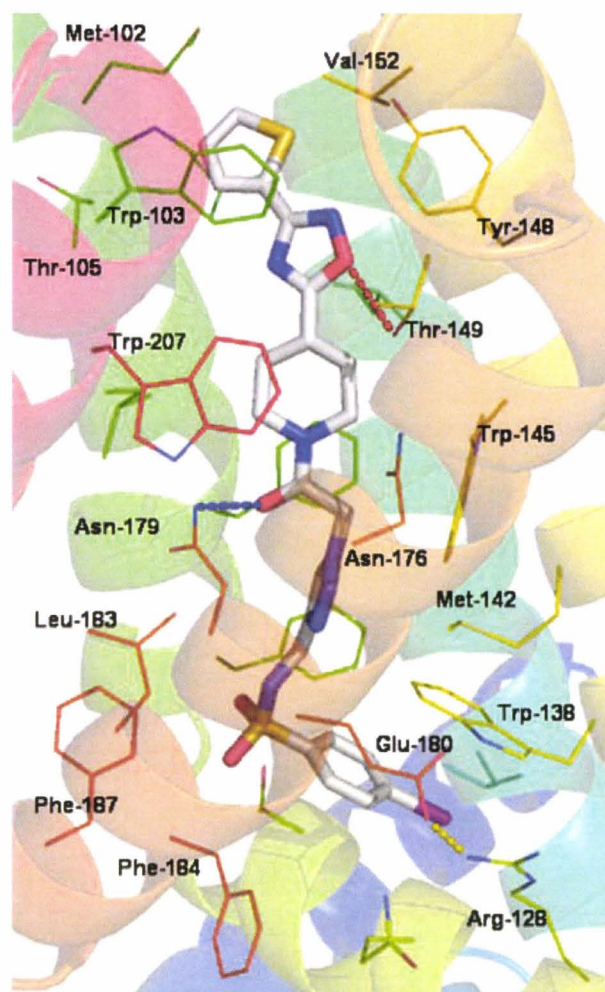


Figure 89 : Structure radiocristallographique du composé BDM_14950 (blanc) co-cristallisé en présence de la protéine EthR. Liaison hydrogène entre la fonction carboxamide et l'Asn-179 en pointillé bleu. Liaison hydrogène entre la Thr-149 et l'1,2,4-oxadiazole en pointillé rouge. Liaison hydrogène entre le Glu-180 et l'Arg-128 en pointillé jaune.

Parallèlement, la comparaison avec la structure obtenue en présence du composé azoture BDM_14801 montre que le groupement arylsulfonamide provoque des réarrangements dans la chaîne latérale de certains résidus. La Phe-184 se retrouve ainsi dans une configuration similaire à celle observée en présence d'HexOc, et l'Arg-128 établit désormais un pont salin avec le Glu-180 (Figure 90).

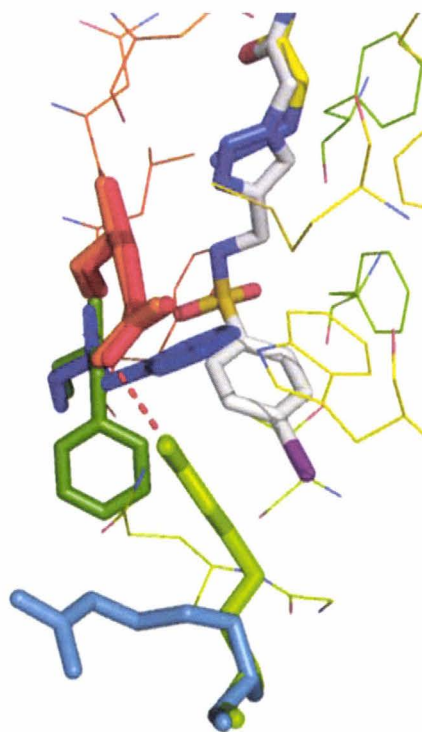


Figure 90 : Superposition du composé BDM_14801 (jaune) au sein de la structure radiocristallographique de EthR en présence du composé BDM_14950 (blanc). Agrandissement de la partie inférieure du domaine de liaison à un ligand. Glu-180 en rouge (structure BDM_14950) et orange (structure BDM_14801), Phe-184 en vert foncé (structure BDM_14950) et bleu foncé (structure BDM_14801), et Arg-128 en vert clair (structure BDM_14950) et bleu clair (structure BDM_14801), Pont salin entre le Glu-180 et l'Arg-128 en pointillé rouge

Enfin, la parfaite superposition de l'HexOc et du composé BDM_14950 est également révélatrice de la parfaite occupation du domaine de régulation par ce dernier. Comme prévu, la distance $\alpha 3 - \alpha 3'$ entre les deux Phe-63 est toujours incompatible avec une interaction protéine/ADN (49.8 Å) (Figure 91).

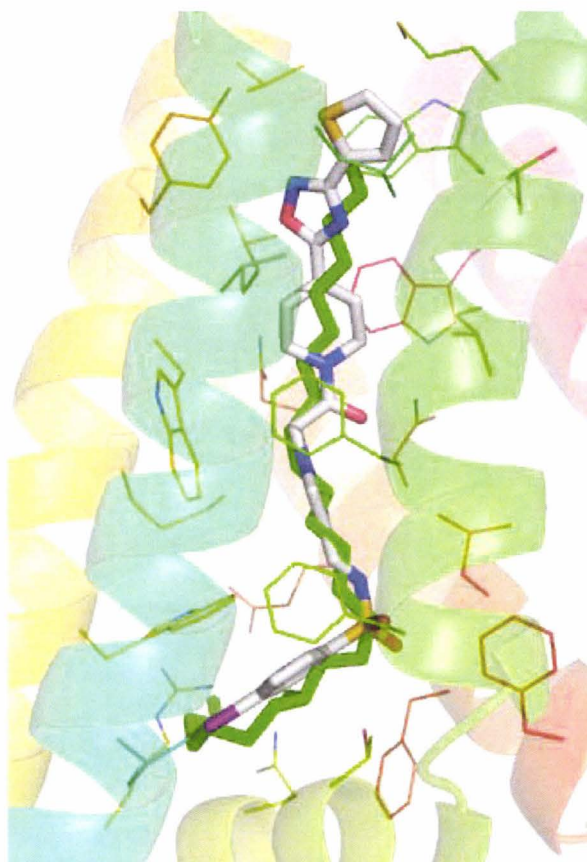


Figure 91 : Superposition de l'HexOc (vert) au sein de la structure radiocristallographique de EthR en présence du composé BDM_14950 (blanc)

Les données radiocristallographiques obtenues ont donc permis de préciser la nature du pharmacophore initialement établi et des conclusions en terme de relation structure activité sont d'ores et déjà définissables. Le rôle clef de la Thr-149 et surtout de l'Asn-179 au sein du domaine de liaison est désormais indiscutable dans l'établissement d'interactions hydrophiles avec un ligand. Les interactions au niveau des cavités hydrophobes sont en revanche beaucoup plus délicates à préciser. Le cycle thiophène semble cependant posséder une affinité pour ces deux cavités, même si aucune interaction de type π stacking n'est mise en jeu. La présence d'une méthionine dans chacune d'entre elles (Met-102 et Met-142) est d'ailleurs un élément intéressant, mais la distance de 5 Å mesurée entre le cycle thiophène et la Met-102 est trop importante pour envisager la survenue d'une interaction particulière. En revanche, les

interactions mises en jeu par le groupement arylsulfonamide (formation d'un π stacking avec le Trp-138) et leurs conséquences sur l'organisation de la protéine (formation d'un pont salin entre Arg-128 et Glu-180) peuvent expliquer le gain d'activité observé pour les composés identifiés par click chemistry *in situ*. La stratégie d'appliquer le concept de la click chemistry *in situ* a donc permis une avancée significative du projet avec l'identification de quatre composés particulièrement affins pour la protéine EthR. Il était désormais nécessaire d'évaluer leurs caractéristiques physico-chimiques et leur capacité à potentialiser l'éthionamide sur la mycobactérie.

2.4 Evaluation de la solubilité et de la potentialisation de l'éthionamide par les composés BDM_14801, BDM_14949 et BDM_14950.

2.4.1 Evaluation de la solubilité des composés

Afin d'avoir une vision plus complète du profil des composés les plus intéressants, la détermination de leur solubilité a été envisagée. Ces paramètres sont évalués grâce à une chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse (LCMS) et par utilisation d'une méthode SIM ou MRM. La comparaison de l'intensité du signal entre une solution de composé à 200 μ M dans un solvant organique (méthanol) et dans un tampon PBS (7.4) permet d'évaluer la solubilité (tableau 4).

références	MW	Solubilité μ g/mL
BDM_14801	318.35	9.5
BDM_14949	664.65	1.82
BDM_14950	639.49	0.48

Tableau 4: Solubilité des composés d'intérêt

Le très haut poids moléculaire des composés BDM_14949 et BDM_14950 leur confère logiquement une faible solubilité. En dépit de leur forte activité *in vitro*, ces composés ne possèdent donc pas un profil « drug like ». Le dérivé BDM_14801 possède des caractéristiques pharmacocinétiques déjà plus intéressantes et son activité moins importante pourrait finalement être compensée par une meilleure disponibilité. Il était désormais nécessaire de comparer la capacité de ces composés à potentialiser l'action de l'éthionamide, afin de juger de leur activité et de leur biodisponibilité réelle au sein de la mycobactérie.

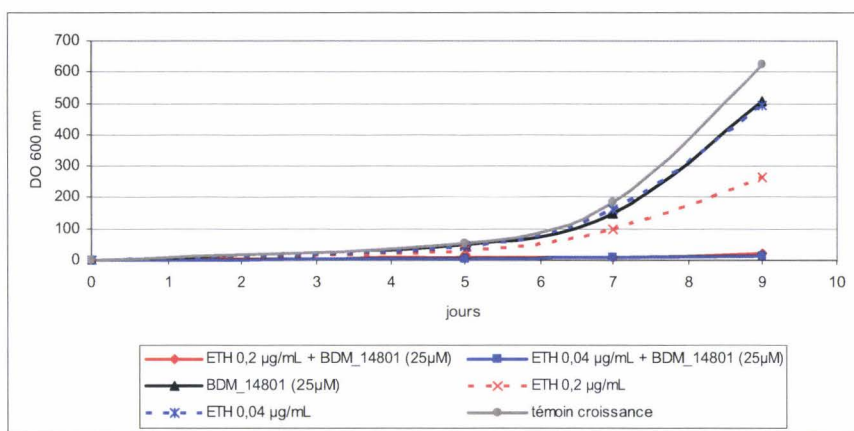
2.4.2 Etudes de potentialisation de l'éthionamide par les composés BDM_14801, BDM_14949 et BDM_14950

2.4.2.1 Activité des composés BDM_14801, BDM_14949 et BDM_14950 sur *M. bovis*

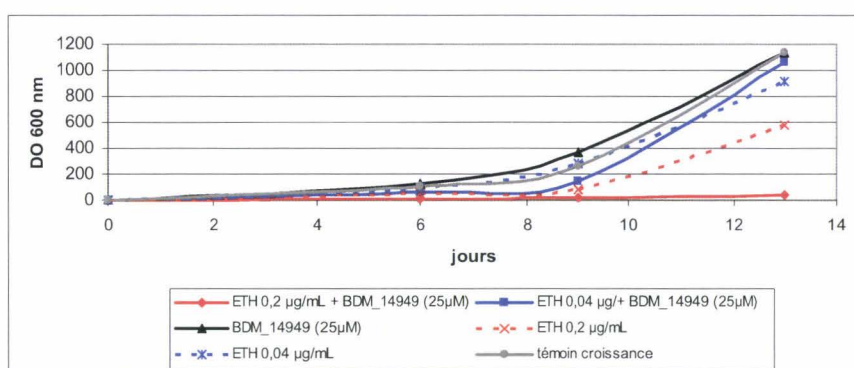
Afin de quantifier la potentialisation de l'éthionamide *in bacterio* par les composés déterminés, un test d'évaluation sur *Mycobacterium bovis* a été mis au point au sein de l'unité INSERM U629. Ce test est basé sur la détermination des CMI d'ETH seul et en présence de 25 μM des composés synthétisés sur une souche de BCG. La croissance mycobactérienne est évaluée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm. Les concentrations d'ETH utilisées lors de ce test sont de 1, 0.2 et 0.04 $\mu\text{g/mL}$, soit respectivement de 6, 1.2 et 0.24 μM . Dans ces conditions, la CMI de l'éthionamide seul est déterminée à environ 0.6 $\mu\text{g/mL}$, soit 3.6 μM , et toute diminution de cette valeur peut être révélatrice de la potentialisation de son activité.

Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 92. A une concentration de 25 μM , le composé BDM_14801 (graphique A) permet bien une potentialisation de l'éthionamide avec une inhibition de la croissance mycobactérienne même à une concentration de 0.04 $\mu\text{g/mL}$ (courbes pleines bleues).

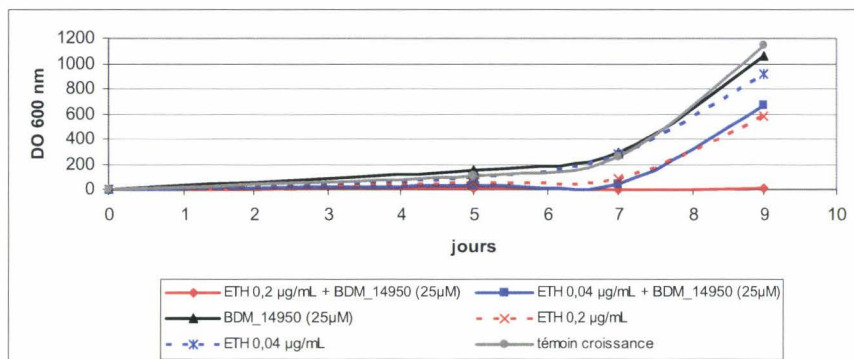
Pour les composés BDM_14949 et BDM_14950, une inhibition de la croissance mycobactérienne n'est observable que pour une concentration en éthionamide de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 92, graphique B et C, courbe pleine rouge). Il est probable que ces dérivés doivent souffrir de leur faible solubilité dans le milieu de culture, mais une mauvaise pénétration au sein de la mycobactérie est également envisageable.



A



B



C

Figure 92 : Détermination de la potentialisation de l'éthionamide sur *M. bovis* en présence de 25µM de composé BDM_14801 (A), BDM_14949 (B) et BDM_14950 (C)

Ce test a permis de constater que l'activité intrinsèque d'un composé *in vitro* n'est pas systématiquement signe d'un gain d'activité *in bacterio*. Les composés BDM_14949 et BDM_14950 possédant la plus forte activité par RPS se sont finalement révélés être moins intéressants sur la mycobactérie que l'intermédiaire azoture. Le composé BDM_14801 apparaît donc, à ce niveau, comme étant le plus prometteur des ligands d'EthR. Afin de

confirmer ce résultat, sa capacité à potentialiser l'action de l'éthionamide sur *M. tuberculosis* H37Rv a été déterminée.

2.4.2.2 Activité du composé BDM_14801 sur *M. tuberculosis* H37Rv

2.4.2.2.1 Détermination de la potentialisation de l'éthionamide par utilisation d'un appareillage Bactec 460

A la différence de l'évaluation réalisée pour le composé BDM_14500 par méthode Bactec MGIT 960, le composé BDM_14801 a été évalué par mesure quantitative du développement mycobactérien. Afin de réaliser cette évaluation, un appareillage Bactec 460 a été utilisé. Cette méthode est basée sur la production et la mesure de $^{14}\text{CO}_2$ par la mycobactérie, après assimilation de palmitate radioactif présent dans le milieu de culture. Grâce à cette méthode, des courbes du développement bactérien au cours du temps ont pu être déterminées.

Le protocole utilisé diffère légèrement de celui mis au point lors de l'étude du composé BDM_14500. L'étude est toujours réalisée dans un milieu 7H9, mais avec l'utilisation de 0.13 % de DMSO et de 0.5 % d'éthanol, afin de favoriser la solubilisation de l'ETH et du ligand. De plus, la concentration de BDM_14801 au sein des échantillons a été fixée à 25 μM , afin de limiter une toxicité éventuelle à forte dose. L'effet toxique du composé BDM_14801 et les CMI de l'éthionamide seul ou en présence de ligand ont ainsi pu être évalués (Figure 93).

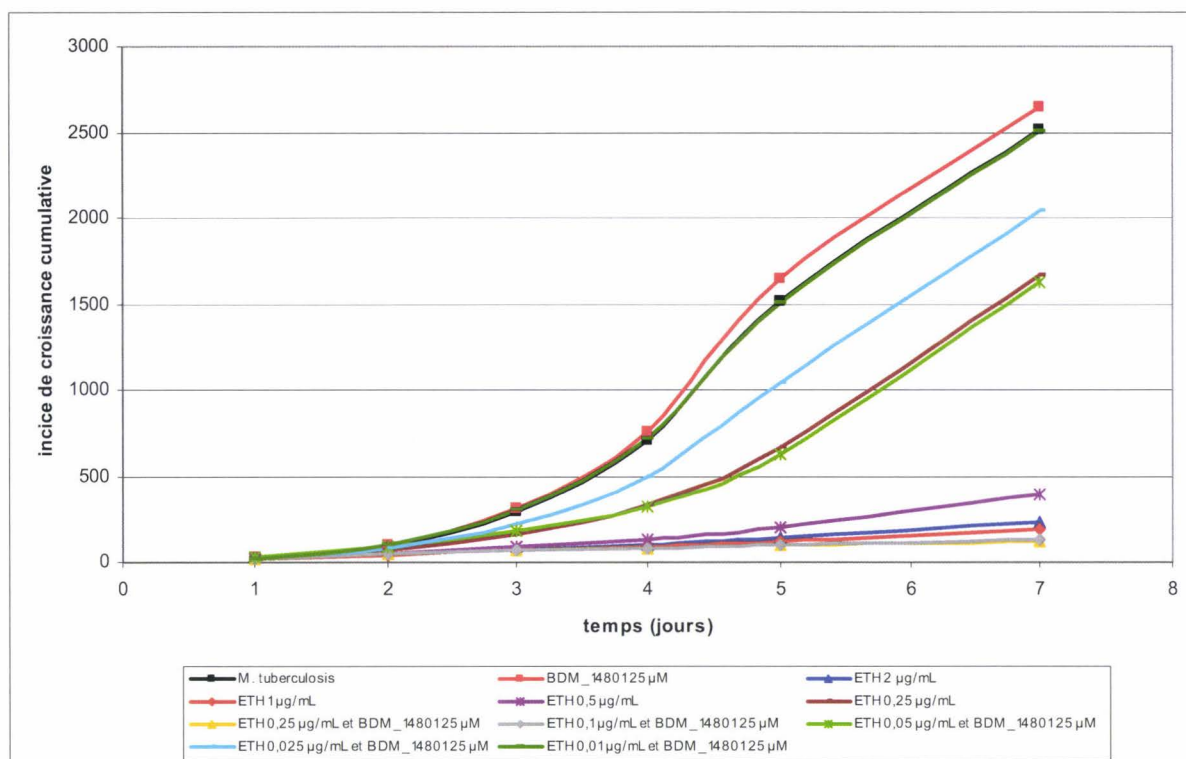


Figure 93 : Courbes de croissance de *M. tuberculosis* H37Rv par utilisation d'un appareillage Bactec 460. Détermination de l'effet potentialisateur de BDM_14801 et des CMI de l'ETH seul ou en présence de ligand.

La première observation qui ressort de cette évaluation concerne l'absence d'effet bactéricide ou bactériostatique du composé BDM_14801 à la concentration de 25 μM. Les courbes de croissance de *M. tuberculosis* seul (courbe noire) ou en présence du ligand (courbe rouge) sont quasiment superposables. Cela indique que le gain d'activité de l'éthionamide n'est pas lié à la toxicité intrinsèque du composé.

La seconde observation est une diminution significative de la CMI de l'éthionamide en présence de BDM_14801. Cela est visualisable par une absence de croissance à une concentration de 0.1 μg/mL en éthionamide (courbe grise), alors qu'il faut normalement être à une concentration entre 0.5 et 1 μg/mL (courbes mauve et orange) pour observer un profil similaire. Le facteur de potentialisation de l'éthionamide avec 25 μM de composé BDM_14801 est donc compris entre cinq et dix. Pour confirmer ce résultat, des expériences similaires ont été réalisées par culture en milieu solide afin d'avoir une représentation plus visuelle du phénomène mis en jeu.

2.4.2.2.2 Détermination de la potentialisation de l'éthionamide par culture en milieu solide

Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés sur l'appareillage Bactec 460. Le composé BDM_14801 ne présente toujours aucune toxicité (plaque 55) sur *M. tuberculosis* H37Rv et permet bien d'augmenter l'effet d'une dose subtoxique d'ETH. Une plage de lyse est ainsi visible dans la plaque 70 où 4 µg d'éthionamide et 25 µg de BDM_14801 étaient introduits. En revanche aucune lyse n'est observable en présence d'une dose similaire d'éthionamide seul (plaque 51) (Figure 94).



Figure 94 : Culture de *M. tuberculosis* H37Rv sur plaques d'Agar. Plaque 51 : 4 µg d'ETH introduits dans le cratère. Plaque 55 : 100 µL d'éthanol à droite / 25 µg de BDM_14801 (80 nmoles) dissous dans 100 µL d'éthanol à gauche. Plaque 70 : 4 µg d'ETH et 25 µg de BDM_14801

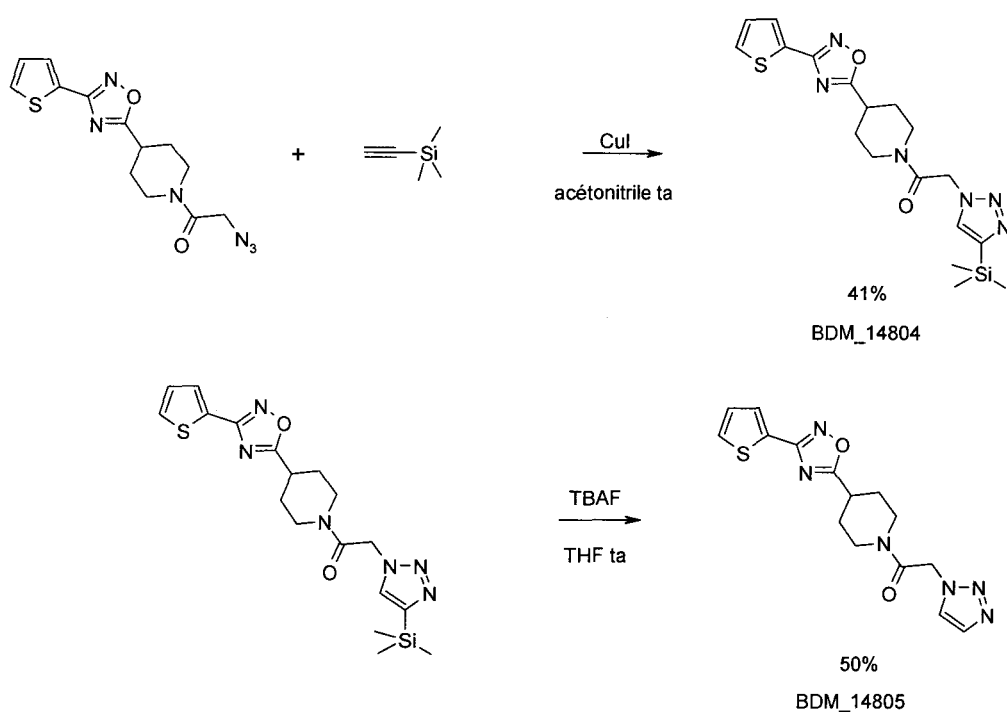
Le composé BDM_14801 est donc le plus prometteur. Néanmoins, les caractéristiques des composés azotures en terme de solubilité ou de stabilité sont loin d'être optimales, et leur remplacement par d'autres groupements pourrait permettre une amélioration de ces paramètres pharmacocinétiques, voire de l'activité. La synthèse de l'analogue 1,2,3-triazole du composé BDM_14801 a donc été entreprise, afin d'évaluer l'implication de ce groupement dans l'activité observée avec les composés BDM_14949 et BDM_14950.

2.5 Etude de l'importance de l'hétérocycle 1,2,3-triazole sur l'affinité des ligands d'EthR

2.5.1 Substitution de la fonction azoture du composé BDM_14801 par un 1,2,3-triazole

En terme de relation-structure-activité, l'impact du groupement 1,2,3-triazole est également à préciser, puisque sa formation est systématiquement observée lors de la production des

composés les plus actifs. La substitution du groupement azoture du composé BDM_14801 par un 1,2,3-triazole non substitué a donc été entreprise, afin de pouvoir juger de l'impact de cet hétérocycle sur l'affinité. Pour obtenir ce composé, le dérivé BDM_14801 fut couplé par cycloaddition de Huisgen au triméthylsilylacétylène en présence d'iodure de cuivre, afin d'obtenir l'intermédiaire BDM_14804 avec un rendement de 41 %. Le groupement triméthylsilyle fut ensuite clivé par utilisation de *tertio*-butyle ammonium fluoride (TBAF) dans le tétrahydrofurane pour donner le composé BDM_14805 souhaité avec un rendement de 50 % (schéma 18).



La capacité du composé BDM_14805 et de son intermédiaire BDM_14804 à inhiber l'interaction EthR/promoteur du gène *ethA* fut ensuite déterminée par résonance plasmonique de surface (puce CM5 fonctionnalisée par 20 RU d'ADN).

2.5.2 Evaluation par RPS de la capacité inhibitrice du composé BDM_14805

Les résultats obtenus montrent une activité comparable entre le composé 1,2,3-triazole non substitué et le dérivé azoture. La CI_{50} du composé BDM_14805 a été déterminée à 1.79 μ M (Figure 95) contre une CI_{50} précédemment déterminée pour le dérivé BDM_14801 à 1.36 μ M (Figure 74).

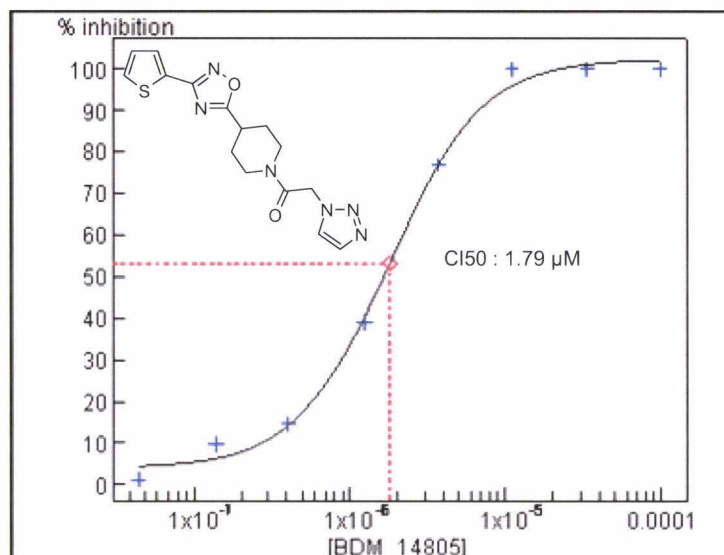


Figure 95 : Courbe dose réponse de l'inhibition EthR / promoteur *ethA* obtenue par résonance plasmonique de surface avec le composé BDM_14805. Puce CM5 fonctionnalisée avec 20 RU du fragment IG-106.
[EthR] = 200 nM

Cette observation démontre que l'hétérocycle 1,2,3-triazole n'est pas responsable du gain d'activité observé chez les composés déterminés par click chemistry *in situ*. Cela est cohérent avec la structure radiocristallographique du composé BDM_14950, qui montrait l'implication du groupement arylsulfonamide dans l'interaction. Cette étude démontre également que l'affinité plus importante du composé BDM_14801 par rapport au composé BDM_14500 n'est pas liée à la présence d'interactions électrostatiques potentiellement observables avec la fonction azoture, mais plutôt à des interactions de type π stacking. Cela est confirmé par l'activité moindre du composé BDM_14804 (CI₅₀ de 15.2 μ M) possédant un volumineux groupement triméthylsilyle. L'introduction d'une gêne stérique à ce niveau doit sûrement défavoriser un recouvrement optimal de l'hétérocycle et diminuer l'affinité du ligand pour la protéine.

2.5.3 Evaluation de la potentialisation de l'éthionamide chez *M. bovis* par le composé BDM_14805

L'évaluation de la potentialisation de l'éthionamide par le composé BDM_14805 a été réalisée sur *M. bovis* dans des conditions similaires à celles utilisées pour les composés BDM_14801, BDM_14949 et BDM_14950 (cf. chapitre 3, section 2.4.2.1).

Les résultats obtenus montrent, qu'à une concentration de 25 μM , le composé BDM_14805 permet bien une potentialisation de l'éthionamide avec une inhibition de la croissance mycobactérienne à une concentration de 0.04 $\mu\text{g/mL}$ (courbe pleine bleue) (Figure 96). Ce résultat est comparable à celui précédemment observé pour le composé BDM_14801, même si ce dernier semble être un peu plus actif, puisque la croissance mycobactérienne après neuf jours en présence de 0.04 $\mu\text{g/mL}$ d'éthionamide est plus faible (DO de 15 pour BDM_14801 contre DO de 109 pour BDM_14805).

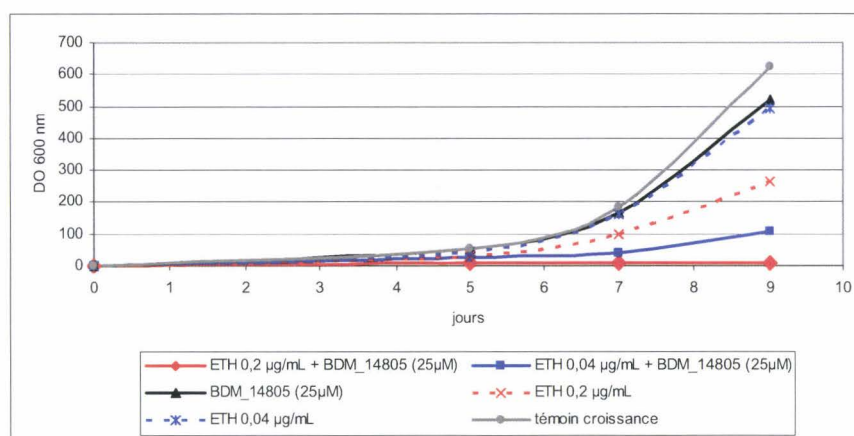


Figure 96 : Détermination de la potentialisation de l'éthionamide sur *M. bovis* en présence de 25 μM de composé BDM_14805

Le remplacement du groupement azoture par un 1,2,3-triazole a donc permis une conservation de l'activité observée *in bacterio*. Cette observation permet d'envisager l'introduction d'autres fonctions, afin d'augmenter l'activité et les propriétés physico-chimiques des ligands.

2.6 Bilan de l'utilisation de la click chemistry *in situ*

La stratégie de click chemistry *in situ* a donc permis la découverte de ligands de la protéine EthR plus actifs que le composé BDM_14500. Parmi ces composés, deux se sont révélés être particulièrement affins pour la cible : BDM_14949 et BDM_14950. Toutefois, les caractéristiques physico-chimiques de ces dérivés ne leur permettent pas de prétendre au statut de candidat médicament. Leur solubilité est, en effet, très limitée en raison de leur forte hydrophobie et de leur poids moléculaire particulièrement élevé. La conséquence directe de cette observation est une activité *in bacterio* moins significative que l'affinité observée par RPS. Ces dérivés demeurent cependant une source d'information importante. La découverte

de l'implication du groupement arylsulfonamide dans l'interaction ligand/protéine reste une piste intéressante pour la découverte d'une autre famille de composés.

A ce niveau, les composés BDM_14801 et BDM_14805 sont donc les plus prometteurs, et le fait que la substitution de la fonction azoture par un cycle aromatique permette une conservation de l'activité est fort intéressant. Le remplacement de la fonction azoture par d'autres groupements pourrait permettre une amélioration de ces paramètres pharmacocinétiques, voire de l'activité. Le rôle du cycle thiophène dans l'affinité observée est également à définir et des modifications à ce niveau pourraient permettre la création de nouvelles interactions (par exemple avec la Tyr-148). Des études de relation structure activité ont donc été conduites, afin d'améliorer l'activité et les caractéristiques pharmacocinétiques des ligands découverts.

3 Synthèse d'analogues du composé BDM_14801 : vers un candidat médicament

BDM_14801 est devenu le composé de référence dans la recherche de ligands de la protéine EthR de *M. tuberculosis*. La synthèse d'analogues a donc été entreprise, dans le but d'affiner le pharmacophore établi et d'améliorer l'activité et les caractéristiques pharmacocinétiques de ce dérivé. A ce niveau, il était donc intéressant de se documenter sur le devenir du groupement azoture et du cycle thiophène chez l'animal.

Le cycle thiophène est décrit pour être activé sous une forme *S*-oxyde par les cytochromes P450. Cet intermédiaire est ensuite susceptible de réagir en position 2 avec divers nucléophiles, dont notamment les protéines hépatiques^{156,157,158} (Schéma 19).

¹⁵⁶ Mansuy, D.; Valadon, P.; Erdelmeier, I.; Lopez-Garcia, P.; Amar, C.; Girault, J. P.; Dansette, P. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7825-6.

¹⁵⁷ Valadon, P.; Dansette, P. M.; Girault, J. P.; Amar, C.; Mansuy, D. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1403-13.

¹⁵⁸ Treiber, A.; Dansette, P. M.; El Amri, H.; Girault, J. P.; Ginderow, D.; Mornon, J. P.; Mansuy, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1565-71.

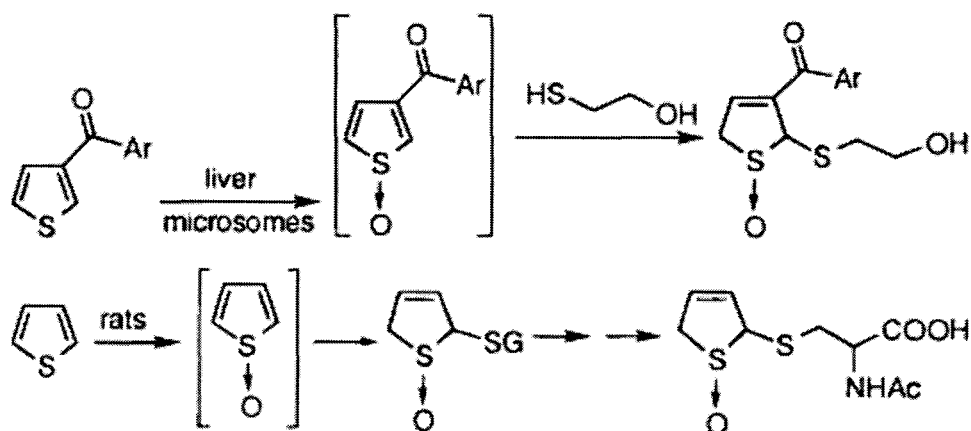


Schéma 19: Activation du cycle thiophène par les cytochromes P450 selon Treiber *et al*¹⁵⁸

Cette observation oriente les synthèses futures vers un remplacement du cycle thiophène ou sa substitution en position 2. Néanmoins, l'utilisation de l'acide tiénilique comme diurétique chez l'Homme indique également qu'un thiophène n'est pas forcément critique dans le développement d'une molécule thérapeutique (figure 97). Il conviendra donc de s'assurer du rôle exact joué par cet hétérocycle dans l'affinité avant d'essayer de s'affranchir de sa métabolisation.

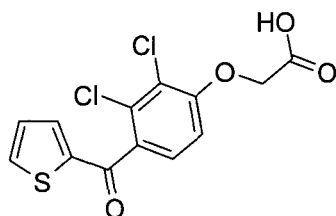


Figure 97 : Structure de l'acide tiénilique

Le devenir du groupement azoture *in vivo* est moins décrit. Il faut dire qu'en thérapeutique, seul l'AZT, utilisé dans le traitement du VIH, possède ce groupement (figure 98). Des études réalisées ont montré qu'en présence de cytochromes P450, un azoture est réduit en l'amine primaire correspondante^{159,160,161}. Cette réduction est cependant plus marquée pour les arylazotures que pour les alkylazotures comme BDM_14801.

¹⁵⁹ Handlon, A. L.; Oppenheimer, N. J. *Pharm Res* **1988**, *5*, 297-9.

¹⁶⁰ Nicholls, D.; Gescher, A.; Griffin, R. J. *Xenobiotica* **1991**, *21*, 935-43

¹⁶¹ Reardon, J. E.; Crouch, R. C.; St John-Williams, L. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 23, 15999-6008

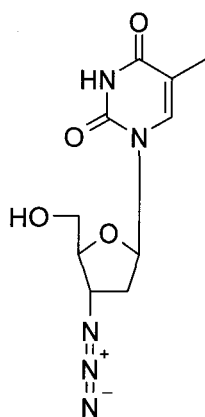


Figure 98 : Structure de l'AZT

Ces observations, ainsi que le rôle discutable de ce groupement dans l'affinité de BDM_14801, montrent qu'un remplacement du groupement azoture est souhaitable. L'intérêt est double, d'une part s'affranchir d'une forte métabolisation et d'autre part mettre en jeu de nouvelles interactions hydrophobes.

A ce niveau, trois voies de synthèse ont donc été explorées (Figure 99):

- la première, basée sur le remplacement du cycle thiophène, afin de limiter sa métabolisation et d'établir des interactions plus spécifiques (par exemple avec la Tyr-148)
- la seconde, basée sur le remplacement de l'azoture, afin d'établir des interactions hydrophobes plus importantes dans la partie inférieure du domaine de régulation et de s'affranchir de sa métabolisation
- la troisième, basée sur le remplacement de l'hétérocycle 1,2,4-oxadiazole, afin de renforcer l'interaction réalisée avec la Thr-149

Seul le cycle pipéridine de BDM_14801 n'a pas été modifié, les résultats observés lors du criblage initial de composé ayant montré l'importance de ce dernier dans l'affinité (cf. chapitre 2 section 5)

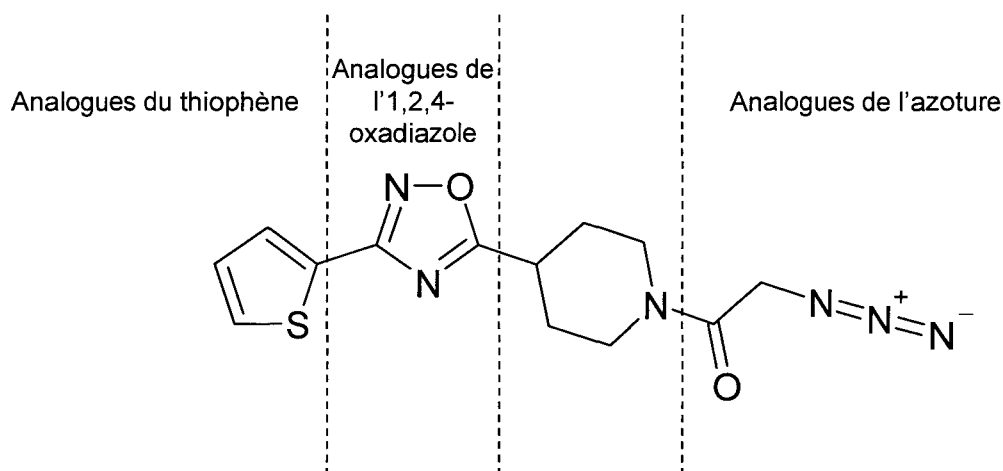


Figure 99 : études de RSA envisagées sur le modèle du composé BDM_14801

3.1 Synthèses et évaluation des analogues du composé BDM_14801 après remplacement du cycle thiophène

3.1.1 Synthèses réalisées

La substitution du thiophène par différents cycles a été envisagée selon le schéma réactionnel déjà utilisé pour la synthèse du composé BDM_14801. Quatorze composés ont ainsi été synthétisés selon le schéma réactionnel représenté ci-dessous (Schéma 20).

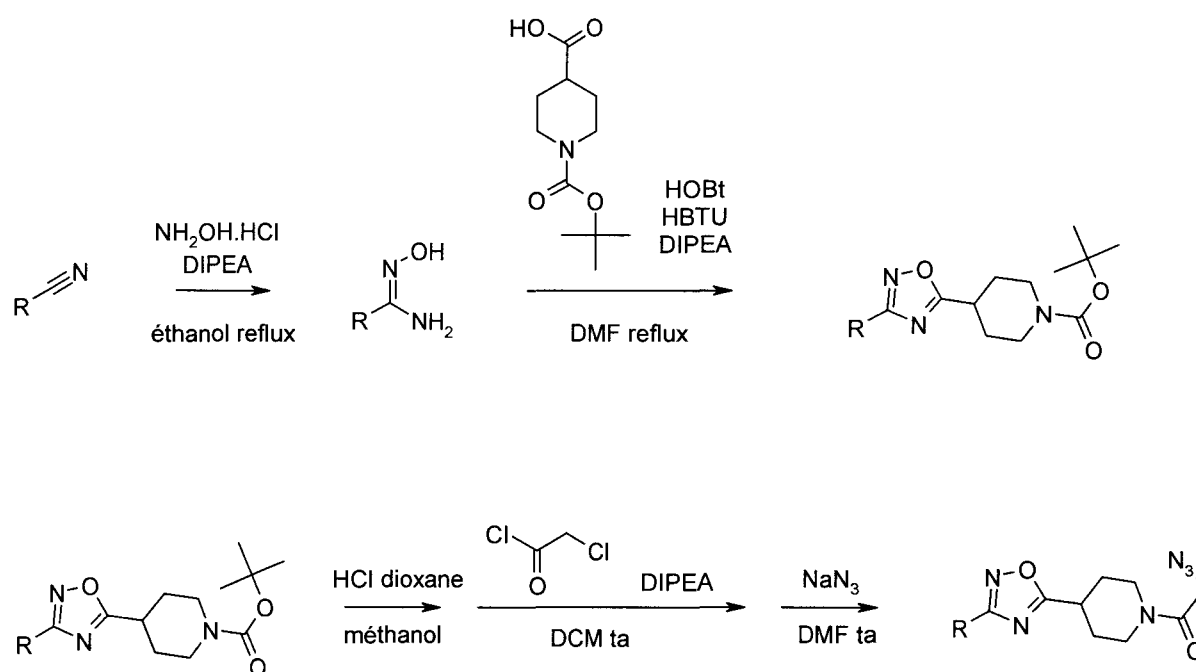


Schéma 20: Schéma réactionnel utilisé pour la synthèse d'analogues du composé BDM_14801 dont le thiophène est remplacé

3.1.1.1 Synthèse d'amidoximes à partir de nitrile

Douze intermédiaires amidoximes ont été synthétisés à partir des nitriles correspondants, par réaction du chlorhydrate d'hydroxylamine en présence de diisopropyléthylamine dans l'éthanol absolu à reflux. Ces intermédiaires de synthèse ont été obtenus avec des rendements allant de 49 à 99 % (tableau 5).

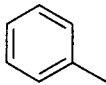
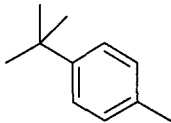
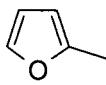
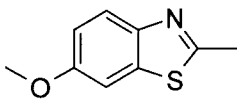
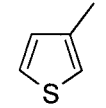
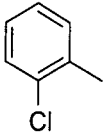
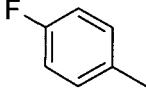
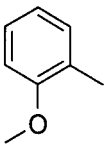
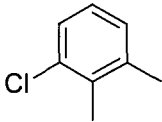
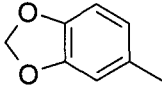
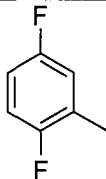
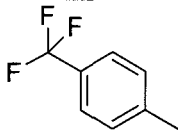
$\text{R}-\text{C}\equiv\text{N} \xrightarrow[\text{éthanol reflux}]{\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}, \text{DIPEA}} \text{R}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}-\text{OH}$	
R	R
	
	
	
	
	
	

Tableau 5: Structures des intermédiaires amidoximes synthétisés

Ces intermédiaires ont ensuite été réutilisés pour la synthèse des hétérocycles 1,2,4-oxadiazoles.

3.1.1.2 Synthèse des dérivés 1,2,4-oxadiazoles par couplage et condensation successifs

Les amidoximes synthétisés ont été couplés à l'acide *N*-Boc-pipéridine-4-carboxylique selon les conditions décrites par Poulain *et al*¹⁴¹ pour obtenir les dérivés 1,2,4-oxadiazoles correspondants (tableau 6).

R	R

Tableau 6: Structures des intermédiaires 1,2,4-oxadiazoles synthétisés

La fonction *t*Boc de ces intermédiaires a ensuite été remplacée par un groupement acétyl-azoture.

3.1.1.3 Obtention des dérivés azotures désirés. Introduction du groupement acétyl-azoture

Les dérivés 1,2,4-oxadiazoles synthétisés ont été engagés dans trois réactions successives :

- déprotection dans le méthanol du groupement carbamate *t*Boc en milieu acide par ajout d'une solution 4 N d'acide chlorhydrique dans le 1,4-dioxane
- couplage de la fonction amine avec le chlorure de chloracétyle dans le dichlorométhane en présence de diisopropyléthylamine pour donner le chloroacétamide correspondant
- substitution du chlore par un groupement azoture en présence d'azoture de sodium dans le diméthylformamide

Afin de limiter le temps de synthèse, ces trois réactions ont été réalisées successivement sans caractérisation des intermédiaires réactionnels. Seuls les composés azotures finaux ont été caractérisés.

Les quatorze composés synthétisés sont représentés dans la section suivante avec le rendement global observé pour les trois étapes. Parmi eux, des dérivés proches de BDM_14801 ont été synthétisés comme l'analogue thiophène substitué en position 3, le furane ou encore le méthoxybenzothiazole avec lequel une interaction avec la Tyr-148 est envisagée. Des molécules possédant un cycle phényle nu ou substitué ont également été produites. Enfin, des composés possédant un hétérocycle pyridine et un cyclopropyle ont été obtenus de façon similaire.

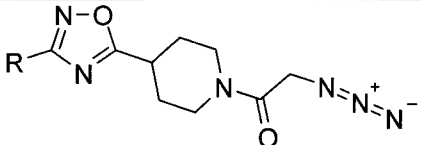
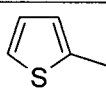
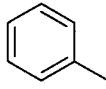
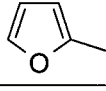
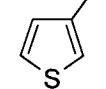
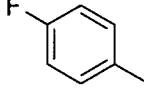
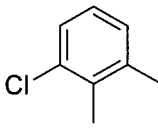
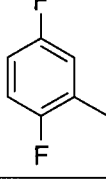
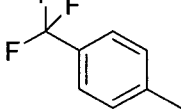
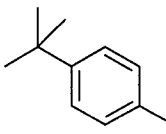
La capacité de ces composés à inhiber l'interaction EthR/promoteur ethA a ensuite été évaluée par RPS.

3.1.2 Evaluation sur *M. bovis* et par RPS de l'activité des analogues synthétisés

L'ensemble de ces composés et de leurs intermédiaires de synthèse *t*Boc a été comparé au dérivé BDM_14801 par RPS (puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU d'ADN / [EthR] = 540 nM / [composé] = 5 µM) afin de pouvoir juger de l'impact des modifications introduites.

Certains d'entre eux ont également été testés sur *M. bovis* selon les conditions déjà décrites (cf. chapitre 3, section 2.4.2.1).

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* et *in bacterio* pour les analogues synthétisés est décrit dans le tableau 7. Il est à noter que les intermédiaires réactionnels *t*Boc ont également été testés, mais n'ont présenté aucune inhibition significative de l'interaction EthR/promoteur *ethA*.

				
entry	R	Inhibition RPS %	IC50 RPS μ M	CMI BCG μ M
BDM_14801		31	1.54	0.24
1		15	ND	1.2
2		2	ND	ND
3		14	ND	1.2
4		15	ND	ND
5		9	ND	ND
6		3	ND	ND
7		2	ND	ND
8		0	ND	ND

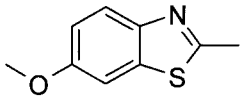
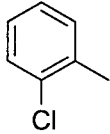
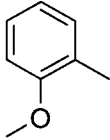
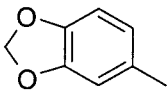
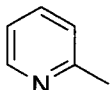

9		70	1.56	0.24
10		9	ND	ND
11		1	ND	ND
12		19	N.D	1.2
13		2	ND	ND
14		7	ND	ND

Tableau 7: Analogues du composé BDM_14801 synthétisés.

Récapitulatif des valeurs d'inhibition et des CI_{50} de l'interaction EthR / promoteur *ethA* (RPS, puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU d'ADN et [EthR] = 540 nM), ainsi que des CMI mesurées sur *M. bovis*

Les études par RPS montrent qu'aucun des composés synthétisés possédant un cycle phényle n'est aussi actif que BDM_14801. L'activité mesurée pour le composé non substitué **1** est déjà deux fois moins importante que celle de la référence (15 % contre 31 %). A l'exception du composé **12** portant un groupement pipéronyle (19 % d'inhibition), l'introduction de substituant sur ce cycle n'augmente en rien l'activité observée, bien au contraire. Si des groupements désactivants comme des halogènes (composés **4**, **5**, **6**, **10**) ont une activité un peu plus faible ou équivalente à celle du composé **1** (3 à 15 % d'inhibition), l'introduction de groupement activant comme un méthoxy (**11**) ou volumineux comme un trifluorométhyle (**7**) ou un *tertio*-butyle (**8**) engendre une perte totale de l'activité. Cette conséquence est également observable pour l'introduction d'une pyridine (**13**) ou d'un cyclopropyle (**14**). Le remplacement du cycle thiophène n'apparaît donc pas favorable à l'affinité. Les analogues **2** et **3** correspondant au furane et au thiophène substitué en 3 montrent respectivement une perte totale et une diminution d'activité par rapport au composé de référence (2 et 14 % d'inhibition). Cela est révélateur de l'importance du rôle joué par l'atome de soufre dans l'interaction avec la protéine. Cette observation est confortée par l'activité comparable du composé **9**, possédant un cycle méthoxybenzothiazole, avec le BDM_14801 (CI_{50} respectives de 1.56 et 1.54 μ M, Figure 100).

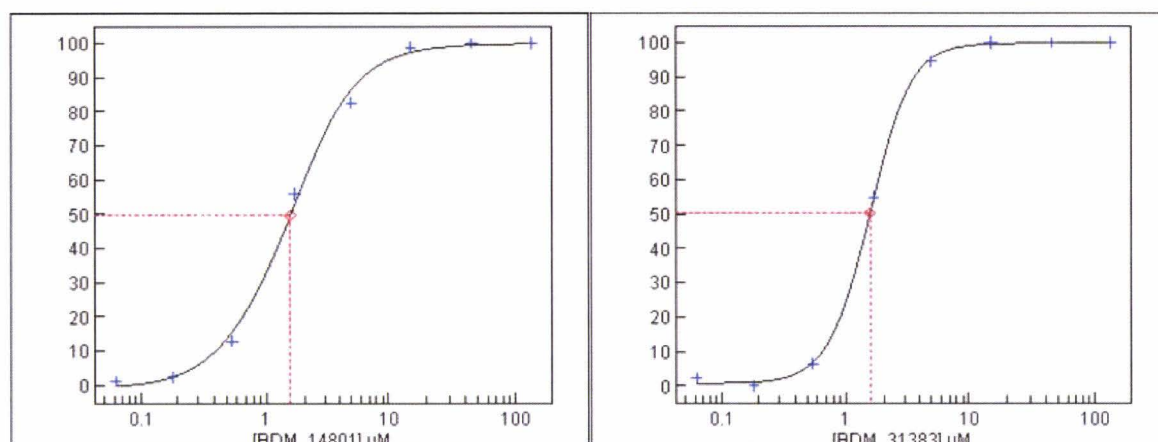


Figure 100 : Juxtaposition des courbes doses réponses des composés BDM_14801 et **9** (BDM_31383) réalisées par résonance plasmonique de surface (Puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU d'ADN. [EthR] = 540 nM)

La capacité des composés les plus intéressants (**1**, **3**, **9**, **12**) à potentialiser l'action de l'éthionamide fut évaluée sur *M. bovis* selon les conditions précédemment établies. La CMI de l'ETH mesurée en présence de BDM_14801 fut déterminée à 0.24 μM . Conformément aux observations réalisées *in vitro* par RPS, le composé **9** a donné un résultat similaire à celui de la référence, mais l'utilisation des analogues **1**, **3** et **12** a abouti à une CMI pour l'éthionamide de 1.2 μM . Ces données montrent une parfaite cohérence entre le test réalisé à l'échelle moléculaire par RPS et l'activité bactériostatique/bactéricide de l'ETH.

3.2 Synthèses et évaluation des analogues du composé BDM_14801 après remplacement du groupement azoture

3.2.1 Synthèses réalisées

Dans une seconde approche, le remplacement du groupement azoture a été envisagé. Les interactions que ce dernier exerce au sein de EthR sont mal définies et l'observation que sa substitution par un hétérocycle 1,2,3-triazole assure une conservation de son activité est intéressante. Son implication dans l'activité est même discutable au vu des données radiocristallographiques, et la fonction carboxamide impliquée dans une liaison hydrogène avec l'Asn-179, semble bien plus importante à l'affinité. Il est néanmoins possible que l'azoture exerce une interaction de type π stacking au niveau de la partie inférieure du

domaine de liaison à un ligand. A l'inverse, dans l'éventualité où son implication dans l'affinité ne serait pas établie, il y aurait alors possibilité de créer de nouvelles interactions dans cette zone. Afin de préciser la nature des interactions mises en jeu à ce niveau, 27 analogues furent synthétisés par clivage de la fonction *t*Boc du composé BDM_14500 et couplage de la fonction amine, ainsi libérée, avec divers acides ou chlorures d'acides (schéma 21). La fonction carboxamide est conservée de façon à garder un des éléments moteurs de l'affinité ligand/protéine. Les réactions de couplage ont été réalisées dans le dichlorométhane en présence de diisopropyléthylamine à température ambiante :

- soit par ajout direct de chlorure d'acide (voie A)
- soit par activation préalable d'un acide carboxylique par utilisation d'EDCI (voie B)

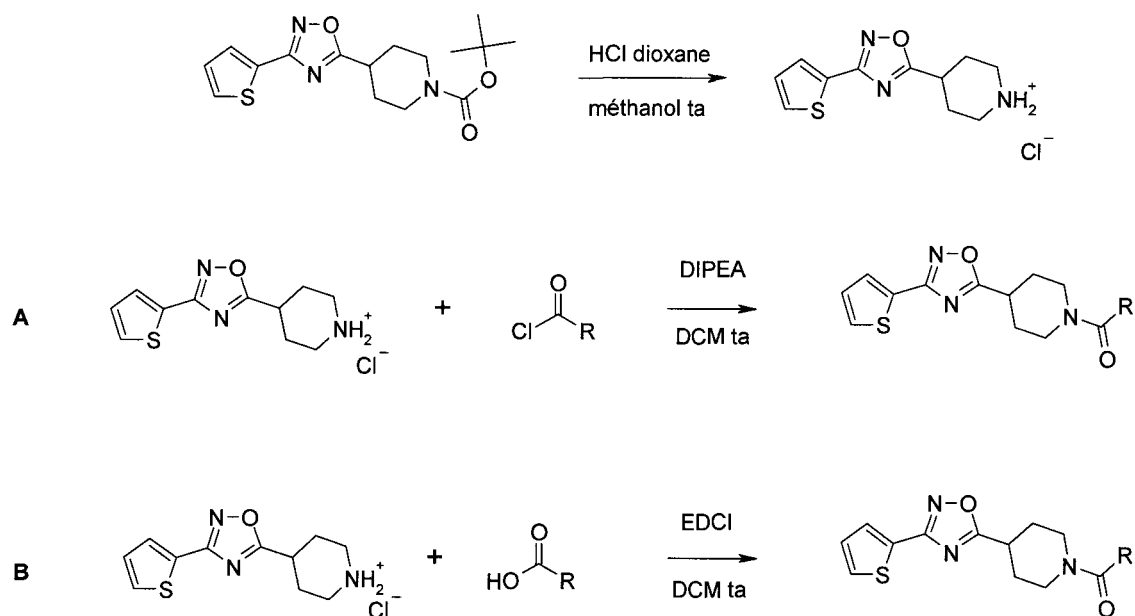


Schéma 21: Schémas réactionnels utilisés pour la synthèse d'analogues du composé BDM_14801 avec remplacement du groupement acétyl-azoture

Parmi les analogues synthétisés, des chaînes carbonées insaturées ont été introduites afin de mimer les insaturations de l'azoture et de pouvoir conserver les phénomènes de π stacking. Néanmoins, des chaînes carbonées saturées ont également été utilisées afin d'étudier l'impact d'une interaction purement hydrophobe sur l'affinité. Des groupements cycliques saturés et insaturés de différentes tailles ont également été introduits afin de respecter le pharmacophore initial établi. En effet, l'azoture interagit au même niveau que le cycle de présumé 1,4-dioxane inférieur décrit dans la structure de Dover *et al*¹³¹, c'est-à-dire avec les résidus Phe-114, Met-

142, Leu-183 et Trp-145. C'est dans ce domaine que le cycle thiophène du composé BDM_14500 était positionné (Figure 67).

La structure des composés synthétisés, ainsi que leur capacité à inhiber l'interaction EthR/promoteur ethA par RPS sont présentés dans la section 3.2.2.

3.2.2 Evaluation *in bacterio* et par RPS de l'activité des analogues synthétisés

Les analogues synthétisés ont été testés par résonance plasmonique de surface selon des conditions proches de celles précédemment décrites (puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU d'ADN / [EthR] = 540 nM / [composé] = 3 μM). Les CMI ont été déterminées selon les conditions précédemment décrites (Chapitre 3, section 2.4.2.1).

3.2.2.1 Importance du groupement azoture dans l'interaction

Les données obtenues montrent que l'implication du groupement azoture dans l'interaction ligand / protéine n'est pas anodine. Son remplacement par un ou deux chaînons carbonés entraîne une diminution significative de l'inhibition de 39 % pour BDM_14801 à 3 % pour le composé acétyle **15**, et à 5 % pour le composé **16**. Cette variation est également observable *in bacterio* avec une augmentation de la CMI de l'ETH de 0.24 à 1.2 μM. (tableau 8). Le groupement azoture doit donc bien exercer des interactions de type π stacking avec les résidus hydrophobes à sa proximité. L'introduction de chaînes latérales hydrophobes a donc été réalisée.

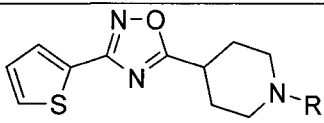
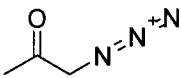

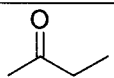
				
référence	R	inhibition %	CI ₅₀ RPS μM	CMI BCG μM
BDM_14801		39	1.54	0.24
15		3	ND	1.2
16		5	ND	ND

Tableau 8: Structures et activités mesurées *in vitro* par RPS et sur *M. bovis*

3.2.2.2 Implication de la chaîne latérale hydrophobe sur l'activité

3.2.2.2.1 Comparatif des analogues portant des chaînes saturées et insaturées

Il ressort de ce test que la présence d'une insaturation au sein de la chaîne latérale est favorable à l'affinité, soit par des fonctions alcène (composé **18**) ou alcyne (composé **19**), soit par des groupements comportant un hétéroatome comme un nitrile (composé **20**) (tableau 9). En effet, les composés **18** et **20** présentent des CI_{50} respectives de 1 et 3.33 μM , ce qui représente une activité proche de celle du composé BDM_14801 (CMI de 1.54 μM). Cela se vérifie chez *M. bovis* avec des CMI mesurées de 0.24 μM . Le composé **19** possède une activité *in vitro* assez intéressante (20 % d'inhibition), mais doit souffrir d'une mauvaise biodisponibilité, car aucune potentialisation n'est observable *in bacterio* (CMI de 1.2 μM). Ces observations sont sûrement révélatrices de l'implication d'un recouvrement orbitalaire entre liaisons π lors de l'interaction composé / protéine.

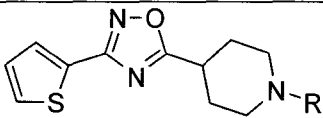
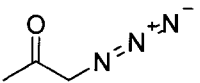
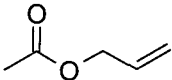
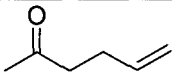
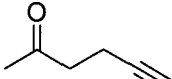
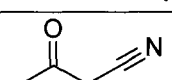
				
référence	R	inhibition %	CI_{50} RPS μM	CMI BCG μM
BDM_14801		39	1.54	0.24
17		5	ND	ND
18		53	1	0.24
19		20	ND	1.2
20		28	3.33	0.24

Tableau 9: Structures, et activités mesurés *in vitro* par RPS et sur *M. bovis*

Par comparaison, la plupart des analogues possédant une chaîne latérale aliphatique, ramifiée ou non, sont peu actifs, tant *in vitro* que chez *M. bovis* (tableau 10). Les analogues **20**, **21** et **23** ont tous induit une inhibition inférieure ou égale à 5 % par RPS, et la CI_{50} élevée (10.34 μ M) mesurée pour le composé **21** est bien révélatrice de cette perte d'activité. Aucun d'entre eux n'a permis une diminution de la CMI de l'ETH en dessous de 1.2 μ M chez *M. bovis*.

Malgré tout, les analogues isopentyle (**22**) et trifluoropropyle (**24**) possèdent des activités intéressantes avec des CI_{50} respectives de 0.91 et 1.57 μ M, ce qui montre qu'une interaction purement hydrophobe peut survenir. Dans ce cas précis, l'affinité apparaît comme étant extrêmement tributaire de l'environnement stérique. La faible activité de l'analogue isobutyle **21** (CI_{50} : 10.34 μ M) par rapport au composé isopentyle **22** en est l'exemple parfait. Cette trop grande hydrophobicité n'est cependant pas un avantage, car elle doit limiter la pénétration au sein du micro-organisme. En effet, les CMI de l'ETH observées chez *M. bovis* en présence des composés **22** et **24** sont élevées par rapport à ce que les données *in vitro* laissaient envisager (CMI 1.2 μ M).

Parallèlement à ces observations, les analogues possédant une fonction éther aliphatique au sein de leur chaîne latérale (composé **25**, **26** et **27**) sont peu actifs, tant *in vitro* (inhibition inférieure ou égale à 5 %) que sur *M. bovis* (CMI 1.2 μ M). Le remplacement de la fonction carboxamide par une fonction carbamate (composé **17**) entraîne également une réduction de l'activité. Nous avons déjà observé ce phénomène avec le dérivé BDM_14500 qui possédait une fonction *t*Boc et était 28 fois moins actif que BDM_14801.

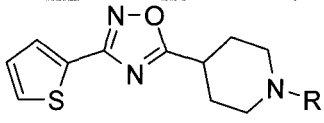
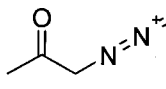
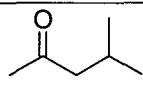
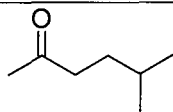
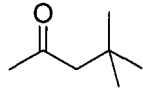
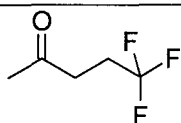
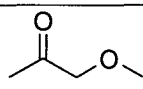
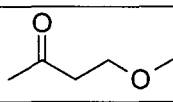
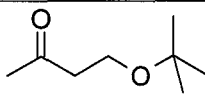
				
référence	R	inhibition %	CI ₅₀ RPS μM	CMI BCG μM
BDM_14801		39	1.54	0.24
21		5	10.34	ND
22		70	0.91	1.2
23		4	ND	ND
24		96	1.57	1.2
25		4	ND	1.2
26		5	ND	1.2
27		3	ND	ND

Tableau 10: Structures et activités mesurées *in vitro* par RPS et sur *M. bovis*

En dépit de sa faible activité sur *M. bovis*, le composé **22** a montré une inhibition de l'interaction EthR/promoteur *ethA* très intéressante. Sa cocrystallisation en présence de la protéine a donc été envisagée.

3.2.2.2.2 Etude radiocristallographique de la structure d'EthR en présence du composé **22**

La structure radiocristallographique du composé **22** au sein de EthR a été déterminée avec une résolution de 2.00 Å.

Ces données montrent une très bonne conservation de son positionnement au sein du domaine de liaison (Figure 101). Les deux interactions hydrophiles entre la fonction carboxamide et l'Asn-179 (distance 2.82 Å), et entre l'1,2,4-oxadiazole et la Thr-149 (distance 3.51 Å) sont

parfaitement conservées et le groupement isobutyle interagit bien avec les résidus hydrophobes Phe-114, Met-142, Leu-183 et Trp-145 (Figure 101 gauche). Une inclinaison de la Phe-114 d'un angle de 45°, ainsi qu'une très légère déviation de 1 Å au niveau de la fonction carboxamide du ligand sont observables et sûrement liées au positionnement de l'isopentyle au sein de la poche hydrophobe (Figure 101 droite). La distance $\alpha 3 - \alpha 3'$ entre les deux Phe-63 est de 50.1 Å.

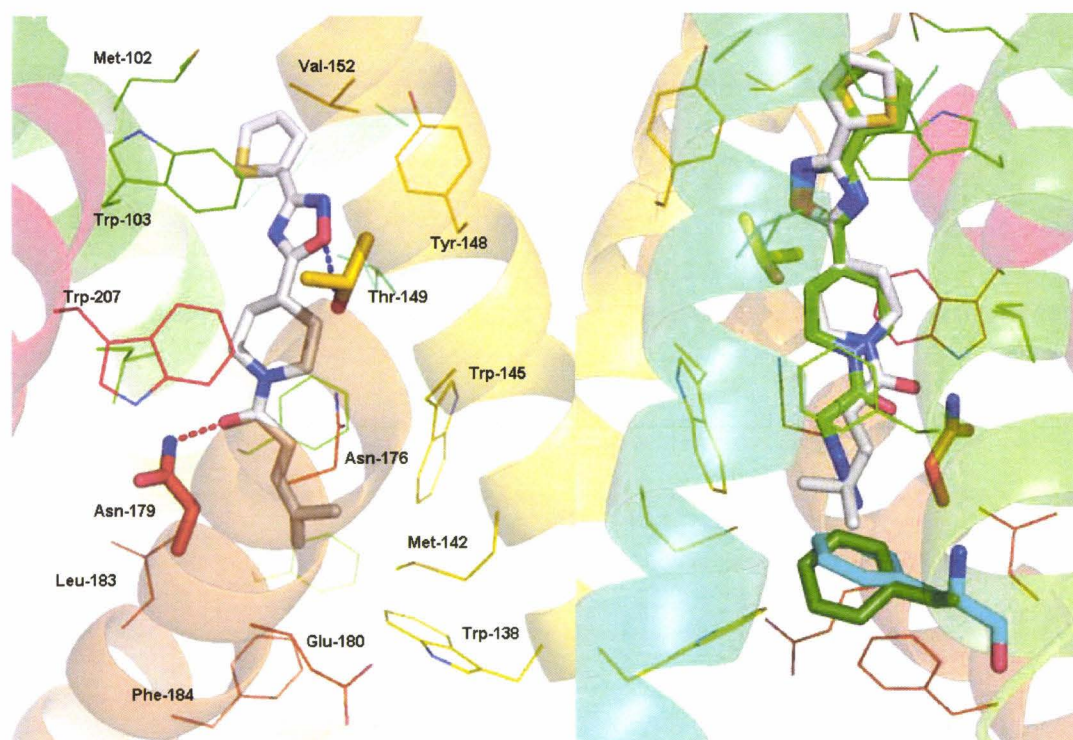


Figure 101 : gauche : Structure radiocristallographique de la protéine EthR en présence du composé **22** (blanc). Liaisons hydrogènes en pointillé

Droite : Superposition de la structure radiocristallographique de la protéine EthR en présence du composé **22** (blanc) avec le composé BDM_14801 (vert). Phe-114 représenté en bâtonnet vert pour la structure du composé **22** et en bleu pour celle du composé BDM_14801

3.2.2.3 Conséquences d'une fonction carboxylique sur l'activité

Les tests réalisés ont permis d'observer que l'introduction d'une fonction carboxylique (composés **28** et **29**) était très défavorable pour l'affinité (3 % d'inhibition) (tableau 11). Cela est cohérent avec la forte hydrophobicité du domaine de liaison et la nature hydrophobe des interactions favorisant l'affinité.

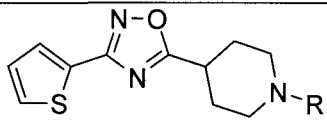
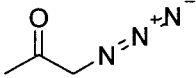
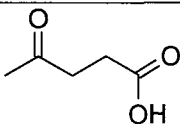
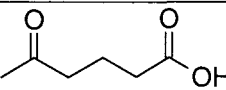
				
référence	R	inhibition %	CI ₅₀ RPS μM	CMI BCG μM
BDM_14801		39	1.54	0.24
28		3	ND	1.2
29		3	ND	ND

Tableau 11: Structures et activités mesurées *in vitro* par RPS et sur *M. bovis*

3.2.2.4 Importance des groupements cycliques aromatiques ou non au sein de la chaîne latérale

3.2.2.4.1 Importance de l'encombrement stérique sur l'affinité

En complément de ces résultats, l'évaluation des analogues possédant des groupements cycliques aliphatique ou aromatique a également été réalisée (tableau 12 et 13).

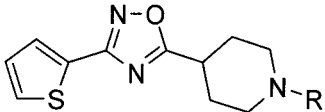
				
référence	R	inhibition %	CI ₅₀ RPS μM	CMI BCG μM
BDM_14801		39	1.54	0.24
30		71	1.12	0.24
31		48	1.49	ND
32		52	ND	0.24
33		78	1	1.2
34		76	3.49	ND
35		8	ND	ND
36		6	12.03	ND
37		59	ND	ND

Tableau 12: Structures et activités mesurées *in vitro* par RPS et sur *M. bovis*

De façon générale, l'introduction d'un cycle a une conséquence favorable sur l'activité (tableaux 12 et 13). Des relations-structures-activités sont cependant observables.

En ce qui concerne les chaînes aliphatiques, la taille des cycles introduits semble importante, puisqu'un cyclopropyle (composé **30**, CI_{50} :1.12 μ M) est mieux toléré qu'un cyclohexyle (composé **34**, 3.49 μ M) (tableau 12). La comparaison de la CI_{50} élevée du composé isobutyle **21** (10.34 μ M, tableau 10) avec celle du composé cyclopropyle **30** (CI_{50} : 1.12 μ M) est bien révélatrice de l'affinité préférentielle du site de liaison pour des groupements moins volumineux.

La notion d'encombrement stérique peut également expliquer le fait que l'éloignement des cycles par rapport à la liaison carboxamide ou bien leur substitution engendre une diminution de l'inhibition observable. Les comparatifs entre les composés **34** et **35**, induisant respectivement 76 et 8 % d'inhibition, et entre les dérivés **34** et **36**, possédant des CI_{50} respectives de 3.49 et 12.03 μ M, illustrent bien cela.

Le composé **33** possédant une insaturation au sein de la chaîne latérale présente une activité identique à celle du composé **18** (CI_{50} 1 μ M, tableau 9). Cela recoupe bien les observations précédemment réalisées sur le rôle favorable d'une insaturation dans l'interaction.

En terme d'activité sur la mycobactérie, les résultats restent cohérents avec des CMI de 0.24 μ M pour les composés **30** et **32**. Seule la CMI élevée de 1.2 μ M observée avec le composé **33** doit être due à une mauvaise pénétration du composé au sein de la mycobactérie.

Ces premières conclusions de relation-structure-activité restent cohérentes pour les analogues possédant un cycle aromatique sur leur chaîne latérale (tableau 13).

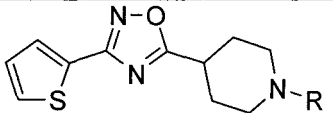
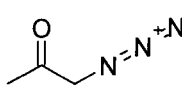
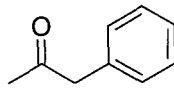
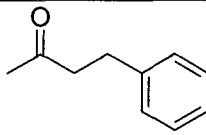
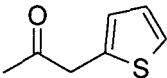
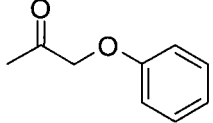
				
référence	R	inhibition %	CI ₅₀ RPS μM	CMI BCG μM
BDM_14801		39	1.54	0.24
38		45	ND	0.24
39		7	6.32	ND
40		93	0.52	0.24
41		75	1.5	0.24

Tableau 13: Structures et activités mesurées *in vitro* par RPS et sur *M. bovis*

La différence d'activité entre les composés **38** (45 % d'inhibition) et **39** (7 % d'inhibition), possédant juste un chaîon méthyle de différence, recoupe bien les observations réalisées avec les dérivés **34** et **35**.

Les activités *in vitro* (Figure 102) et chez *M. bovis* du composé **40** sont particulièrement intéressantes. Avec une CI₅₀ de 0.52 μM et une CMI de 0.24 μM, ce composé devient le ligand de la protéine le plus actif sur la mycobactérie.

Le composé **41** présente une activité *in vitro* comparable à celle du composé BDM_14801 (CI₅₀ de 1.5 μM contre 1.54 μM), mais élevée par rapport à son proche analogue **39** (CI₅₀ : 6.32 μM). Pourtant, seule la substitution d'un chaîon carboné par un oxygène différencie ces deux dérivés. Une étude plus approfondie de l'interaction avec la protéine était nécessaire pour expliquer cela.

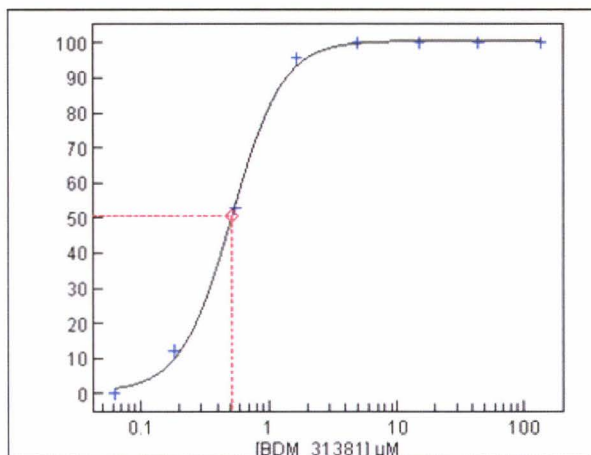


Figure 102 : Courbe doses réponses obtenue par RPS du composé **40**

Les composés **38**, **40** et **41** sont donc apparus à ce niveau comme étant des dérivés prometteurs tant *in vitro* que *in bacterio*. Des expériences de cocrystallisation au sein de la protéine ont donc été réalisées.

3.2.2.4.2 Etude radiocristallographique de la structure d’EthR en présence des composés **38**, **40** et **41**

Les structures radiocristallographiques des composés **38**, **40** et **41** au sein de EthR ont été déterminées avec des résolutions respectives de 1.70, 1.70 et 1.75 Å (Figure 103). Pour les composés **38** et **40**, leur positionnement au sein de EthR est extrêmement semblable à celui des composés BDM_14801 et **22** (tableau 14). En effet, les deux liaisons hydrogènes déjà identifiées sont toujours présentes, mais une rotation de la chaîne latérale de la Thr-149 pour le composé **40** rend l’interaction polaire avec l’1,2,4-oxadiazole moins évidente. A part cela, le positionnement des autres résidus de la protéine est fortement conservé et la distance entre les deux Phe-63 est toujours incompatible avec l’interaction protéine / ADN. Cette grande similitude dans le positionnement des résidus de EthR indique que la protéine possède une structure peu flexible. Ce profil est intéressant, car il est propice à la recherche de nouveaux ligands par des études de modélisation moléculaire avec un domaine de liaison d’EthR considéré comme rigide. A l’avenir, cette approche pourrait être exploitée pour aiguiller la synthèse de dérivés d’intérêt.

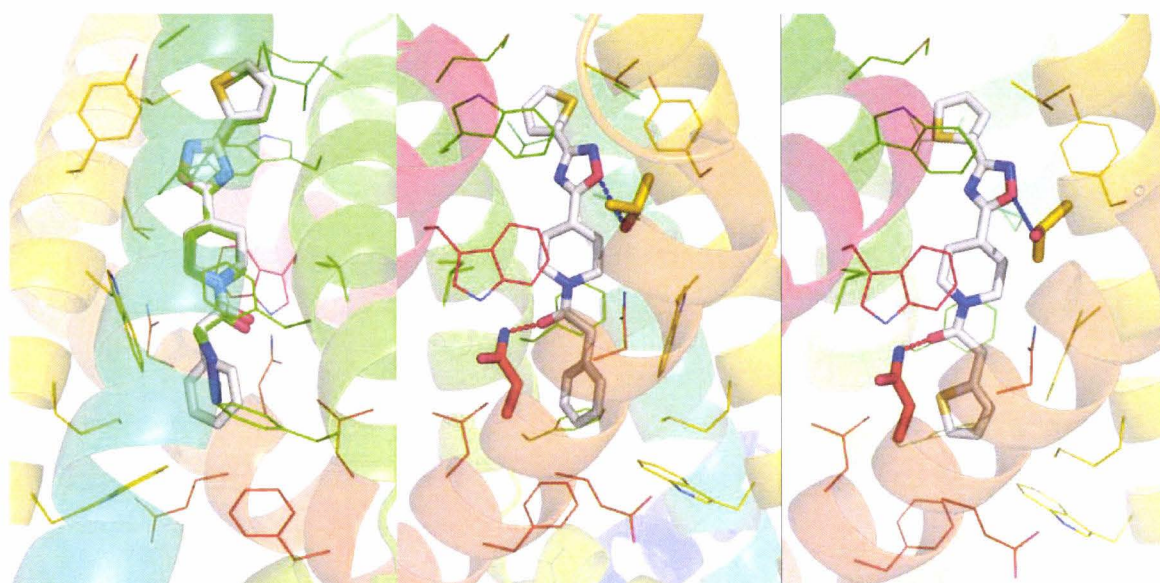


Figure 103 : Droite : Superposition de la structure radiocristallographique de la protéine EthR en présence du composé **38** (blanc) avec le composé BDM_14801 (vert).

Milieu : Structure radiocristallographique de la protéine EthR en présence du composé **38**.

Droite : Structure radiocristallographique de la protéine EthR en présence du composé **40**.

Liaisons hydrogènes en pointillé

composés	distance	distance	Distance $\alpha 3 - \alpha 3'$ entre les Phe-63
	carboxamide/Asn-179	1,2,4-oxadiazole/Thr-149	
	Å	Å	Å
BDM_14801	2.97	3.52	50.0
22	2.82	3.51	50.1
38	2.85	3.65	50.8
40	2.86	5.05	50.5

Tableau 14: Distances des liaisons hydrogènes observées dans les structures radiocristallographiques des composés BDM_14801, **22**, **38** et **40** au sein de EthR

Dans la partie inférieure du domaine de liaison, les cycles phényle et thiophène des dérivés **38** et **40** interagissent comme prévu avec les résidus hydrophobes Phe-114, Met-142, Leu-183 et Trp-145, mais aucune interaction de type π staking n'est observable. Néanmoins, le cycle thiophène du composé **40** est superposable à celui du composé BDM_14500, qui se plaçait dans une configuration inversée de celle de BDM_14801 (Figure 104). Cette observation est très intéressante, car elle montre l'importance du thiophène dans la partie inférieure du domaine de liaison à un ligand. Les deux poches hydrophobes de la protéine semblent donc relativement comparables et la présence d'une méthionine dans chacune d'entre elles est

intéressante (Met-102 et Met-142). Bien qu'aucune interaction soufre / soufre ne soit ni observable, ni décrite dans la littérature, cet atome semble avoir un rôle important dans les interactions hydrophobes mises en jeu. Sa polarisabilité et sa taille importante pourraient en être la cause, d'autant plus que seules des interactions de type Van der Waals peuvent justifier les différentiels d'affinité observés entre les différents ligands.

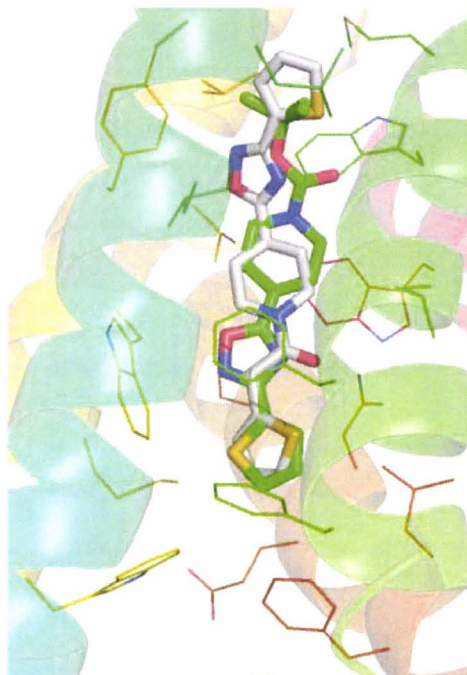


Figure 104 : Droite : superposition de la structure radiocristallographique de la protéine EthR en présence du composé 40 (blanc) avec le composé BDM_14500 (vert).

La structure radiocristallographique de EthR en présence du composé **41** est particulièrement intéressante, car le positionnement observé du ligand est différent de celui observé pour BDM_14801 et les autres analogues (Figure 105 et 106 gauche). Malgré la conservation de la liaison hydrogène entre l'Asn-179 et la fonction carboxamide (distance de 2.92 Å), la présence d'une interaction polaire supplémentaire entre l'oxygène de l'aryloxyacétamide et l'Asn-179 (distance de 3.35 Å) provoque un décalage par rapport aux positionnements précédemment observés.

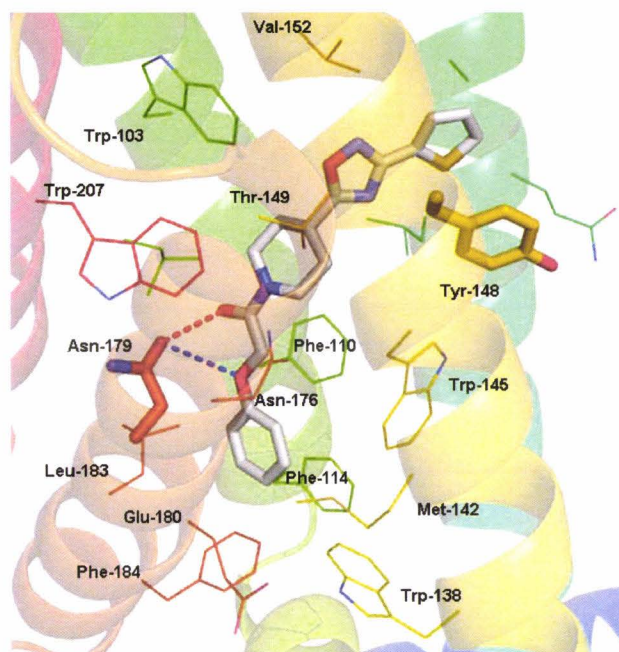


Figure 105 : Structure radiocristallographique de la protéine EthR en présence du composé **41** (blanc) Asn-179 et Tyr-148 représentés en bâtonnet. Interaction avec l'Asn-179 en pointillé
 Droite : superposition de la protéine en présence du composé **41** (blanc) avec le composé BDM_14801 (vert)

Une variation de 1.84 Å entre les fonctions carboxamides des composés **41** et BDM_14801, ainsi qu'une rotation du plan des cycles 1,2,4-oxadiazole et thiophène d'un angle 47° par rapport à la position, presque conservée, du plan du cycle pipéridine, sont ainsi observables (Figure 106 gauche). Ce mouvement induit le basculement de la Tyr-148 et la survenue d'un π stacking entre cette dernière et le cycle thiophène (4.2 à 4.8 Å), ce qui stabilise l'interaction ligand/protéine. De façon comparable à ce qui avait été observé pour le composé **22**, la Phe-114 s'incline d'un angle de 19° pour permettre un meilleur positionnement du cycle phényle au sein du domaine hydrophobe (Figure 106 droite). L'interaction polaire entre la Thr-149 et l'1,2,4-oxadiazole est toujours présente, mais de façon moins marquée, en raison de l'augmentation de la distance entre ces groupements (4.06 Å). Malgré ces différences dans la disposition du ligand, la distance mesurée entre les deux Phe-63 est de 50.6 Å, ce qui est comparable aux valeurs précédemment observées.

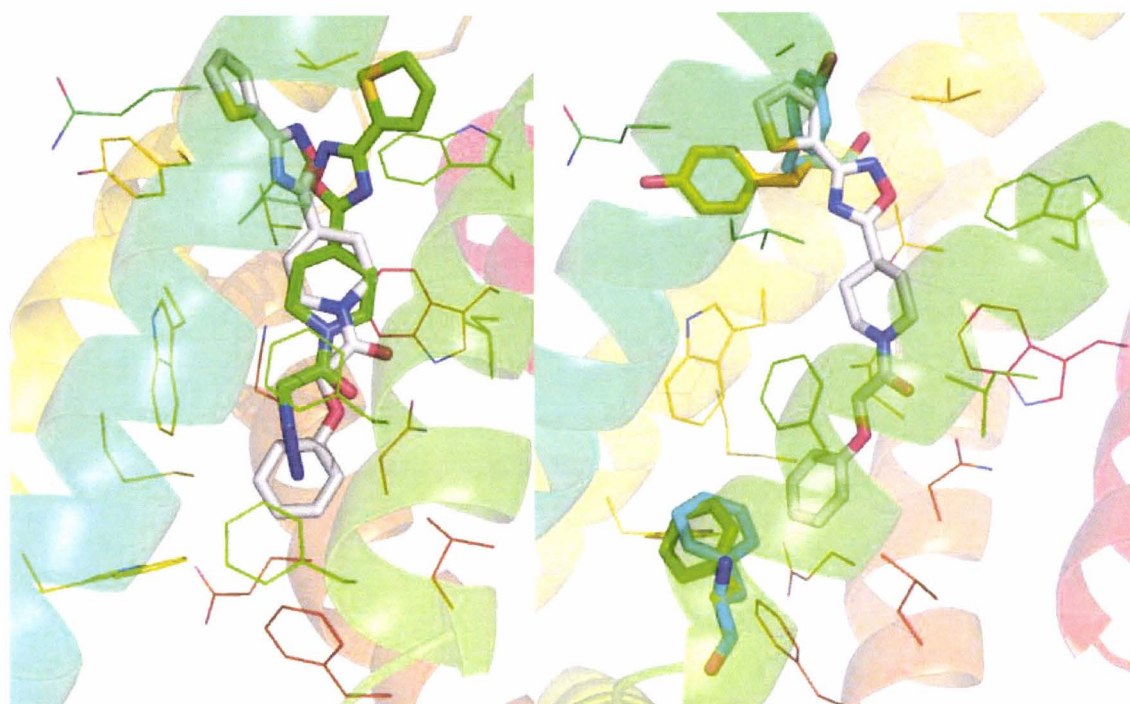


Figure 106 : Droite : superposition de la protéine en présence du composé **41** (blanc) avec le composé BDM_14801 (vert)

Gauche : variation du positionnement de la tyr-148 (bâtonnet orange) et de la Phe-114 (bâtonnet vert) au sein de la structure radiocristallographique de la protéine EthR en présence du composé **41** (blanc). Tyr-148 et Phe-114, appartenant à la structure de la protéine liée au composé BDM_14801, représentés en bâtonnet bleu

Cette différence de positionnement du composé **41** au sein de la protéine offre des perspectives intéressantes, car la présence du motif aryloxyacétamide permet de réaliser une seconde liaison hydrogène avec l'Asn-179. La synthèse de composés possédant ce groupement pourrait permettre l'identification d'une nouvelle famille de ligand d'EthR.

3.3 Synthèses et évaluation des analogues du composé BDM_14801 après remplacement de l'1,2,4-oxadiazole

A la vue des données radiocristallographiques obtenues avec le dérivé BDM_14801 et certains de ces analogues, le cycle 1,2,4-oxadiazole semble être impliqué, par son oxygène, dans une interaction polaire avec la Thr-149 située à une distance d'environ 3 Å. Son remplacement par d'autres hétérocycles, afin de mesurer l'impact de cette interaction et de potentiellement la majorer, a donc été envisagé.

3.3.1 Synthèses et évaluation de l'analogue 1,2,4-triazole du composé 40

3.3.1.1 Synthèse de l'analogue 1,2,4-triazole du composé 40

La synthèse de l'analogue 1,2,4-triazole du composé **40** a été envisagée selon le protocole décrit par Yeung *et al*¹⁶², consistant en un couplage d'un nitrile avec un hydrazide en présence de carbonate de potassium dans le *n*-butanol à reflux (schéma 22). Le 4-nitrile-1-*t*Boc-pipéridine a été obtenu avec un rendement de 98 % par déshydratation du carboxamide correspondant en présence d'anhydride trifluoroacétique et de DIPEA dans le THF anhydre¹⁶³. Il a ensuite été couplé au dérivé commercial 2-thiophènehydrazide pour aboutir au 1,2,4-triazole souhaité avec un rendement de 30 %. La fonction *t*Boc a ensuite été clivée en milieu acide avec un rendement de 81 %, et la fonction amine ainsi libérée a été couplée avec l'acide 2-thiophèneacétique en présence d'EDCI pour donner l'analogue attendu BDM_33069 avec un rendement de 72 %.

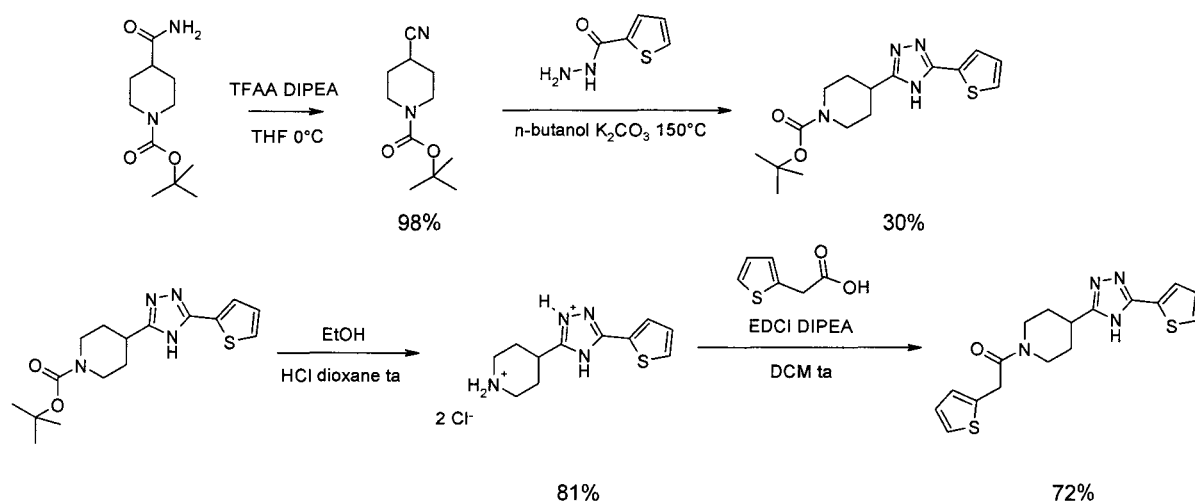


Schéma 22: Synthèse du composé BDM_33069

3.3.1.2 Evaluation par RPS de la capacité inhibitrice du composé BDM_33069

La capacité de BDM_33069 à inhiber l'interaction EthR / promoteur *ethA* a été évaluée par résonance plasmonique de surface dans des conditions similaires à celles utilisées

¹⁶² Yeung, K.-S.; Farkas, M. E.; Kadow, J. F.; Meanwell, N. A. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 3429-32.

¹⁶³ Willand, N.; Joossens, J.; Gesquiere, J.-C.; Tartar, A. L.; Evans, D. M.; Roe, M. B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5741-6.

précédemment (puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU, [EthR] = 540 nM). Il est apparu que l'analogue 1,2,4-triazole possède une affinité trois fois moindre pour EthR que son analogue 1,2,4-oxadiazole (CI_{50} de 6.06 μ M pour BDM_33069 contre 2.02 μ M pour le composé **40**) (Figure 107). L'interaction polaire observable avec la Thr-149 n'a donc pas été renforcée par la modification réalisée. L'introduction d'un hétérocycle donneur et accepteur de liaison hydrogène au sein d'une cavité hydrophobe n'est peut-être pas aussi favorable qu'avec un simple accepteur. De plus, le caractère donneur de l'atome d'oxygène de l'hétérocycle était impliqué dans l'interaction et son remplacement pourrait expliquer la diminution de l'affinité observée. Afin de vérifier si le composé BDM_33069 a, malgré tout, conservé un positionnement similaire à celui du composé **40**, des études radiocristallographiques sont actuellement envisagées.

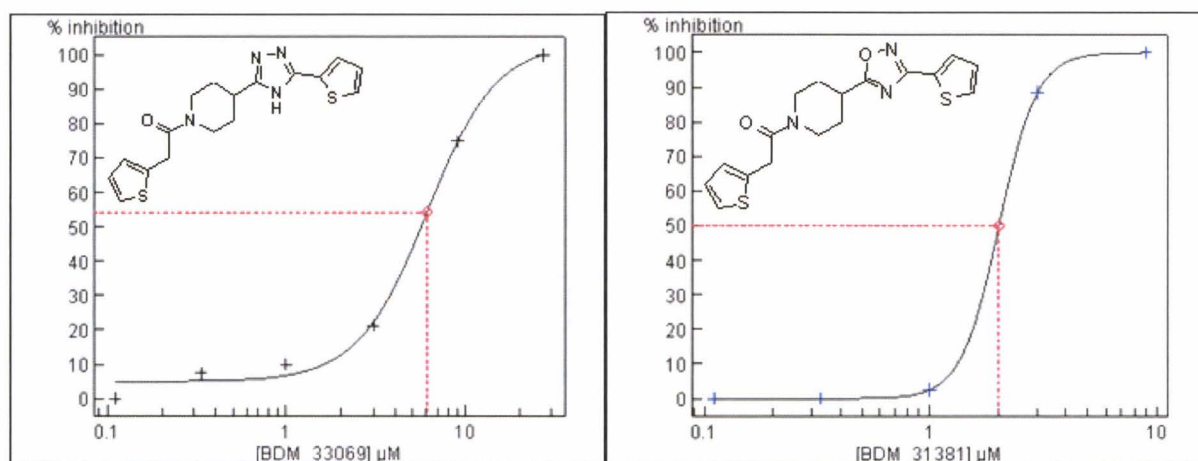


Figure 107 : Courbes doses réponses et détermination des CI_{50} des composés BDM_33069 et **40** (BDM_31381) par RPS. Puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU d'ADN. [EthR] = 540 nM

3.3.2 Synthèse et évaluation de l'analogue 1,2,4-thiadiazole du composé BDM_14801

3.3.2.1 Synthèse de l'analogue 1,2,4-thiadiazole du composé BDM_14801

La synthèse de l'analogue 1,2,4-thiadiazole du composé BDM_14801 a été réalisée par synthèse de l'intermédiaire *t*Boc. Ce dernier a été réalisé par couplage du dérivé 4-Carbamoyl-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle avec le thiophène-2-thiocarboxamide en présence d'iodobenzènediacétate dans le dichlorométhane à température ambiante. Le produit désiré a été obtenu après purification par chromatographie flash avec un rendement de 77 % (Schéma 23). Les analyses par LC-MS du milieu réactionnel ont révélé la présence d'un seul

signal possédant un ion moléculaire de masse désirée. La purification du milieu réactionnel et l'analyse par RMN ^1H et ^{13}C n'ont pas permis de déterminer si le résidu obtenu était l'une des deux formes ou un mélange de ces composés. Le résidu obtenu a donc été engagé successivement dans des réactions de déprotection, de couplage avec le chlorure de chloracétyle et de substitution nucléophile, afin d'aboutir à l'analogue désiré BDM_15046 avec un rendement global de 3 % après purification par chromatographie flash (Schéma 24).

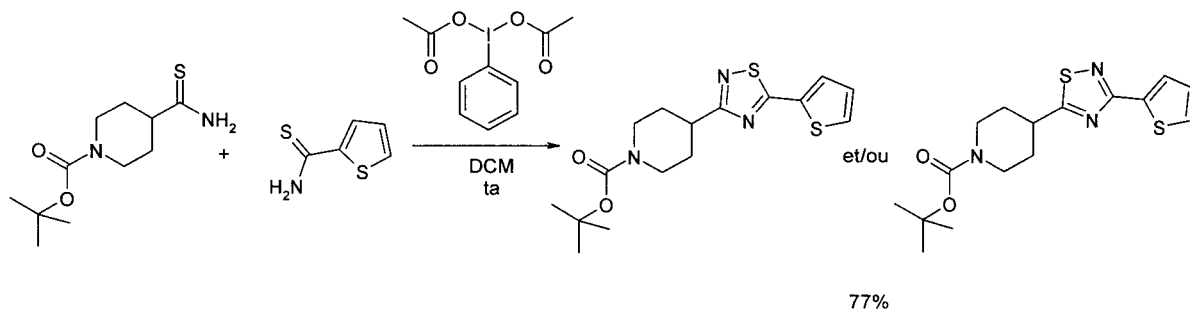


Schéma 23: Synthèse de l'intermédiaire réactionnel *t*Boc 1,2,4-thiadiazole

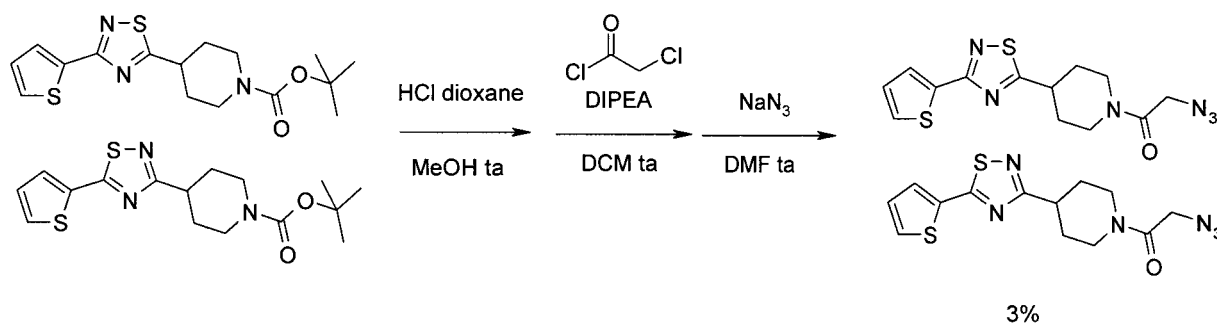


Schéma 24: Synthèse du composé BDM_15046

La capacité de cet analogue à inhiber l'interaction EthR/promoteur *ethA* a ainsi pu être évaluée par RPS.

3.3.2.2 Evaluation par RPS de la capacité inhibitrice du composé BDM_15046

Les composés BDM_14801 et BDM_15046 ont été testés en un point par RPS à une concentration de 5 μM dans les conditions précédemment décrites (Puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU d'ADN. [EthR] = 540 nM).

Une inhibition de 6 % de l'interaction protéine/ADN a ainsi pu être mesurée en présence du composé BDM_15046 contre une valeur de 22 % observable avec le composé BDM_14801.

Cette observation montre que la présence d'un soufre dans l'hétérocycle ne favorise pas l'interaction avec la protéine. Le soufre ne pouvant être impliqué dans des liaisons hydrogènes, son introduction à la place de l'oxygène engagé dans une interaction avec la Thr-149 expliquerait logiquement la perte d'activité observée.

3.4 Comparaison de l'activité des analogues synthétisés sur mycobactéries

3.4.1 Détermination des concentrations minimales effectrices des composés les plus intéressants sur *Mycobacterium bovis*

Plusieurs des analogues synthétisés ont permis une potentialisation de l'éthionamide sur *M. bovis* à une concentration de 0.24 μM . Leur comparaison entre eux n'était donc pas envisageable par cette méthode. De façon à éviter l'utilisation de quantité trop faible d'ETH pouvant nuire à la pertinence des résultats, sa concentration fut fixée à 0.24 μM avec une concentration en ligand variable de 1 à 25 μM . Ainsi, les concentrations minimales efficaces ou CME ont pu être déterminées pour les analogues possédant la plus faible CMI. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 15.

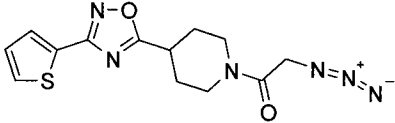
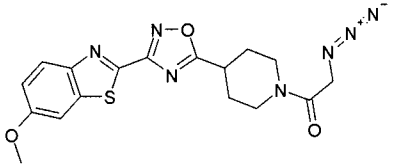
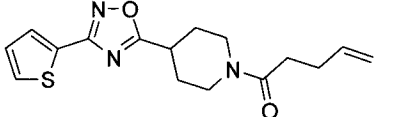
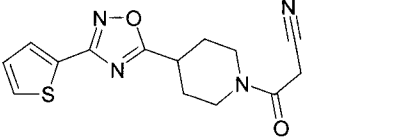
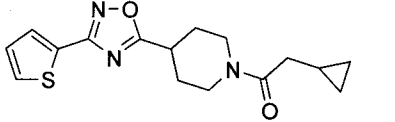
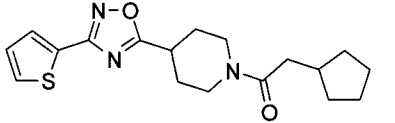
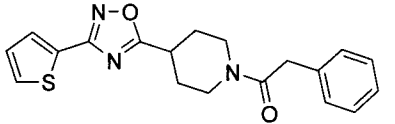
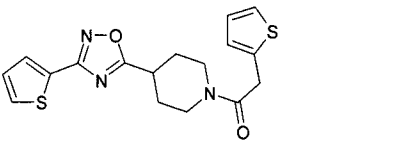
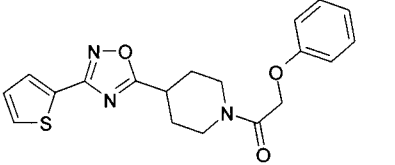
composés	structures	CI ₅₀ μM RPS	CME μM BCG
BDM_14801		1.54	20
9		1.60	25
18		1.00	15
20		3.33	25
30		1.12	10
32		ND	5
38		ND	5
40		0.52	1
41		1.50	5

Tableau 15: Détermination des CME des composés les plus intéressants chez *M. bovis* avec une concentration en ETH de 0.24 μM

Les CME mesurées montrent une bonne corrélation avec les valeurs de CI₅₀ déterminées par RPS. En effet, les composés **9** et **20** restent moins actifs que le composé BDM_14801 (CME de 25 μM contre 20 μM pour BDM_14801), et les analogues plus actifs possèdent bien une CME diminuée par rapport à celle de la référence. Les composés **32**, **38**, **40** et **41** sortent du lot avec des CME inférieures ou égales à 5 μM.

L'information principale qui ressort de cette évaluation est la confirmation du composé **40** comme dérivé le plus actif. Le gain d'activité observé par rapport au composé BDM_14801 est d'un facteur vingt. Ce résultat est beaucoup plus important que ce que les données *in vitro* laissaient envisager. Outre la plus grande affinité du composé **40** pour la protéine, le gain d'activité est probablement imputable à une meilleure disponibilité du ligand au sein de la mycobactérie.

L'évaluation de l'effet potentialisateur de l'ETH chez *M. tuberculosis* H37Rv par méthode Bactec a donc été entreprise afin de confirmer ces bons résultats.

3.4.2 Confirmation de la potentialisation de l'éthionamide sur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Les résultats obtenus par méthode Bactec MGIT 960 sont résumés dans le tableau 16.

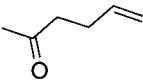

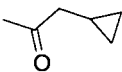
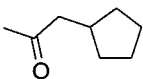
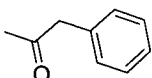
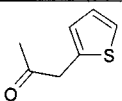
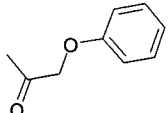
Références	Chaîne latérale	CMI ETH µg/mL	CMI ETH avec ligand 25 µM µg/mL	Facteur de potentialisation
18		1	0.05	20
20		1	0.1	10
30		0.5	0.05	10
32		1	0.1	10
38		1	0.1	10
40		0.5	< 0.025	> 20
41		1	0.1	10

Tableau 16: potentialisation de l'éthionamide chez *M. tuberculosis* H37Rv. Evaluation par méthode Bactec MGIT 960

Les résultats obtenus montrent que tous les composés évalués ont permis une potentialisation de l'éthionamide de façon au moins équivalente à celle évaluée pour le composé BDM_14801 (facteur 5 à 10). Les composés 18 et surtout 40 apparaissent comme étant les plus intéressants avec des facteurs de potentialisation de vingt et plus.

Ces composés constituent donc une bonne base pour la perspective d'une potentialisation de l'éthionamide *in vivo* sur un modèle murin. Préalablement à cela, il était cependant nécessaire de déterminer les caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques de ces dérivés.

3.5 Caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés d'intérêt

3.5.1 Détermination de la solubilité et du log D

Les résultats obtenus avec les derniers composés synthétisés étant prometteurs, les caractéristiques physico-chimiques, à savoir la solubilité et le log D, ont été définies pour certains des analogues (tableau 17). Ces paramètres sont évalués selon des conditions identiques à celles utilisées pour les composés 1,2,3-triazoles identifiés par click chemistry *in situ* (chapitre 3, section 2.4.1).

composés	Solubilité $\mu\text{g/mL}$	Log D
BDM_14801	9.5	1.2
18	> 63.5	1.0
20	> 60.4	0.9
30	> 63.5	0.8
32	23.6	3.15
38	11.2	2.18
40	26.3	ND
41	20.6	2.24

Tableau 17: Valeurs de solubilité et de log D mesurées pour certains composés

Les valeurs observées révèlent que le groupement azoture est très limitant pour la solubilité (9.5 $\mu\text{g/mL}$). Les autres analogues sont donc favorisés par rapport au composé BDM_14801 en terme de biodisponibilité. Les composés **32**, **38**, **40** et **41** possèdent une solubilité inférieure (11.2 à 26.3 $\mu\text{g/mL}$) à celle des analogues **18**, **20** et **30** (60.4 à 63.5 $\mu\text{g/mL}$) possédant une chaîne latérale plus flexible ou plus réduite.

Les valeurs de log D des composés **18**, **20** et **30** se situent dans un même ordre de grandeur (de 0.8 à 1) et sont comparables à celle du composé BDM_14801 (1.2). Ces dérivés ont donc

une bonne affinité pour les milieux aqueux et lipidique, ce qui est propice à une bonne distribution au sein de l'organisme. Les composés **32**, **38** et **41** présentent une plus grande affinité pour les milieux lipidiques avec des valeurs de log D de 2.18 à 3.15.

Les composés les plus solubles **18**, **20** et **30**, ainsi que le composé le plus actif *in vitro* et *in bacterio* **40** ont donc été retenus pour l'étude de leurs propriétés pharmacocinétiques.

3.5.2 Détermination des stabilités plasmatique et gastrique

Dans un second temps, les stabilités plasmatique, gastrique et microsomale des composés les plus actifs *in vitro* et *in bacterio* furent évaluées. En effet, il est important, avant d'envisager des études plus poussées, de s'assurer que les dérivés actifs ne sont pas métabolisés ou dégradés à trop grande vitesse, car cela limiterait énormément leur capacité thérapeutique.

La stabilité plasmatique fut réalisée par détermination de la concentration en composé au cours du temps par méthode MRM. Une solution 100 µM de composé dans du plasma de rat avec 2 % de DMSO à 37°C fut analysée pendant 96 heures. La quantité en composé fut évaluée par ajout d'un étalon interne, puis extraction par de l'acétate d'éthyle après précipitation des protéines en présence d'acide phosphorique.

L'étude de stabilité gastrique des composés fut réalisée de façon similaire par utilisation du milieu SGF (Simulated Gastric Fluid) à la place du plasma. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 18.

Composés	Demi-vie plasmatique (heures)	Demi-vie gastrique (heures)
BDM_14801	21	ND
18	> 96	> 120
20	61	> 120
30	> 96	> 120
40	ND	ND

Tableau 18: Valeurs de demi-vie plasmatique et gastrique des composés d'intérêt

Ces résultats mettent en avant la bonne résistance des composés, que ce soit dans le milieu plasmatique ou gastrique. Leurs demi-vies sont parfaitement cohérentes avec une utilisation quotidienne en thérapeutique et une prise *per os*, ce qui est important dans l'optique d'un traitement à long terme. Le groupement azoture apparaît néanmoins comme étant le moins

robuste des substituants avec une demi-vie de 21 heures contre 61 pour le groupement nitrile et de plus de 96 pour les analogues cyclopropyle et allyle.

3.5.3 Détermination de la stabilité microsomale

L'étude de la stabilité de nos composés en présence de microsomes de souris mâle a permis l'évaluation de leur résistance globale aux diverses enzymes de dégradation, cytochromes P450 ou non. Lors de ces expériences, le NADPH a été généré *in situ* par oxydation de Glucose-6-Phosphate (G6P) par la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) en présence de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP).

La stabilité microsomale des composés fut donc évaluée par incubation en présence de microsomes, de NADP, de G6PD, de G6P et de chlorure de magnésium dans un tampon phosphate (7.4) à 37°C. Le propranolol fut utilisé comme composé témoin afin de s'assurer de la fonctionnalité des microsomes. Deux paramètres ont ainsi été définis graphiquement, la demi-vie correspondant au temps nécessaire à la disparition de 50 % du composé, et la clairance correspondant au volume de plasma totalement épuré par unité de temps. Les valeurs observées sont rapportées dans le tableau 19.

Composés	Demi-vie (min)	Clairance $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$
propranolol	13	121
BDM_14801	14	84
20	91	14
30	10	162
40	3	349

Tableau 19: Demi-vie, clairance et pourcentage du métabolisme indépendant du NADPH mesurés pour les composés BDM_14801, 20, 30 et 40

Ces résultats montrent une métabolisation rapide des composés au cours du temps. Il convient cependant de ne pas oublier que les conditions utilisées sont extrêmement efficaces mais peu révélatrices de celles rencontrées *in vivo*. La disparition rapide du propranolol dans ce test montre que les fortes clairances observées ne sont pas forcément limitantes pour le développement des composés.

L'information importante qui ressort de cette étude est la plus grande stabilité du groupement nitrile par rapport à l'azoture, au cyclopropyle ou au thiophène correspondant. Il n'est d'ailleurs pas très étonnant que ce dernier se révèle être le plus instable, en raison de la métabolisation particulière de cet hétérocycle¹⁵⁸ (chapitre 3, section 3). Néanmoins, cela ne permet pas d'expliquer la différence de métabolisation observée entre les composés BDM_14801, **20** et **30**. Le mécanisme de dégradation suspecté pourrait être le clivage de la liaison carboxamide par une amidase. Cela expliquerait le fait que la nature des substituants situés à proximité influence la demi-vie observée. Ce clivage ne devrait cependant pas être facile, en raison de la présence d'une fonction carboxamide particulièrement encombrée¹⁶⁴.

Les perspectives envisagées consistent en l'identification préalable des métabolites principaux, ainsi qu'en la synthèse de nouveaux dérivés conservant une bonne activité et possédant une meilleure stabilité métabolique. Cette stratégie est actuellement en cours de développement. Pour cela, la substitution du cycle thiophène en position 2 ou l'introduction de groupement volumineux à proximité de la fonction carboxamide est actuellement à l'étude.

¹⁶⁴ Nassar, A.-E. F.; Kamel, A. M.; Clarimont, C. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 1020-8.

Conclusion

Le travail décrit dans ce mémoire a consisté en la découverte et l'optimisation de ligands synthétiques de la protéine EthR de *Mycobacterium tuberculosis*. La détermination initiale d'un pharmacophore grâce aux données radiocristallographiques disponibles au début du projet, ainsi que la mise au point d'une méthode de criblage basée sur la résonance plasmonique de surface, ont permis dans un premier temps d'identifier le hit BDM_14500 appartenant à la famille des dérivés 1,2,4-oxadiazole. Cette avancée a permis l'étude des interactions de ce composé avec la protéine par études radiocristallographiques et la validation du pharmacophore établi (figure 108).

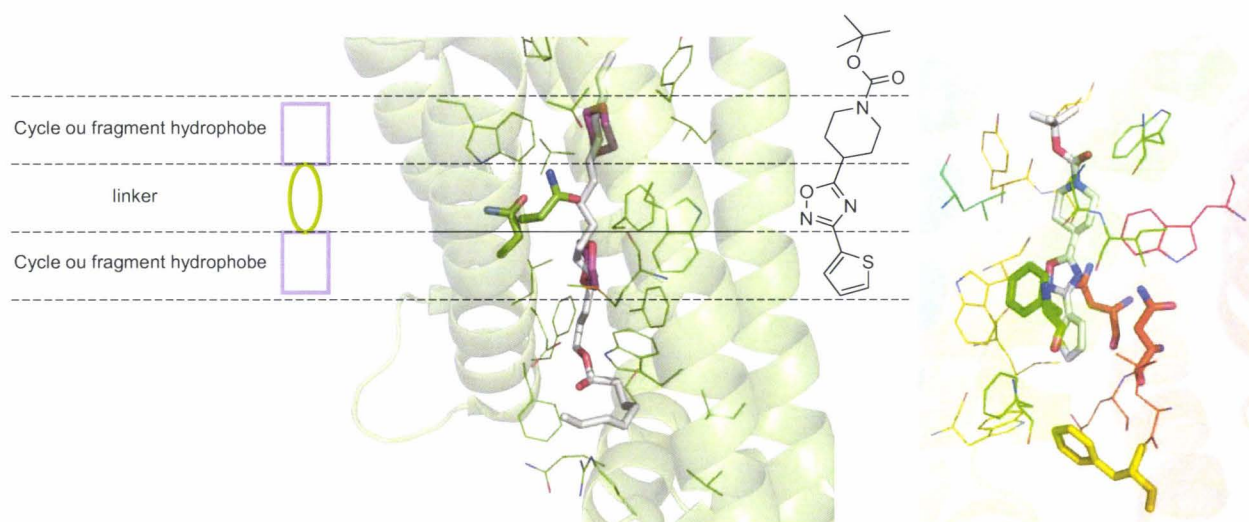


Figure 108 : Identification du composé BDM_14500 comme ligand de EthR. Superposition de sa structure avec le pharmacophore déterminé (droite) et structure radiocristallographique obtenue (gauche)

Par la suite, une potentialisation de l'éthionamide d'un facteur quatre chez *M. tuberculosis* H37Rv a été observée en présence de BDM_14500. Ces résultats ont validé EthR comme cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de la tuberculose et ont démontré la validité de la stratégie mise en œuvre (figure 109).

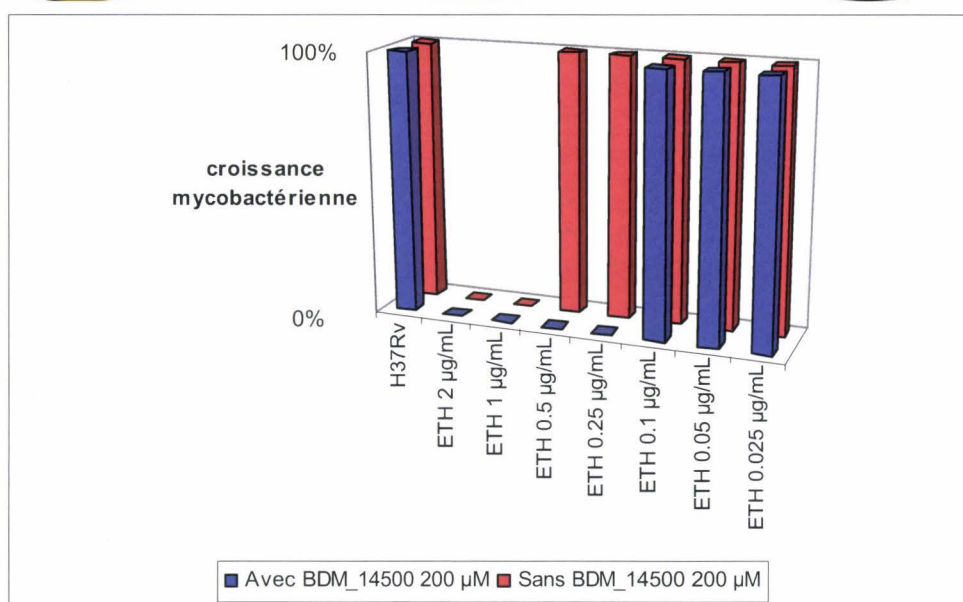
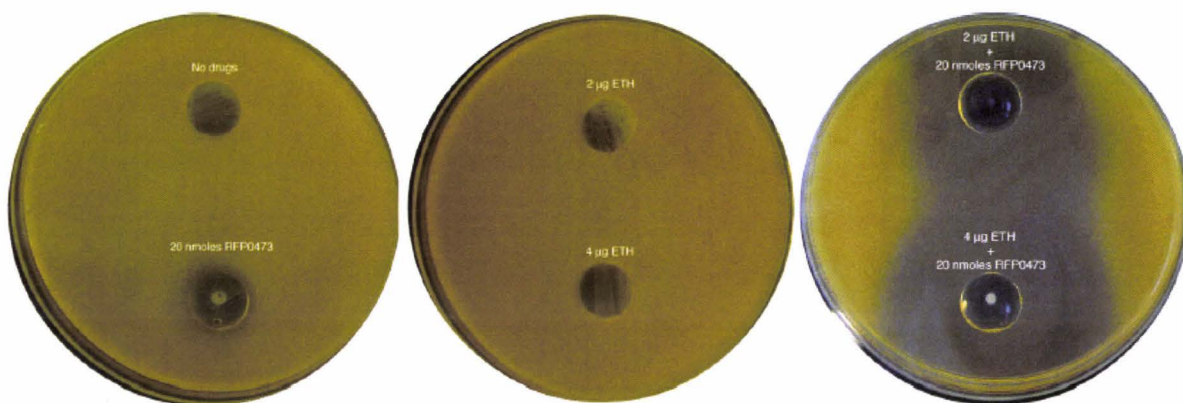


Figure 109 : Potentialisation de l'éthionamide chez *M. tuberculosis* H37Rv : en plaque en présence de 20 nmoles de BDM_14500 (haut), en milieu liquide en présence de 200 µM de BDM_14500 (Bactec MGIT 960)

L'optimisation de BDM_14500 par click chemistry *in situ* a conduit à la synthèse de l'intermédiaire azoture BDM_14801 (figure 110). Ce dérivé s'est révélé posséder une affinité 28 fois plus importante pour la protéine que le hit initial (CI_{50} de 1.36 µM contre 38 µM). Il a également montré une capacité à potentialiser l'éthionamide d'un facteur cinq à dix chez *M. tuberculosis* H37Rv. Ces données *in vitro* en ont fait un composé charnière dans le déroulement du projet.

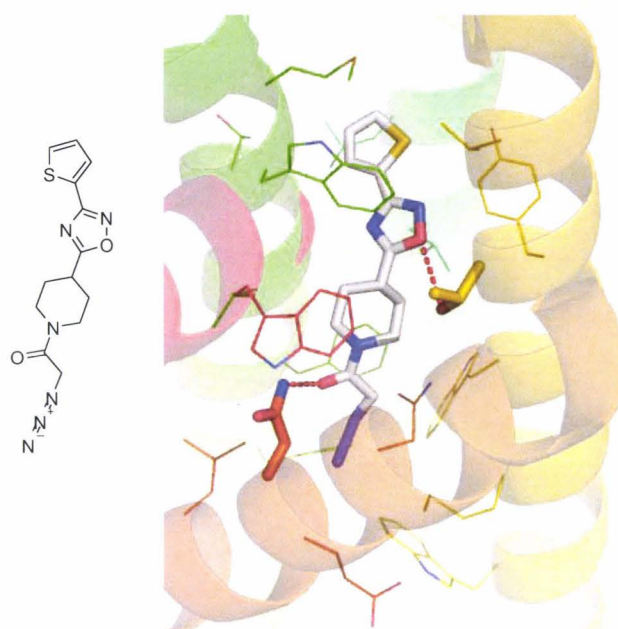


Figure 110 : Formule du composé BDM_14801 et structure radiocristallographique en présence d’EthR

Le couplage de BDM_14801 en présence de la protéine et d’une sélection d’alcyne a abouti à la découverte des composés BDM_14949 et BDM_14950. Ces derniers constituent deux des ligands d’EthR les plus affins identifiés à ce jour (CI_{50} de 0.91 et 0.94 μM contre 7.4 μM pour BDM_14801). Ce gain d’affinité est lié à la mise en œuvre de nouvelles interactions ligand/protéine qui ont pu être mises au jour par des études radiocristallographiques (π stacking avec le Trp-138) (figure 111). Néanmoins, cette augmentation d’affinité s’est accompagnée d’un accroissement du poids moléculaire et la faible solubilité des dérivés 1,2,3-triazoles (1.82 et 0.48 $\mu\text{g/mL}$) ne leur permettait plus d’être aussi actifs sur la mycobactérie. Cependant, ce travail a permis de comprendre comment il était possible d’occuper une grande partie du site de liaison avec des composés synthétiques. L’optimisation du composé BDM_14801 par une approche orientée de relation structure activité a donc été entreprise.

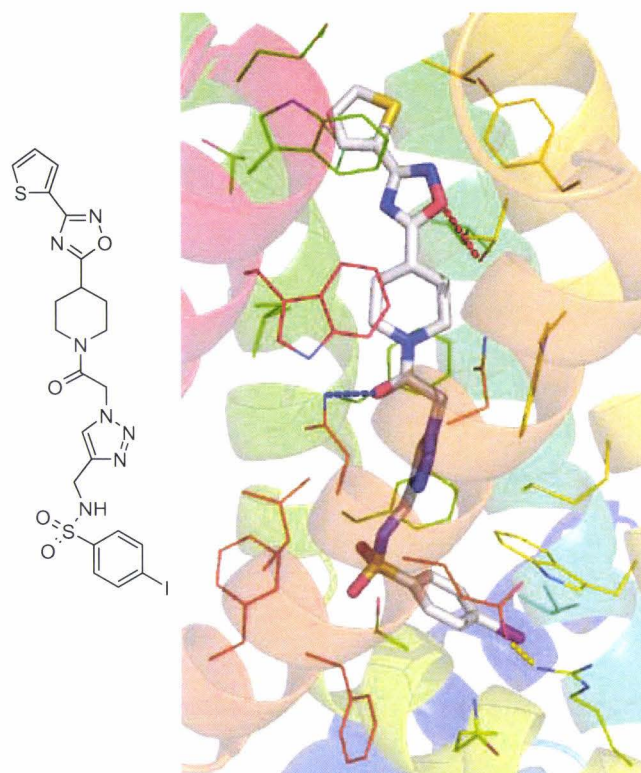


Figure 111 : Formule du composé BDM_14950 et structure radiocrystallographique en présence d’EthR

Les différents composés synthétisés lors de cette approche ont permis l’identification d’analogues possédant une meilleure affinité que BDM_14801, ainsi qu’une activité potentialisatrice plus marquée sur la mycobactérie. Les résultats de cette stratégie et les données radiocrystallographiques obtenues pour quatre des analogues ont montré l’importance de la fonction carboxamide et de l’hétérocycle 1,2,4-oxadiazole dans l’affinité mesurée, avec une très bonne conservation des liaisons hydrogènes mises en jeu. L’importance du cycle thiophène dans les interactions a également été mise en avant avec la découverte du composé **40**, le plus actif sur *M. tuberculosis* H37Rv à ce jour (potentialisation de l’ETH d’un facteur supérieur 20).

A ce stade, deux composés ont été retenus : le composé **40**, car il est le plus actif *in vitro* sur *M. tuberculosis* H37Rv, et le composé **20**, qui possède les meilleures propriétés pharmacocinétiques et notamment une plus grande stabilité (tableau 20). Ces deux composés n’ayant montré aucune cytotoxicité sur cellules HepG₂, leur capacité à potentialiser l’éthionamide *in vivo* a été étudiée dans le cadre d’une collaboration. Avant d’engager ces composés dans le traitement de souris infectées en coadministration avec l’éthionamide, leurs propriétés pharmacocinétiques ont été déterminées chez la souris par voie intra-péritonéale à 100 mpk. Les valeurs d’AUC mesurées sont en adéquation avec les paramètres mesurés

auparavant (tableau 20) et une étude de tolérance de la dose administrée n'a pas montré d'effets indésirables.

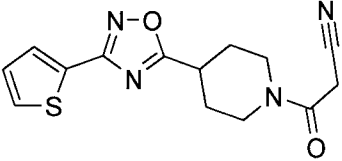
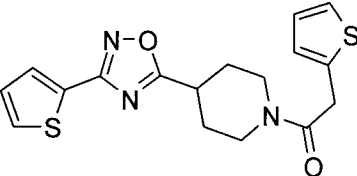
composés	20	40
		
CME <i>M. bovis in vitro</i> μM	25	1
Facteur potentialisation <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>in vitro</i>	10	>20
Solubilité μg/mL	> 60.4	26.3
Demi-vie microsomale min	91	3
Clairance microsomale μL/min/mg	14	349
AUC μg/h/mL	81.8	4.4

Tableau 20: Paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques déterminés pour les composés 20 et 40

Les études de potentialisation ont ensuite été réalisées sur un modèle de souris infectées par *M. tuberculosis* H37Rv et traitées par une dose quotidienne d'éthionamide. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 112 et montrent que le composé 20 a permis une potentialisation de l'éthionamide d'un facteur trois à quatre. En effet, 100 mpk de 20 permettent une réduction de la charge mycobactérienne de presque cent fois avec seulement 3 mpk d'ETH, alors qu'il faut normalement une dose de 6 à 12 mpk pour arriver à cet effet. Ces bons résultats obtenus pour ce composé et l'absence d'effet pour l'autre ligand sont parfaitement cohérents avec le profil pharmacocinétique observé et confirment l'importance de la biodisponibilité des ligands *in vivo*.

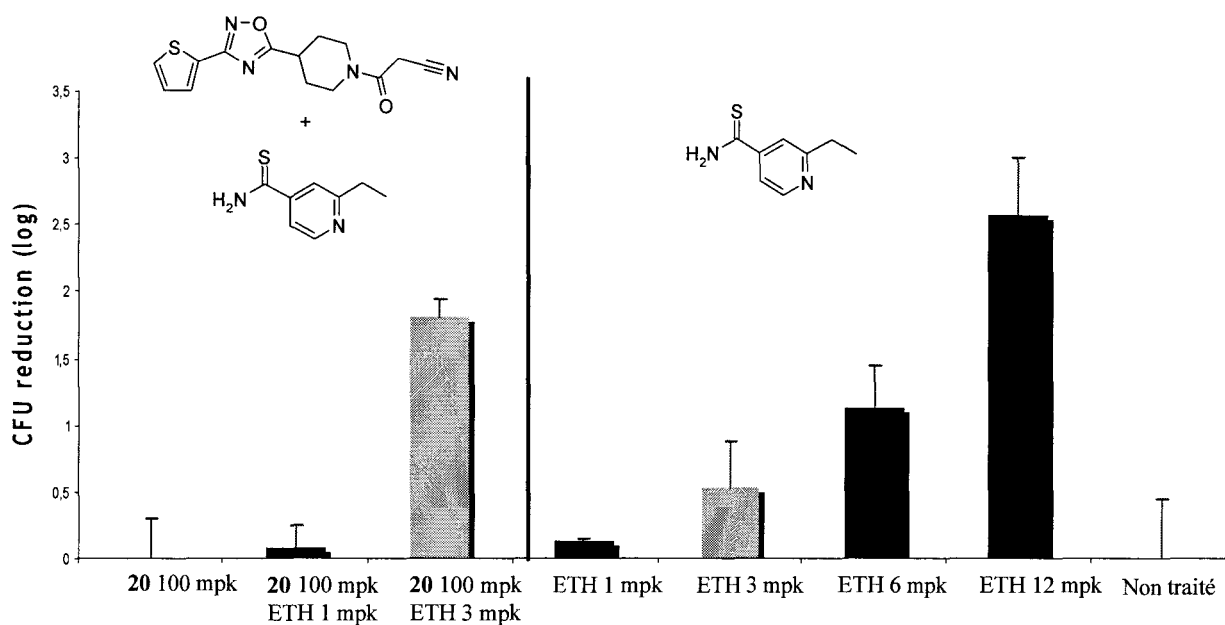


Figure 112 : Potentialisation de l'éthionamide observée en présence du composé **20** chez la souris infectée par *M. tuberculosis* H37Rv. Comparaison de l'effet de 3 mpk d'ETH avec et sans **20** (gris).

Ces résultats démontrent la validité de la stratégie mise en œuvre et la nécessité de poursuivre le travail réalisé. La fonctionnalité des composés testés est démontrée *in vivo*, mais leur optimisation structurale est désormais indispensable, afin d'améliorer encore leur activité et leur profil pharmacocinétique. Ces objectifs s'appuient sur la poursuite du travail de RSA réalisé et sur l'établissement de nouvelles interactions au sein du domaine de liaison de la protéine (notamment avec la tyrosine 148). L'identification d'une nouvelle famille de composé serait également nécessaire, afin d'avoir une série chimique en back-up. Une recherche par criblage *in silico* de ligands d'EthR pourrait également être envisagée, en raison du haut degré de conservation des résidus du domaine de liaison dans les différents complexes obtenus. A terme, ce projet pourrait permettre la découverte d'un candidat médicament dans une nouvelle approche de lutte contre la tuberculose (figure 113).

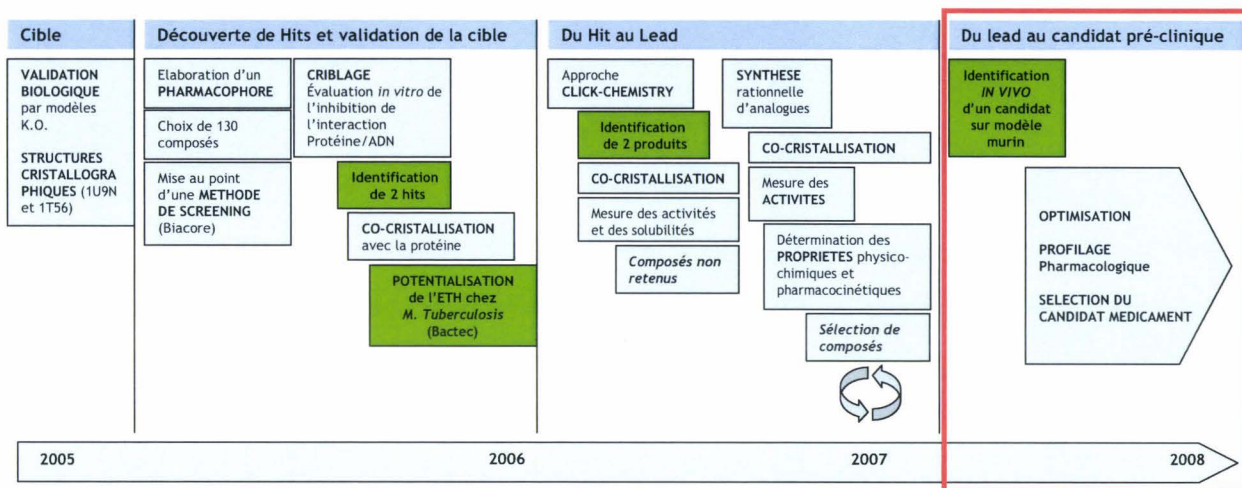


Figure 113 : Avancées réalisées sur le projet. Perspectives encadrées en rouge.

De façon plus générale, plusieurs éléments de ce travail peuvent présenter un intérêt dans d'autres thématiques de recherche. L'exploration systématique de la poche de liaison par click chemistry *in situ* permet une genèse d'informations rapide et l'identification de motifs structuraux d'intérêt. L'utilisation de la résonance plasmonique de surface comme méthode de criblage indirecte à bas débit pourrait également être applicable dans d'autres projets. Par exemple, la découverte de ligands d'autres répresseurs transcriptionnels impliqués dans des mécanismes pathologiques pourrait permettre la découverte de futurs candidats médicaments. Enfin, le fait d'influencer l'expression d'une protéine pour augmenter l'activité d'un médicament antibactérien est une approche novatrice et pourrait être applicable avec d'autres antibiotiques.



Partie expérimentale

1 Expériences de résonance plasmonique de surface

1.1 Protocole général de fonctionnalisation d'une puce CM5 pour les expériences de résonance plasmonique de surface.

Les expériences de résonance plasmonique de surface sont réalisées sur un appareil BIAcore® 2000 (AB, Uppsala).

Le fragment d'ADN double brin biotinilé de 106 pb comportant la région intergénique *ethA-R* est obtenu par PCR de l'ADN chromosomique de *M. tuberculosis* H37Rv en utilisant les amorces O-270 : 5'-CGGTCATGGATCCACGCTATCAAC-3' et O-271 : 5'-biotine-CTGACTGGCCGCGGAGGTGGT-3'. Le fragment d'ADN double brin biotinilé de 113 pb témoin est obtenu par PCR du gène *bla* d' *E. coli* en utilisant les amorces O-343 : 5'-TTTCCGTGTCGCCCTTATTCC-3' et O-344 : 5'-biotine-CCACTCGTGCACCCAAGTATGAT-3'. Les fragments amplifiés sont purifiés par utilisation d'une colonne Quiaquick (Qiagen).

Leur fixation sur la puce CM5 s'effectue par utilisation du protocole standard de couplage d'amine. L'appareil est rempli par un tampon HEPES de composition HEPES 10mM (pH 7.4), NaCl 150mM, EDTA 3mM, surfactant P20 0.005%. Un sensorgramme est ouvert sur deux canaux de la puce avec un débit de 10 µL/min. La streptavidine y est fixée par injection de 60 µL d'un mélange *N*-hydroxysuccinimide / EDC, puis de 120 µL d'une solution de streptavidine à 500 ng/µL dans un tampon acétate de sodium 10 mM (pH 3.5). 60 µL d'une solution d'éthanolamine, puis 10 µL d'une solution aqueuse de dodécyle sulfate de sodium à 0.03 % sont ensuite injectés. Les deux fragments d'ADN double brin biotinilés sont ensuite injectés respectivement sur les deux canaux de la puce CM5 à des concentrations de 325 ng/mL pour l'ADN témoin et de 200 ng/mL pour la région intergénique *ethA-R* de façon à obtenir la variation de masse désirée en response unit.

1.2 Protocole de criblage de composés sur une puce CM5 fonctionnalisée avec 200 RU d'ADN.

L'étude de la fixation de EthR sur l'ADN immobilisé a été réalisée à 25°C dans un tampon Tris (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT et 1% DMSO. L'interaction spécifique est déterminée comme étant la différence de signal entre les deux canaux. Pour le criblage, les composés sont dissous à une concentration de 100 µM dans le tampon de liaison, incubés cinq minutes à 37°C en présence d'EthR à une concentration de 625 nM et injectés dans l'appareil à un débit de 20 µL/min pendant trois minutes.

1.3 Protocole de criblage de composés sur une puce CM5 fonctionnalisée avec 50 RU d'ADN



L'étude de la fixation de EthR sur l'ADN immobilisé s'effectue de façon comparable à celle décrite précédemment. Pour le criblage, les composés sont dissous à une concentration de 5 µM dans le tampon de liaison, incubés cinq minutes à 37°C en présence d'EthR à une concentration de 540 nM et injectés dans l'appareil à un débit de 20 µL/min pendant 2.25 minutes.

2 Détermination structurale des complexes EthR/composés

2.1 Production et purification de la protéine His₆-EthR

L'ADN codant pour EthR a été amplifié par utilisation des oligonucléotides O-183 : 5'-CATATGACCACCTCCGCGGCCAGT-3' et O-184 : 5'-GGATCCGAGCACCCCGACCGAGT-3'. Le produit de la PCR a été inséré dans le plasmide pCR2.1 Topo (Invitrogen) afin de donner pCR2.1-*ethR*. Les deux brins du fragment codant pour EthR ont été séquencés, puis digérés par *NdeI* et *BamHI* et insérés dans pET-15b (Novagen) pour donner pET-15b-*ethR*. Ce plasmide code pour une protéine EthR possédant une queue amino-terminale de séquence MGSSH₆SSGLVPRGSHM et a été introduit dans *E. coli* C41. *Escherichia coli* C41 (pET-15b-*ethR*) a été cultivée dans 100 mL de milieu LB jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} de 0.6-0.7. De l'isopropylthiogalactoside (IPTG) a ensuite été ajouté à une concentration de 1 mM, et la culture a été laissée en croissance pendant trois heures. Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 12000 g à 4°C, resuspendues dans 10 mL de tampon de lyse (NaH₂PO₄ 50 mM (7.5), NaCl 300 mM, imidazole 10 mM) et lysées par deux passages à la presse de French à 6.2 x 10⁶ Pa. Après centrifugation (20000 g, 25 min,

4°C), le surnageant a été récupéré et l'His₆-EthR fut séparée de l'ensemble du lysat cellulaire par utilisation d'une chromatographie agarose Ni-NTA (Qiagen). Après plusieurs lavages avec du tampon de lyse, l'His₆-EthR a été éluée de la résine par une solution de tampon lyse avec 100 mM d'imidazole, puis dialysée pendant une nuit dans un tampon Tris 10 mM (7.5), NaCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM. 900 µg/mL de protéine purifiée ont été obtenus selon le kit protein assay de Biorad. La pureté de la protéine a été déterminée par utilisation de bleu de Coomassie après un gel SDS-PAGE avec 12% de polyacrylamide.

2.2 Protocole pour la détermination structurale du complexe EthR/BDM_14500

Une solution de ligand dans le DMSO à une concentration de 330 mM est réalisée. Cette solution est diluée au 33ème dans une solution de protéine His₆-EthR à 26 mg/mL dans un tampon Tris (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT. La solution obtenue est laissée sous agitation douce pendant une heure à 20°C, puis centrifugée 20 minutes à 13000 tr/min. Le surnageant est ensuite récupéré et cristallisé en présence de solutions contenant 1.4 à 1.6 M de sulfate d'ammonium, 10 % de glycérol et 0.1 M de tampon Mes (pH 6.5). Les cristaux sont obtenus par utilisation de la technique des gouttes suspendues et apparaissent en quatre à sept jours à 20°C.

2.3 Protocole général pour la détermination structurale des autres complexes EthR/ligand

Une solution de ligand dans le DMSO à une concentration de 33 mM est réalisée. Cette solution est diluée au 33ème dans une solution de protéine His₆-EthR à 26 mg/mL dans un tampon Tris (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT. La solution obtenue est laissée sous agitation douce pendant une heure à 20°C, puis centrifugée 20 minutes à 13000 tr/min. Le surnageant est ensuite récupéré et cristallisé en présence de solutions contenant 1.4 à 1.6 M de sulfate d'ammonium, 10 % de glycérol et 0.1 M de tampon Mes (pH 6.5). Les cristaux sont obtenus par utilisation de la technique des gouttes suspendues et apparaissent en quatre à sept jours à 20°C.

3 Expériences de potentialisation de l'éthionamide *in bacterio*

3.1 Protocole de détermination de la CMI de l'éthionamide seul et en présence de ligand chez *M. bovis*

3.1.1 Test de synergie

Une culture de BCG en milieu Sauton présentant une DO de 0.1 à 600 nm est diluée au dixième. 3 µL des solutions à 1, 0.2 et 0.04 mg/mL d'ETH sont respectivement ajoutés à 3 mL du milieu de culture précédemment obtenu. Une solution de ligand à 20 mM dans le DMSO est réalisée, puis filtrée sur 0.2 µm. 3.75 µL de cette solution sont ajoutés aux différents échantillons de milieu de culture.

3.1.2 Test de stérilité

3.75 µL de la solution de ligand à 20 mM dans le DMSO, ainsi que 3 µL de la solution d'ETH à 1 mg/mL sont ajoutés à 3 mL de milieu de culture dépourvu de BCG.

3.1.3 Détermination de la CMI en ETH

3 µL des solutions à 1, 0.2 et 0.04 mg/mL d'ETH sont respectivement ajoutés à 3 mL de milieu de culture.

3.1.4 Détermination de l'effet solvant

10.5 µL de DMSO sont ajoutés à 3 mL de milieu de culture.

La croissance mycobactérienne est déterminée par mesure de la DO de chacun des échantillons préparés. Le contrôle de croissance est évalué par mesure de la croissance de 3 mL de milieu de culture.

3.2 Protocole de détermination de la CME de l'éthionamide en présence de ligand chez *M. bovis*

Une culture de BCG en milieu Sauton présentant une DO de 0.1 à 600 nm est diluée au dixième. Des solutions de ligand à 20, 15, 10, 5 et 1 mM dans le DMSO sont réalisées. 3 µL de chacune d'entre elles, ainsi que 3.75 µL de la solution à 20 mM sont respectivement ajoutés à 3 mL de milieu de culture. 3 µL d'une solution d'ETH à 0.04 mg/mL sont également ajoutés à l'ensemble des échantillons.

3.2.1 Test de stérilité

3.75 µL de la solution de ligand à 20 mM dans le DMSO, ainsi que 3 µL de la solution d'ETH à 0.04 mg/mL sont ajoutés à 3 mL de milieu de culture dépourvu de BCG.

3.2.2 Test d'activité de l'ETH à 0.04 µg/mL

3 µL de la solution à 0.04 mg/mL d'ETH sont ajoutés à 3 mL de milieu de culture.

3.2.3 Détermination de l'effet solvant

6.75 µL de DMSO sont ajoutés à 3 mL de milieu de culture.

La croissance mycobactérienne est déterminée par mesure de la DO de chacun des échantillons préparés. Le contrôle de croissance est évalué par mesure de la croissance de 3 mL de milieu de culture.

3.3 Protocoles de détermination de la CMI de l'éthionamide seul et en présence de ligand BDM_14500 chez *M. tuberculosis* par méthode Bactec MGIT 960

La souche de *M. tuberculosis* H37Rv est entretenue sur milieu Jensen par repiquage tous les quinze jours. Cette souche est mise en suspension dans une solution d'eau stérile ppi, puis 500 µL de cette suspension sont inoculés dans un tube MGIT supplémenté en OADC. Le tube MGIT est ensuite incubé à 37°C dans l'automate jusqu'à ce qu'il soit détecté positif.

24 heures après la positivité de la souche, le plan de plaque suivant est réalisé :

Référence tube MGIT	1	2	3	4	5
A	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1%	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1% + Ethanol 0.63 %	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100%	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + Ethanol 0.63 %	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM
B	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1%	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1% + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.5µg/mL + Ethanol 0.63 %	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.25µg/mL + Ethanol 0.63 %
C	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1%	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.5µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.25µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.1µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.05µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM
D	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1%	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.025µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.01µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.005µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.0025µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM

Vingt tubes MGIT sont supplémentés avec 800µL d'OADC dans des conditions stériles, puis 100 µL d'une solution aqueuse d'éthionamide à 40 µg/mL sont injectés dans les tubes B4 et C2. 100 µL d'une solution aqueuse d'éthionamide à 20 µg/mL sont ensuite injectés dans les

tubes B5 et C3. Cette opération est réeffectuée pour les tubes C4, C5, D2, D3, D4 et D5 avec des solutions respectives d'éthionamide à 8, 4, 2, 0.8, 0.4 et 0.2 µg/mL. 100 µL d'une solution éthanol / eau stérile ppi 1:1, préalablement filtrée sur filtres Millex 0.45 µm, sont ensuite injectés dans les tubes A2, A4, B4 et B5, puis 100 µL d'une solution 16 mM de composé BDM_14500 dans un mélange éthanol /eau 1:1 sont injectés dans les tubes A5, B2, C2, C3, C4, C5, D2, D3, D4 et D5. 500 µL de la solution contenant la souche *M. tuberculosis H37Rv* sont injectés dans les tubes A3, A4, A5, B4, B5, C2, C3, C4, C5, D2, D3, D4 et D5, puis 100 µL de cette même solution sont ensuite dilués dans 9.9 mL d'eau stérile. 500 µL de cette solution diluée sont injectés dans les tubes A1, A2, B1, B2, C1 et D1. Les tubes sont finalement répartis sur quatre barettes de cinq tubes et installés à 37°C dans l'automate. Les lectures de fluorescence sont effectuées toutes les trois heures.

Une seconde expérience a été réalisée selon le plan de plaque suivant :

Référence tube MGIT	1	2	3	4	5
A	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1% + Ethanol 0.63 %	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 2µg/mL + Ethanol 0.63 %	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 1µg/mL + Ethanol 0.63 %	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.5µg/mL + Ethanol 0.63 %	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.25µg/mL + Ethanol 0.63 %
B	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1% + Ethanol 0.63 %	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.25µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.1µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.05µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.025µg/mL + Ethanol 0.63 % + Composé BDM_14500 200µM

Dix tubes MGIT sont supplémentés avec 800 µL d'OADC dans des conditions stériles, puis 100 µL d'une solution aqueuse d'éthionamide à 160 µg/mL sont injectés dans le tube A2.

Cette opération est réeffectuée pour les tubes A3, A4, B3, B4 et B5 avec des solutions respectives d'éthionamide à 80, 40, 8, 4 et 2 µg/mL et également pour les tubes A5 et B2 avec une solution d'éthionamide à 20 µg/mL. 100 µL d'une solution éthanol / eau stérile ppi 1:1, préalablement filtrée sur filtres Millex 0.45 µm, sont ensuite injectés dans les tubes A1 et B1, puis 100µL d'une solution 16mM de composé BDM_14500 dans un mélange éthanol /eau 1:1 sont injectés dans les tubes B2, B3, B4 et B5. 500 µL de la solution contenant la souche *M. tuberculosis H37Rv* sont injectés dans les tubes A2, A3, A4, A5, B2, B3, B4 et B5, puis 100 µL de cette même solution sont ensuite dilués dans 9.9 mL d'eau stérile. 500 µL de cette solution diluée sont injectés dans les tubes A1 et B1. Les tubes sont finalement répartis sur deux barettes de cinq tubes et installés à 37°C dans l'automate. Les lectures de fluorescence sont effectuées toutes les trois heures.

3.4 Protocoles de détermination de la CMI de l'éthionamide seul et en présence d'analogues du composé BDM_14801 chez *M. tuberculosis* par méthode Bactec MGIT 960

Le protocole et le plan de plaque utilisés sont similaires à ceux décrits lors de la seconde expérience d'évaluation du composé BDM_14500, à l'exception du fait que 0.5 % de DMSO sont utilisés en remplacement de l'éthanol.

3.5 Protocoles de détermination de la CMI de l'éthionamide seul et en présence de ligand BDM_14801 chez *M. tuberculosis* par méthode Bactec 460

La souche de *M. tuberculosis H37Rv* est entretenue sur milieu Jensen par repiquage tous les quinze jours. Cette souche est mise en suspension dans une solution d'eau stérile ppi, puis 500 µL de cette suspension sont inoculés dans un flacon Bactec 12B. Ce flacon est ensuite incubé à 37°C jusqu'à ce qu'il possède un indice de croissance (GI) supérieur ou égal à 300. Quinze flacons Bactec 12B sont utilisés.

<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1% 1	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1% + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 2	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1% + BDM_14801 25 µM + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 3	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% 4	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 5
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + BDM_14801 25 µM + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 6	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 2µg/mL + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 7	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 1µg/mL + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 8	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.5µg/mL + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 9	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.25µg/mL + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 10
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.25µg/mL + BDM_14801 25 µM + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 11	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.1µg/mL + BDM_14801 25 µM + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 12	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.05µg/mL + BDM_14801 25 µM + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 13	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.025µg/mL + BDM_14801 25 µM + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 14	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 100% + ETH 0.01µg/mL + BDM_14801 25 µM + Ethanol 0.5 % DMSO 0.13 % 15

100 µL d'une solution aqueuse d'éthionamide à 80 µg/mL sont injectés dans le flacon 7. Cette opération est réeffectuée pour le flacon 8 avec une solution aqueuse d'éthionamide à 40 µg/mL, pour le flacon 9 avec une solution aqueuse d'éthionamide à 20 µg/mL, pour les flacons 10 et 11 avec une solution aqueuse d'éthionamide à 10 µg/mL, pour le flacon 12 avec une solution aqueuse d'éthionamide à 4 µg/mL, pour le flacon 13 avec une solution aqueuse d'éthionamide à 2 µg/mL, pour le flacon 14 avec une solution aqueuse d'éthionamide à 1 µg/mL, et pour le flacon 15 avec une solution aqueuse d'éthionamide à 0.4 µg/mL.

100µL d'une solution DMSO / éthanol / eau stérile ppi 5:20:75, préalablement filtrée sur filtres Millex 0.45 µm, sont ensuite injectés dans les flacons 2, 5, 7, 8, 9 et 10, puis 100µL d'une solution 1 mM de composé BDM_14801 dans un mélange DMSO/éthanol /eau ppi 5:20:75 sont injectés dans les flacons 3, 6, 11, 12, 13, 14 et 15. 100 µL de la solution contenant la souche *M. tuberculosis H37Rv* sont injectés dans les flacons 4 à 15, puis 100 µL de cette même solution sont ensuite dilués dans 9.9 mL d'eau stérile. 100 µL de cette solution diluée sont injectés dans les flacons 1, 2 et 3. Les flacons sont incubés à 37°C. La mesure du ¹⁴CO₂ est réalisée quotidiennement.

4 Synthèses réalisées

La pureté des produits est contrôlée par LC-MS sur un appareil Varian 1200ws triple quadrupole avec une colonne TSK gel super ODS (C₁₈, 4.6 mm x 5 cm, granulométrie 2µm) et une détection UV à 254 et 215 nm. Les solvants et le gradient utilisés pour l'élution sont :

- Eau / acide formique 0.1 % (éluant A)
- Acétonitrile / eau / acide formique 79.96/19.96/0.08 (éluant B)
- Gradient d'élution : 0 à 100 % d'éluant B en 7.5 minutes, puis plateau de cette même solution pendant 1 minute, gradient d'élution de 0 à 100 % d'éluant A en 0.5 minute et plateau de cette même solution pendant 1 minute.

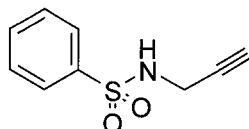
Les spectres RMN ¹H et ¹³C sont réalisés sur un appareil Brüker DRX à 300 MHz. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm et les constantes de couplage J en Hz. Les abréviations suivantes sont utilisées : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet. Les pics sont décrits selon le modèle : δ (nature du massif, J, nombre de protons). Le solvant deutérié utilisé est précisé pour chaque analyse.

Les points de fusion (F) sont mesurés par la méthode des capillaires sur un appareil Büchi B 540. Ils sont exprimés en degrés Celsius (°C).

4.1 Synthèse des alcynes servant à la click chemistry *in situ*

4.1.1 Procédure générale pour la synthèse des composés propargyl-sulfonamide

N-Prop-2-ynyl-benzènesulfonamide



La propargylamine (343 μL , 1 équiv) et la triéthylamine (836 μL , 1.2 équiv) sont solubilisées dans le dichlorométhane (10 mL). Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et le chlorure de benzènesulfonyle (638 μL , 1 équiv) est ajouté par petites fractions. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 45 minutes. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'HCl 1N (deux fois 10 mL), à l'eau (deux fois 10 mL) et à la saumure, puis séchée sur MgSO_4 et évaporée pour donner 861 mg (88 %) d'un solide blanc-beige.

LC-MS: m/z 196 ($\text{M}+\text{H}^+$)

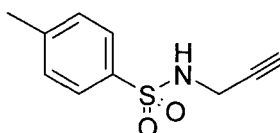
Tr = 4.11 min

^1H NMR (CD_2Cl_2): δ 7.80-7.88 (m, 2H), 7.48-7.62 (m, 3H), 5.00 (s, 1H), 3.81 (dd, 2H, $J = 5.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 2.11 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz)

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): δ 133.9, 129.9, 128.0, 78.8, 73.7, 33.8

F : 49.0-51.0°C

4-Méthyl-N-prop-2-ynyl-benzènesulfonamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de *p*-toluènesulfonyle permet d'obtenir 990 mg (89 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 210 (M+H⁺)

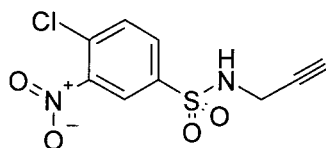
Tr = 4.67 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): δ 7.72 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.30 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 4.81 (s, 1H), 3.77 (dd, 2H, J = 6.0 Hz, J = 2.4 Hz), 2.40 (s, 3H), 2.13 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): δ 144.2, 136.6, 129.8, 127.4, 78.5, 74.1, 33.0, 21.4

F : 68.0-70.0°C

4-Chloro-3-nitro-N-prop-2-ynyl-benzènesulfonamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 4-chloro-3-nitro-benzènesulfonyle permet d'obtenir 487 mg (35 %) d'une poudre jaune.

LC-MS: m/z 273 (M+H⁺)

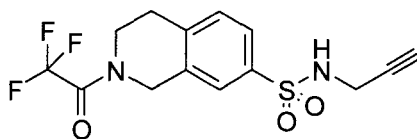
Tr = 5.41 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): δ 8.00 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.2 Hz), 7.73 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 5.10 (s, 1H), 3.92 (dd, 2H, J = 6.0 Hz, J = 2.4 Hz), 2.17 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): δ 133.2, 131.7, 125.0, 78.6, 74.1, 33.1

F : 96.4-97.7°C

2-(2,2,2-Trifluoro-acétyl)-N-(prop-2-ynyl)-1,2,3,4-tétrahydro-isoquinoléine-7-sulfonamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 2-(2,2,2-trifluoro-acétyl)-1,2,3,4-tétrahydro-isoquinoléine-7-sulfonyle permet d'obtenir 1.206 g (70 %) d'une poudre blanche.

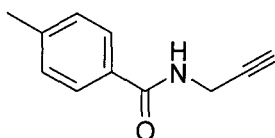
LC-MS: m/z 347 (M+H⁺)

Tr = 5.03 min

^1H NMR (CD_2Cl_2): δ 7.68 (m, 2H), 7.32 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 4.79 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz), 3.82 (m, 4H), 2.99 (m, 2H), 2.14 (dt, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz)
 ^{13}C NMR (CD_2Cl_2): δ 131.0, 126.8, 79.2, 74.0, 47.8, 42.4, 34.0, 29.1
F : 131.9-133.1°C

4.1.2 Procédure générale pour la synthèse des composés propargylamides

4-Méthyl-*N*-prop-2-ynyl-benzamide



La propargylamine (343 μL , 1 équiv) et la triéthylamine (836 μL , 1.2 équiv) sont solubilisées dans le dichlorométhane (10 mL). Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et le 4-Méthylchlorure de benzyle (661 μL , 1 équiv) est ajouté au goutte à goutte. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 45 minutes. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'HCl 1N (deux fois 10 mL), une solution aqueuse de NaHCO_3 5 % (deux fois 10 mL) et à la saumure, puis séchée sur MgSO_4 et évaporée pour donner 710 mg (82 %) d'une poudre beige.

LC-MS: m/z 174 ($\text{M}+\text{H}^+$)

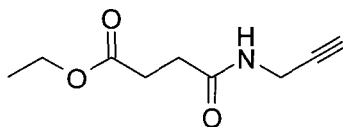
Tr = 3.88 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.70 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.15 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 4.17 (dd, 2H, $J = 5.3$ Hz, $J = 2.5$ Hz), 2.33 (s, 3H), 2.21 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 167.47, 142.10, 130.94, 129.15, 127.26, 79.91, 71.44, 29.64, 21.44

F: 116.7 – 117.6°C

N-Prop-2-ynyl-succinamate d'éthyle



L'utilisation du même protocole avec le 3-Chlorocarbonyl-propionate d'éthyle permet d'obtenir 692 mg (75 %) d'une huile jaune.

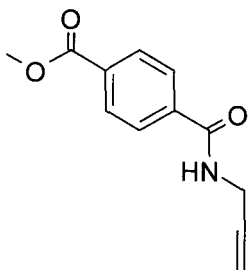
LC-MS: m/z 184 (M+H⁺)

Tr = 2.64 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 6.24 (s, 1H), 4.16 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 4.04 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.69 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.51 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.22 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 1.24 (t, 3H, J=7.2 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 124.5, 60.8, 30.7, 29.4, 29.2, 14.1

N-Prop-2-ynyl-téréphthalamate de méthyle



L'utilisation du même protocole avec le 4-Chlorocarbonylbenzoate de méthyle permet d'obtenir 178 mg (41 %) d'une poudre beige.

LC-MS: m/z 218 (M+H⁺)

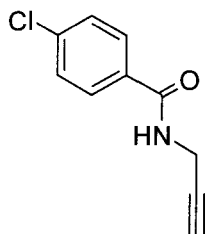
Tr = 3.75 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): δ 8.05 (dm, 2H, J = 8.4 Hz), 7.80 (dm, 2H, J = 8.4 Hz), 6.47 (s, 1H), 4.20 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 3.88 (s, 3H), 2.31 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): δ 130.7, 128.0, 77.8, 72.1, 53.2, 30.4

F: 150.3 – 151.1°C

4-Chloro-N-prop-2-ynyl-benzamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 4-Chloro-benzoyle permet d'obtenir 513 mg (56 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 194 (M+H⁺)

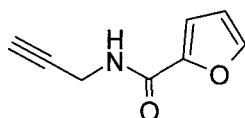
Tr = 4.31 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): δ 7.64 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 6.41 (s, 1H), 4.13 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.24 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): δ 129.0, 128.1, 79.5, 71.0, 29.4

F : 151.6 – 152.7°C

N-prop-2-ynyl-furane-2-carboxamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de Furan-2-carbonyle permet d'obtenir 410 mg (55 %) d'une poudre jaune.

LC-MS: m/z 150 (M+H⁺)

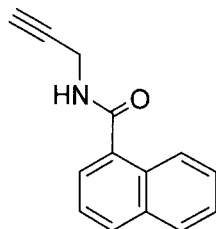
Tr = 2.40 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): δ 7.40 (dd, 1H, J = 3.4 Hz, J = 1.8 Hz), 7.01 (d, 1H, J = 3.3 Hz), 6.54 (s, 1H), 6.44 (dd, 1H, J = 3.6 Hz, J = 1.8 Hz), 4.10 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.24 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): δ 143.0, 113.2, 111.9, 78.5, 70.5, 28.0

F: 88.2 – 89.4°C

N-prop-2-ynyl-naphthalène-1-carboxylique



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de Naphthalène-1-carbonyle permet d'obtenir 567 mg (54 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 210 (M+H⁺)

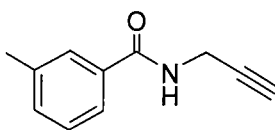
Tr = 4.21 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 8.19 (m, 1H), 7.77-7.88 (m, 2H), 7.35-7.55 (m, 4H), 6.43 (dd, 1H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 6.22 (s, 1H), 4.21 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.26 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 130.9, 128.4, 127.2, 126.5, 125.4, 125.2, 124.8, 124.6, 78.5, 70.5, 29.6

F: 105.2 - 106.3°C

3-Méthyl-N-prop-2-ynyl-benzamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 3-Méthylbenzoyle permet d'obtenir 561 mg (65 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 174 (M+H⁺)

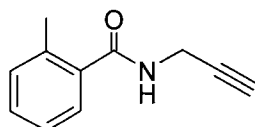
Tr = 3.95 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.57 (m, 1H), 7.49-7.54 (m, 1H), 7.26-7.32 (m, 2H), 6.59 (s, 1H), 4.18 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.35 (s, 3H), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 133.5, 129.2, 128.6, 125.0, 80.8, 72.0, 30.4, 21.9

F: 97.0 – 97.8°C

2-Méthyl-N-prop-2-ynyl-benzamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 2-Méthyl-benzoyle permet d'obtenir 417 mg (48 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 174 (M+H⁺)

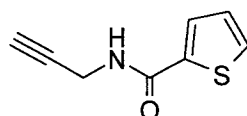
Tr = 3.59 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.12-7.21 (m, 4H), 6.58 (s, 1H), 3.97 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.17 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 124.8, 124.2, 123.9, 123.7, 78.5, 70.5, 29.0

F : 72.8 - 73.3°C

N-prop-2-ynyl-thiophène-2-carboxylique



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de Thiophène-2-carbonyle permet d'obtenir 417 mg (48 %) d'une poudre jaune clair.

LC-MS: m/z 166 (M+H⁺)

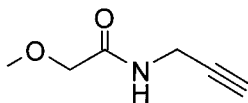
Tr = 3.07 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.51 (s, 1H), 7.49 (m, 1H), 7.07 (dd, 1H, J = 5.4 Hz, J = 3.6 Hz), 6.37 (s, 1H), 4.17 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz),

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 131.3, 129.2, 128.6, 80.6, 72.2, 30.3

F: 107.7 - 109.7°C

2-Méthoxy-N-prop-2-ynyl-acétamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de Méthoxy-acétyle permet d'obtenir 107 mg (17 %) d'une huile jaune clair.

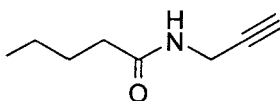
LC-MS: m/z 128 (M+H⁺)

Tr = 1.81 min

¹H NMR (CDCl₃): 6.80 (s, 1H), 4.10 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 3.92 (s, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.26 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃): 169.4, 78.8, 71.7, 71.1, 59.3, 28.5

N-prop-2-ynyl-pentanamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de Pentanoyle permet d'obtenir 479 mg (66 %) d'une poudre jaune clair.

LC-MS: m/z 140 (M+H⁺)

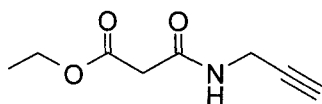
Tr = 3.25 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 6.00 (s, 1H), 3.96 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.22 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.14 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 1.54 (qt, 2H, J = 7.2 Hz), 1.31 (sx, 2H, J = 7.2 Hz), 0.89 (t, 3H, J = 7.2 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 81.2, 71.8, 37.1, 29.7, 28.6, 23.3, 14.5

F: 40.8 - 42.3°C

N-Prop-2-ynyl-malonate d'éthyle



L'utilisation du même protocole avec le Chlorocarbonylacétate d'éthyle permet d'obtenir 503 mg (59 %) d'une huile orangée.

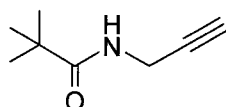
LC-MS: m/z 170 ($M+H^+$)

Tr = 2.48 min

1H NMR ($CDCl_3$): 7.48 (s, 1H), 4.20 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 4.04 (dd, 2H, $J = 5.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 2.79 (s, 2H), 2.51 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.24 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 1.28 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 164.8, 152.7, 61.8, 40.7, 29.2, 14.0

2,2-Diméthyl-N-prop-2-ynyl-propionamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 2,2-Diméthyl-propionyle permet d'obtenir 486 mg (70 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 140 ($M+H^+$)

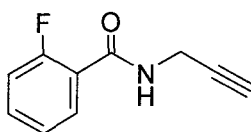
Tr = 2.89 min

1H NMR ($CDCl_3$): 5.90 (s, 1H), 4.04 (dd, 2H, $J = 5.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 2.24 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 1.21 (s, 9H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 178.0, 80.4, 71.8, 29.4, 27.4

F : 67.5-68.3°C

2-Fluoro-N-prop-2-ynyl-benzamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 2-Fluoro-benzoyle permet d'obtenir 432 mg (49 %) d'une huile jaune.

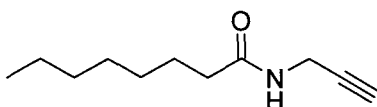
LC-MS: m/z 178 (M+H⁺)

Tr = 3.53 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.93 (td, 1H, J = 7.8 Hz, J = 1.8 Hz), 7.42 (m, 1H), 7.19 (td, 1H, J = 8.4 Hz, J = 0.9 Hz), 7.06 (ddd, 1H, J = 12.0 Hz, J = 8.4 Hz, J = 0.9 Hz), 6.85 (s, 1H), 4.15 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.23 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 134.9, 132.9, 125.8, 117.4, 116.9, 80.6, 72.4, 30.5

N-prop-2-ynyl-octanamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure d'octanoyle permet d'obtenir 488 mg (66 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 182 (M+H⁺)

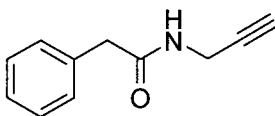
Tr = 5.41 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 5.74 (s, 1H), 3.98 (dd, 2H, J = 6.4 Hz, J = 2.4 Hz), 2.23 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.13 (t, 2H, J = 6.9 Hz), 1.56 (qt, 2H, J = 6.9 Hz), 1.25 (m, 8H), 0.87 (t, 3H, J = 6.9 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 77.5, 71.6, 37.2, 32.6, 30.8, 30.0, 26.4, 23.5, 14.7

F: 71.3 - 72.8°C

2-Phényl-N-prop-2-ynyl-acétamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de Phényl-acétyle permet d'obtenir 704 mg (81 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 174 (M+H⁺)

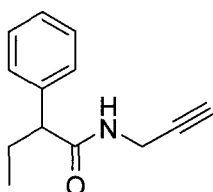
Tr = 3.53 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.21-7.36 (m, 5H), 5.92 (s, 1H), 3.95 (dd, 2H, J = 5.4 Hz, J = 2.7 Hz), 3.51 (s, 2H), 2.21 (t, 1H, J = 2.7 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 130.5, 129.9, 128.3, 125.7, 81.3, 72.4, 44.4, 30.2

F: 76.4-78.1°C

2-Phényl-N-prop-2-ynyl-butyramide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 2-Phényl-butyryle permet d'obtenir 980 mg (97 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 202 (M+H⁺)

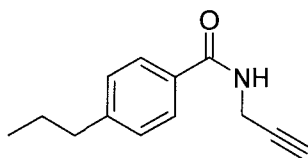
Tr = 4.69 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.21-7.33 (m, 5H), 5.84 (s, 1H), 3.99 (ddd, 1H, J = 17.4 Hz, J = 5.4 Hz, J = 2.7 Hz), 3.88 (ddd, 1H, J = 17.4 Hz, J = 5.4 Hz, J = 2.7 Hz), 3.21 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 2.19 (t, 1H, J = 2.7 Hz), 2.11 (dqt, 1H, J = 16.2 Hz, J = 7.5 Hz), 1.72 (dqt, 1H, J = 16.2 Hz, J = 7.5 Hz), 0.84 (t, 1H, J = 7.5 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 164.4, 129.7, 129.1, 128.3, 81.1, 72.1, 55.3, 30.1, 27.6, 13.1

F: 48.4-50.4°C

4-Propyl-N-prop-2-ynyl-benzamide



L'utilisation du même protocole avec le chlorure de 4-Propyl-benzoyle permet d'obtenir 1 g (99 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 202 ($M+H^+$)

Tr = 5.33 min

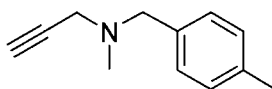
1H NMR (CD_2Cl_2): 7.66 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.22 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 6.52 (s, 1H), 4.18 (dd, 2H, $J = 5.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 2.60 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.28 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 1.61 (sx, 2H, $J = 7.5$ Hz), 0.91 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz)

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 168.1, 148.0, 132.5, 129.8, 128.1, 81.1, 71.8, 38.9, 30.6, 25.5, 14.6

F: 84.2-86.2°C

4.1.3 Procédure générale pour la synthèse des composés propargylamines

Méthyl-(4-méthyl-benzyl)-prop-2-ynyl-amine



La propargylamine (169 μ L, 1 équiv) et le 4-Méthyl-benzaldéhyde (836 μ L, 1.2 équiv) sont mélangés dans le dichlorométhane (3 mL), puis le triacétoxy-borohydrure de sodium (848 mg, 2 équiv) est ajouté. Le milieu réactionnel est mis sous atmosphère inerte, puis est laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure. Du dichlorométhane (20 mL) est ajouté au milieu et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse de $NaHCO_3$ 5 % (deux fois 20 mL) et à la saumure (une fois 20 mL). Le milieu est ensuite acidifié par ajout d'une solution aqueuse d' HCl 1N (20 mL). La phase aqueuse est récupérée, basifiée par ajout d'une solution aqueuse de soude 1N (30 mL) et extraite par ajout d'acétate d'éthyle (deux fois 20

mL). La phase organique est lavée à la saumure, puis séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner 313 mg (90 %) d'une huile orange.

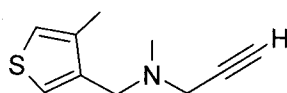
LC-MS: m/z 174 (M+H⁺)

Tr = 2.47 min

¹H NMR (CDCl₃): 7.13-7.27 (m, 4H), 3.55 (s, 2H), 3.30 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.35 (s, 3H), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃): 136.9, 135.4, 129.3, 129.1, 78.3, 73.4, 59.8, 44.8, 41.9, 21.3

Méthyl-(4-méthyl-thiophène-3-ylméthyl)-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 4-Méthyl-thiophène-3-carbaldéhyde permet d'obtenir 134 mg (37 %) d'une huile jaune.

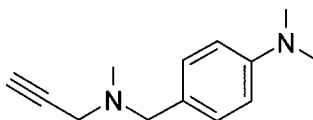
LC-MS: m/z 180 (M+H⁺)

Tr = 2.09 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.10 (d, 1H, J = 5.1 Hz), 6.76 (d, 1H, J = 5.1 Hz), 3.64 (s, 2H), 3.30 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.31 (s, 3H), 2.27 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.18 (s, 3H)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 130.9, 124.4, 74.9, 74.1, 53.5, 45.9, 42.4, 15.1

Diméthyl-{4-[(méthyl-prop-2-ynyl-amino)-méthyl]-phényl}-amine



L'utilisation du même protocole avec le 4-Diméthylamino-benzaldéhyde permet d'obtenir 271 mg (67 %) d'une huile orange.

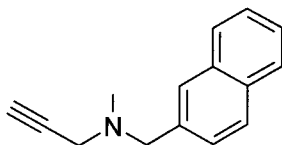
LC-MS: m/z 203 (M+H⁺)

Tr = 2.13 min

^1H NMR (CDCl_3): 7.12-7.21 (m, 2H), 6.63-6.69 (m, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.25 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.89 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.22 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz)

^{13}C NMR (CDCl_3): 130.3, 112.6, 73.3, 59.5, 44.6, 41.8, 40.9

Méthyl-naphthalèn-2-ylméthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le Naphthalène-2-carbaldéhyde permet d'obtenir 149 mg (36 %) d'une huile orange.

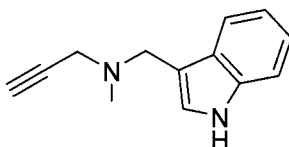
LC-MS: m/z 210 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 3.03 min

^1H NMR (CDCl_3): 7.70-7.86 (m, 4H), 7.40-7.51 (m, 3H), 3.73 (s, 2H), 3.34 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.38 (s, 3H), 2.29 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz)

^{13}C NMR (CDCl_3): 136.0, 133.3, 132.8, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 125.9, 125.7, 78.5, 73.7, 60.1, 45.0, 41.8

(1H-Indol-3-ylméthyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



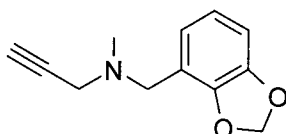
L'utilisation du même protocole avec le 1H-Indole-3-carbaldéhyde permet d'obtenir 322 mg (67 %) d'une poudre orange.

LC-MS: m/z 241 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 2.55 min

^1H NMR (CD_2Cl_2): 8.30 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.34 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.03-7.17 (m, 3H), 3.73 (s, 2H), 3.28 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.33 (s, 3H), 2.30 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz)
 ^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 124.0, 122.1, 119.5, 119.4, 110.2, 80.8, 74.2, 50.8, 44.7, 41.6
F: 87.8-89.4°C

Benzo[1,3]dioxol-4-ylmethyl-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le Benzo[1,3]dioxole-4-carbaldéhyde permet d'obtenir 381 mg (94 %) d'une huile orange.

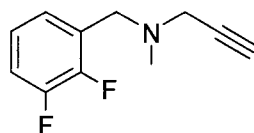
LC-MS: m/z 204 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 2.07 min

^1H NMR (CD_2Cl_2): 6.69-6.82 (m, 3H), 5.92 (s, 2H), 3.51 (s, 2H), 3.28 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.23 (m, 4H)

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 124.1, 122.2, 108.3, 101.8, 54.0, 46.0, 42.3

(2,3-Difluoro-benzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 2,3-Difluoro-benzaldéhyde permet d'obtenir 390 mg (80 %) d'une huile orange.

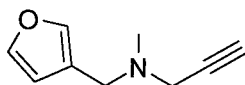
LC-MS: m/z 196 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 2.10 min

^1H NMR (CD_2Cl_2): 6.99-7.17 (m, 3H), 3.61 (d, 2H, $J = 1.2$ Hz), 3.29 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.30 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 2.29 (s, 3H),

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 126.2, 123.8, 116.0 (d, $J = 17.1$ Hz), 52.5, 45.3, 41.5

Furan-3-ylmethyl-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le Furan-3-carbaldéhyde permet d'obtenir 224 mg (75 %) d'une huile orange.

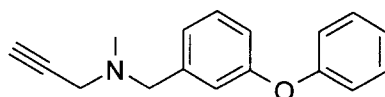
LC-MS: m/z 150 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 1.53 min

^1H NMR (CD_2Cl_2): 7.36 (m, 1H), 7.32 (m, 1H), 6.36 (m, 1H), 3.38 (s, 2H), 3.25 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.24 (m, 4H)

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 144.2, 142.5, 112.3, 50.9, 45.7, 42.4

Méthyl-(3-phénoxy-benzyl)-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 3-Phénoxy-benzaldéhyde permet d'obtenir 131 mg (26 %) d'une huile orange.

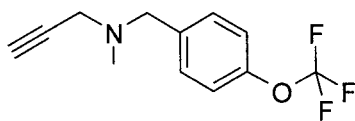
LC-MS: m/z 252 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 3.72 min

^1H NMR (CD_2Cl_2): 6.78-7.28 (m, 9H), 3.44 (s, 2H), 3.20 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.20 (s, 3H), 2.19 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz)

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 129.9, 129.6, 124.1, 123.3, 119.5, 118.9, 117.7, 59.7, 45.0, 41.6

Méthyl-prop-2-ynyl-(4-trifluorométhoxy-benzyl)-amine



L'utilisation du même protocole avec le 4-Trifluorométhoxy-benzaldéhyde permet d'obtenir 310 mg (80 %) d'une huile orange.

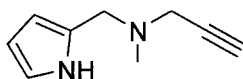
LC-MS: m/z 196 (M+H⁺)

Tr = 2.10 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.33-7.38 (m, 2H), 7.12-7.17 (m, 2H), 3.53 (s, 2H), 3.25 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.29 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.27 (s, 3H)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 130.5, 120.9, 59.1, 45.0, 41.5

Méthyl-prop-2-ynyl-(1H-pyrrol-2-ylméthyl)-amine



L'utilisation du même protocole avec le 1H-Pyrrole-2-carbaldéhyde permet d'obtenir 256 mg (86 %) d'une huile marron.

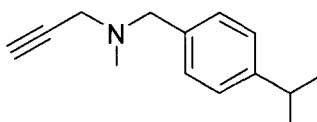
LC-MS: m/z 149 (M+H⁺)

Tr = 8.80 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 6.68 (m, 1H), 6.03 (m, 1H), 5.99 (m, 1H), 3.52 (s, 2H), 3.22 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.26 (s, 3H)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 118.6, 108.8, 108.7, 79.9, 74.4, 53.6, 45.7, 42.3

(4-Isopropylbenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 4-Isopropyl-benzaldéhyde permet d'obtenir 126 mg (32 %) d'une huile jaune.

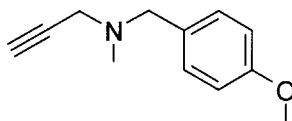
LC-MS: m/z 202 (M+H⁺)

Tr = 2.95 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.17-7.23 (m, 4H), 3.48 (s, 2H), 3.24 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.90 (h, 1H, J = 6.9 Hz), 2.26-2.29 (m, 4H), 1.22 (s, 3H), 1.19 (s, 3H)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 129.1, 126.3, 59.8, 44.9, 41.6, 33.9, 23.0

(4-Méthoxybenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 4-Méthoxy-benzaldéhyde permet d'obtenir 339 mg (90 %) d'une huile jaune.

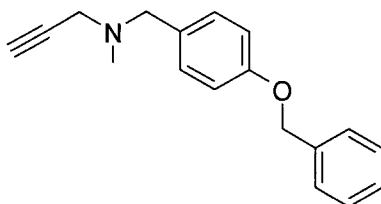
LC-MS: m/z 190 (M+H⁺)

Tr = 1.96 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.18-7.23 (m, 2H), 6.79-6.85 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.46 (s, 2H), 3.22 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.24 (s, 3H)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 130.8, 130.3, 113.7, 78.9, 73.0, 59.4, 55.3, 44.8, 41.5

(4-Benzyloxybenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 4-Benzyloxy-benzaldéhyde permet d'obtenir 152 mg (28 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 266 (M+H⁺)

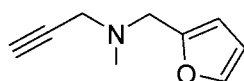
Tr = 3.87 min

¹H NMR (CDCl₃): 7.27-7.45 (m, 7H), 6.96 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.32 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.30 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃): 158.2, 130.5, 130.4, 128.6, 128.0, 127.5, 114.7, 73.5, 70.0, 59.2, 44.5, 41.6

F : 41.5-42.7°C

Furan-2-ylméthyl-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le Furane-2-carbaldéhyde permet d'obtenir 255 mg (85 %) d'une huile orange.

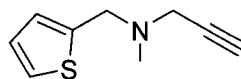
LC-MS: m/z 150 (M+H⁺)

Tr = 1.78 min

¹H NMR (CDCl₃): 7.32 (m, 1H), 6.17-6.27 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.30 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.28 (s, 3H), 2.18 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃): 180.2, 157.1, 142.5, 110.2, 108.9, 78.6, 74.4, 51.9, 44.9, 41.5

Méthyl-prop-2-ynyl-thiophèn-2-ylméthyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le Thiophène-2-carbaldéhyde permet d'obtenir 280 mg (85 %) d'une huile jaune.

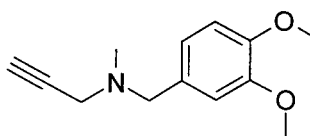
LC-MS: m/z 166 (M+H⁺)

Tr = 1.66 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.18-7.21 (m, 1H), 6.87-6.93 (m, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.30 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.32 (s, 3H), 2.22 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 126.6, 126.5, 125.5, 78.3, 73.4, 55.3, 54.3, 44.7, 41.7

(3,4-Diméthoxybenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 3,4-Diméthoxy-benzaldéhyde permet d'obtenir 420 mg (96 %) d'une huile jaune.

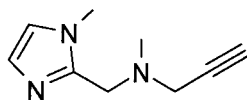
LC-MS: m/z 220 (M+H⁺)

Tr = 2.19 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 6.79-6.90 (m, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 3.30 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.34 (s, 3H), 2.27 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 196.4, 166.4, 148.9, 144.4, 130.9, 121.3, 112.1, 110.7, 78.3, 73.4, 59.7, 56.9, 44.7, 41.7

Méthyl-(1-méthyl-1*H*-imidazol-2-ylméthyl)-prop-2-ynyl-amine



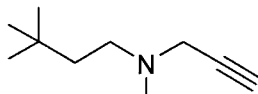
L'utilisation du même protocole avec le 1-Méthyl-1*H*-imidazole-2-carbaldéhyde permet d'obtenir 161 mg (49 %) d'une poudre orange.

LC-MS: m/z 164 (M+H⁺)

Tr = 1.67 min

^1H NMR (CDCl_3): 6.77 (d, $J = 1.23$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J = 1.23$ Hz, 1H), 3.54 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 3.15 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.16 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 2.14 (s, 3H)
 ^{13}C NMR (CDCl_3): 144.8, 127.0, 121.5, 73.4, 51.8, 45.3, 41.5, 32.8
F : 73.3-75.1°C

(3,3-Diméthyl-butyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 3,3-Diméthyl-butyraldéhyde permet d'obtenir 227 mg (74 %) d'une huile jaune.

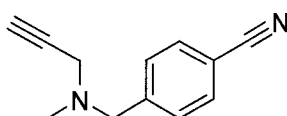
LC-MS: m/z 154 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 2.30 min

^1H NMR (CDCl_3): 3.27 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.35 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.14 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 1.28 (m, 2H), 0.84 (s, 3H)

^{13}C NMR (CDCl_3): 78.3, 73.4, 51.9, 45.7, 42.1, 41.4, 29.6

4-[(Méthyl-prop-2-ynyl-amino)-méthyl]-benzonitrile



L'utilisation du même protocole avec le 3,3-Diméthyl-butyraldéhyde permet d'obtenir 336 mg (91 %) d'une huile orange.

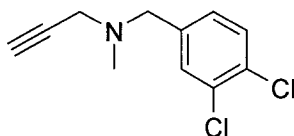
LC-MS: m/z 185 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 1.86 min

^1H NMR (CD_2Cl_2): 7.57-7.61 (m, 2H), 7.42-7.46 (m, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.26 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.28 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 2.27 (s, 3H)

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 132.3, 129.6, 124.6, 119.0, 59.5, 45.3, 41.6

(3,4-Dichlorobenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 3,4-Dichloro-benzaldéhyde permet d'obtenir 202 mg (44 %) d'une huile orange.

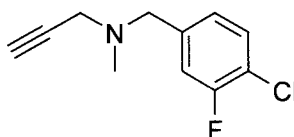
LC-MS: m/z 228 (M+H⁺)

Tr = 3.24 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.43 (sd, 1H, J = 2.1 Hz), 7.37 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.17 (dd, 1H, J = 2.1 Hz, J = 8.4 Hz), 3.48 (s, 2H), 3.26 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.23 (s, 3H)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 131.9, 131.3, 129.5, 76.8, 71.6, 59.8, 46.1, 42.5

(4-Chloro-3-fluorobenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 4-Chloro-3-fluorobenzaldéhyde permet d'obtenir 282 mg (67 %) d'une huile orange.

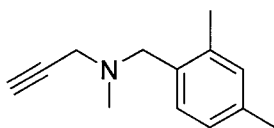
LC-MS: m/z 212 (M+H⁺)

Tr = 2.65 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.31 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 7.14 (dd, 1H, J = 10.2 Hz, J = 1.9 Hz), 7.05 (dm, 1H, J = 8.1 Hz), 3.50 (s, 2H), 3.26 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.26 (s, 3H)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 130.3, 125.4, 117.0 (d, J=20.4 Hz), 58.9, 45.1, 41.5

(2,4-Diméthylbenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 2,4-Diméthyl-benzaldéhyde permet d'obtenir 209 mg (56 %) d'une huile jaune.

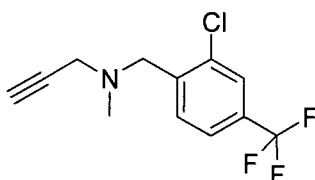
LC-MS: m/z 188 (M+H⁺)

Tr = 2.55 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.20 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 6.99-7.05 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.33 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.39 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 137.6, 136.9, 133.6, 131.3, 130.2, 126.4, 79.0, 73.4, 57.6, 45.0, 41.8, 21.2, 19.2

(2-Chloro-4-trifluorométhyl-benzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 2-Chloro-4-trifluorométhyl-benzaldéhyde permet d'obtenir 346 mg (66 %) d'une huile orange.

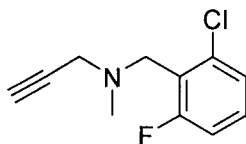
LC-MS: m/z 262 (M+H⁺)

Tr = 4.13 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.68 (m, 1H), 7.30-7.40 (m, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.31 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.29 (s, 3H), 2.22 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 137.5, 130.1, 127.6, 125.2, 79.1, 73.8, 56.6, 45.7, 41.8

(2-Chloro-6-fluorobenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole avec le 2-Chloro-6-fluorobenzaldéhyde permet d'obtenir 366 mg (86 %) d'une huile orange.

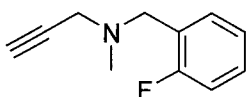
LC-MS: m/z 212 ($M+H^+$)

Tr = 2.33 min

1H NMR ($CDCl_3$): 7.16-7.21 (m, 2H), 6.94-7.04 (m, 1H), 3.73 (d, 2H, $J = 2.1$ Hz), 3.44 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.37 (s, 3H), 2.27 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 129.3 (d, $J = 9.7$ Hz), 124.7, 114.1 (d, $J = 22.9$ Hz), 78.3, 73.4, 55.3, 50.3, 46.1, 41.3

(2-Fluorobenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole et de 2-Fluorobenzaldéhyde permet d'obtenir 324 mg (92 %) d'une huile jaune.

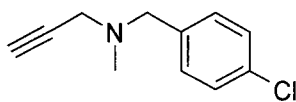
LC-MS: m/z 178 ($M+H^+$)

Tr = 1.81 min

1H NMR (CD_2Cl_2): 7.36 (m, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.09 (td, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 7.00 (td, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 3.58 (s, 2H), 3.28 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.28 (m, 4H)

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 131.3, 129.0 (d, $J = 8.4$ Hz), 124.0, 115.2 (d, $J = 22.2$ Hz), 77.8, 72.7, 52.8, 45.2, 41.4

(4-Chlorobenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole et de 4-Chlorobenzaldéhyde permet d'obtenir 302 mg (78 %) d'une huile orange.

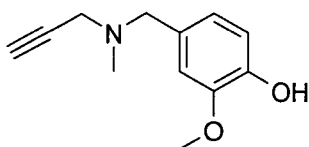
LC-MS: m/z 194 (M+H⁺)

Tr = 2.40 min

¹H NMR (CDCl₃): 7.21 (m, 4H), 3.46 (s, 2H), 3.21 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.25 (s, 3H), 2.21 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃): 137.1, 133.1, 130.6, 128.6, 78.5, 73.4, 59.3, 45.0, 41.8

2-Méthoxy-4-[(méthyl-prop-2-ynyl-amino)-méthyl]-phénol



L'utilisation du même protocole et de 4-Hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde permet d'obtenir 331 mg (81 %) d'une poudre jaune.

LC-MS: m/z 206 (M+H⁺)

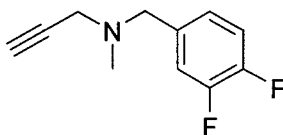
Tr = 0.73 min

¹H NMR (CDCl₃): 6.72-6.83 (m, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 3.25 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.28 (s, 3H), 2.22 (t, 1H, J = 2.4 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃): 122.3, 114.1, 110.7, 77.9, 74.0, 60.0, 56.0, 44.7, 41.8

F : 106.2-108-2°C

(3,4-Difluorobenzyl)-méthyl-prop-2-ynyl-amine



L'utilisation du même protocole et de 3,4-Difluorobenzaldéhyde permet d'obtenir 314 mg (80 %) d'une huile orange.

LC-MS: m/z 196 (M+H⁺)

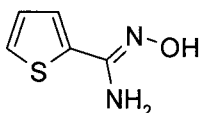
Tr = 2.14 min

¹H NMR (CD₂Cl₂): 7.00-7.21 (m, 3H), 3.48 (s, 2H), 3.25 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 2.28 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.23 (s, 3H)

¹³C NMR (CD₂Cl₂): 124.3, 117.0 (d, J = 17.0 Hz), 116.2 (d, J = 16.9 Hz), 77.8, 72.7, 58.3, 44.4, 40.9

4.2 Synthèse des composés BDM_14500 et BDM_14801

Synthèse de la N-Hydroxy-thiophène-2-carboxamidine



Le 2-thiophénecarbonitrile (5 g, 1 équiv), le chlorhydrate d'hydroxylamine (4.77 g, 1.5 équiv) et la diisopropyléthylamine (12.5 mL, 1.6 équiv) sont mélangés dans l'éthanol absolu (75 mL). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 12 heures, puis le solvant est évaporé et le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (200 mL). La phase organique est alors lavée à l'eau distillée (trois fois 100mL) et une solution de saumure (100 mL), séchée sur MgSO₄ et évaporée pour obtenir 6.44 g (99 %) de l'intermédiaire N-Hydroxy-thiophène-2-carboxamidine, sous la forme d'une poudre brune.

LC-MS: m/z 143 (M+H⁺)

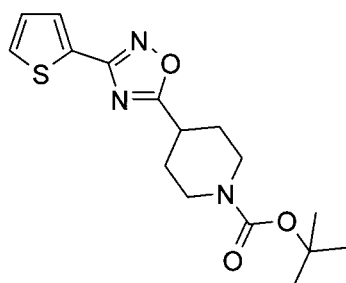
Tr = 1.08 min

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9.61 (s, 1H), 7.46 (dd, $J = 3.6$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.03 (dd, $J = 3.6$ Hz $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.93 (s, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): 127.4, 126.9, 125.1

F: 89.5-91.5°C

Synthèse du composé BDM_14500 : 4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle



L'acide 1-Boc-pipéridine-4-carboxylique (4.59 g, 1 équivalent), l'hydroxybenzotriazole (613 mg, 0.2 équivalent), l'HBOTU (7.59 g, 1 équivalent) et la diisopropyléthylamine (17.1 mL, 5 équivalent) sont solubilisés dans le diméthylformamide (50 mL). La solution obtenue est laissée sous agitation 5 minutes à température ambiante. Une solution de *N*-Hydroxy-thiophène-2-carboxamide (1 équivalent), préalablement dissous dans du diméthylformamide (50 mL), est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant deux heures. 1 L d'eau est alors ajouté au milieu réactionnel, qui est ensuite filtré pour donner une poudre blanche. Ce solide est redissous dans le diméthylformamide (100 mL) et du tamis moléculaire 3 Å (2 g) est ajouté. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 24 heures. Le milieu est évaporé et le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (200 mL). La phase organique est alors lavée avec une solution de NaCl saturée (100 mL), une solution aqueuse de NaOH 1N (trois fois 100 mL), une solution aqueuse d'HCl 1N (trois fois 100 mL) et à nouveau une solution de NaCl saturée (100 mL), puis séchée sur MgSO_4 et évaporée pour donner 5.653 g (84 %) d'un solide beige.

LC-MS: m/z 358 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

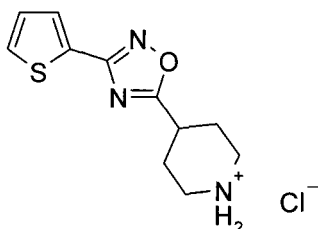
Tr = 6.93 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.70 (dd, $J = 3.6$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 3.6$ Hz $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.05 (m, 2H), 3.07 (m, 1H), 2.90 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.40 (s, 9H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 181.23, 164.23, 154.51, 129.46, 129.2, 128.32, 127.9, 79.72, 42.84, 34.38, 29.05, 28.38

F: 74.0-74.9°C

Chlorhydrate de 4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridine



Le composé BDM_14500 (5 g, 1 équivalent) est dissous dans l'éthanol absolu (25 mL) et une solution d'HCl 4N dans le dioxane est ajoutée (11.2 mL, 3 équivalent). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 5 heures, puis filtré pour donner 3.63 g (91 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 236 ($\text{M}+\text{H}^+$)

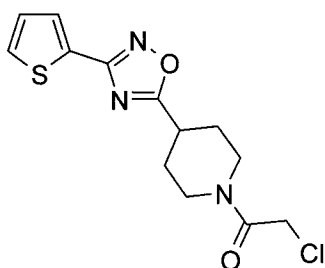
Tr = 2.85 min

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 9.42 (m, 2H), 7.88 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.79 (dd, $J = 3.6$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 3.6$ Hz, 1H), 3.5 (m, 1H), 3.31 (m, 2H), 3.05 (m, 2H), 2.24 (m, 2H), 2.05 (m, 2H)

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 181.36, 164.09, 131.26, 130.39, 129.03, 127.81, 42.31, 31.68, 25.91

F: 255.1-257.1°C

2-Chloro-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone



Le Chlorhydrate de 4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridinium (1.5 g, 1 équivalent) et la diisopropyléthylamine (2.83 mL, 3 équivalent) sont dissous dans du dichlorométhane préalablement séché sur MgSO₄ (25 mL). Le chlorure de chloroacétyle (878 µL, 2 équivalent) est ensuite ajouté au goutte à goutte. Après 15 minutes, de l'acétate d'éthyle est ajouté (25 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse d'HCl 1M (deux fois 25 mL) et par une solution de saumure (25 mL), puis séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (55:45 cyclohexane/acétate d'éthyle) pour donner 1.14 g (66 %) d'une huile brune.

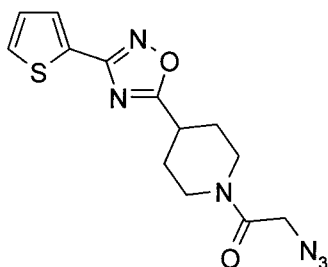
LC-MS: m/z 312 (M+H⁺)

Tr = 5.2 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.77 (dd, J = 3.5 Hz J = 1.1 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.1 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.5 Hz, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.1 (s, 2H), 3.93 (m, 1H), 3.27 (m, 2H), 3.06 (m, 1H), 2.20 (m, 2H), 2.00 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.71, 165.26, 164.55, 129.82, 129.57, 128.30, 128.17, 45.57, 41.45, 41.15, 34.16, 29.53, 28.84

Synthèse du composé BDM 14801: 2-Azido-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone



Le 2-Chloro-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (1.14 g, 1 équivalent) et de l'azoture de sodium (357 mg, 1.5 équivalent) sont solubilisés dans du diméthylformamide (15 mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 4 heures, puis évaporé. Le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (30 mL). La phase organique est lavée par une solution saturée en NaCl (30 mL), de l'eau (trois fois, 30 mL) et à nouveau une solution saturée en NaCl (30 mL), puis séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner 1.051 g (90 %) d'une poudre brune.

LC-MS: m/z 319 (M+H⁺)

Tr = 5.2 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.76 (dd, J = 3.6 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.13 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.6 Hz, 1H), 4.43 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.72 (m, 1H), 3.25 (m, 2H), 3.04 (m, 1H), 2.18 (m, 2H), 1.94 (m, 2H)

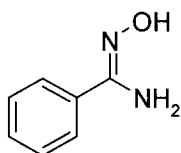
¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.48, 165.58, 164.39, 129.68, 129.42, 128.12, 128.03, 50.77, 44.16, 41, 17, 33.99, 29.68, 28.74

F: 71.3-72.7°C

4.3 Synthèse des analogues du composé BDM_14801

4.3.1 Procédure générale pour la synthèse des composés *N*-Hydroxy-benzamidine

N-Hydroxy-benzamidine



Le benzonitrile (17.2 g, 1 équiv), le chlorhydrate d'hydroxylamine (17.4 g, 1.5 équiv) et la diisopropyléthylamine (46.5 mL, 1.6 équiv) sont mélangés dans l'éthanol absolu (100 mL). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 12 heures. Le solvant est évaporé et le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (250 mL). La phase organique est lavée à l'eau distillée (trois fois 100mL), puis avec une solution de saumure (100 mL), séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner 13.8 g (61 %) d'une poudre beige.

LC-MS: m/z 122 (M-14)

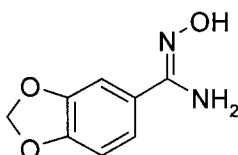
Tr = 3.43 min

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 9.66 (s, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.35 (m, 3H), 5.82 (s, 2H)

¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 151.65, 133.77, 129.50, 128.65, 125.96

F: 60.0-61.5°C

N-Hydroxy-benzo[1,3]dioxole-5-carboxamidine



L'utilisation de Benzo[1,3]dioxole-5-carbonitrile permet d'obtenir 9 g (99 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 186 (M+H⁺)

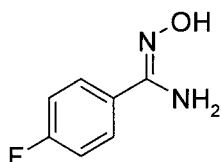
Tr = 2.70 min

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 9.53 (s, 1H), 7.18 (m, 2H), 6.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.03 (s, 2H), 5.73 (s, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6): δ 151.18, 148.31, 147.60, 127.81, 119.82, 108.29, 106.24, 101.64

F: 155.7-157.4°C

4-Fluoro-*N*-hydroxy-benzamidine



L'utilisation de 4-Fluoro-benzonitrile permet d'obtenir 12.31 g (49 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 155 ($M+H^+$)

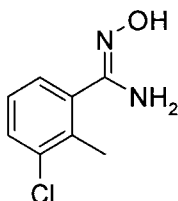
Tr = 1.79 min

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 9.65 (s, 1H), 7.68 (dd, $J = 8.7$ Hz $J = 5.2$ Hz, 2H), 7.20 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 5.84 (s, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6): δ 163.05 (d, $J = 244.4$ Hz), 150.81, 130.20, 128.06 (d, $J = 8.1$ Hz), 115.40 (d, $J = 21.4$ Hz)

F: 97.6-99.3°C

3-Chloro-*N*-hydroxy-2-méthyl-benzamidine



L'utilisation de 3-Chloro-2-méthyl-benzonitrile permet d'obtenir 7.31 g (60 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 184 ($M-14$)

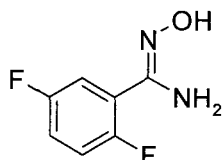
Tr = 4.61 min

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9.43 (s, 1H), 7.45 (m, 1H), 7.24 (m, 2H), 5.85 (s, 2H), 2.35 (s, 3H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 170.69, 140.41, 134.60, 132.92, 130.02, 127.58, 126.13, 17.19

F: 167.9-169.7°C

2,5-Difluoro-N-hydroxy-benzamidine



L'utilisation de 2,5-Difluoro-benzonitrile permet d'obtenir 7.25 g (59 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 173 ($\text{M}+\text{H}^+$)

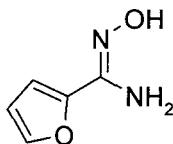
Tr = 1.67 min

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9.79 (s, 1H), 7.31 (m, 3H), 5.89 (s, 2H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 158.17 (d, J = 238.5 Hz), 156.26 (d, J = 244.0 Hz), 148.2, 123.33 (dd, J = 14.7 Hz, J = 8.3 Hz), 118.00 (dd, J = 25.2 Hz, J = 8.3 Hz), 117.48 (dd, J = 23.9 Hz, J = 8.4 Hz), 116.26 (d, J = 24.8 Hz)

F: 91.2-93.2°C

N-Hydroxy-furane-2-carboxamidine



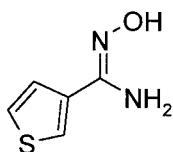
L'utilisation de Furane-2-carbonitrile permet d'obtenir 105 mg (83 %) d'une huile jaune.

LC-MS: m/z 127 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 0.79 min

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 10.02 (s, 1H), 7.71 (d, $J = 1.4$ Hz 1H), 6.89 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.53 (dd, $J = 3.3$ Hz $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.11 (s, 2H)
 ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 146.59, 145.51, 111.75, 109.48

N-Hydroxy-thiophène-3-carboxamide



L'utilisation de Thiophèn-3-carbonitrile permet d'obtenir 112 mg (79 %) d'une huile jaune.

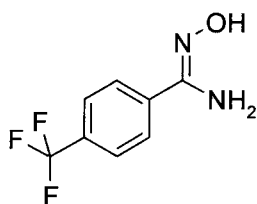
LC-MS: m/z 143 ($M+H^+$)

Tr = 0.81 min

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9.46 (s, 1H), 7.79 (dd, $J = 2.9$ Hz $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 1.3$ Hz, 1H), 5.76 (s, 2H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 148.41, 135.80, 126.46, 125.73, 122.76

N-Hydroxy-4-trifluorométhyl-benzamide



L'utilisation de 4-Trifluorométhyl-benzonitrile permet d'obtenir 10.17 g (85 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 205 ($M+H^+$)

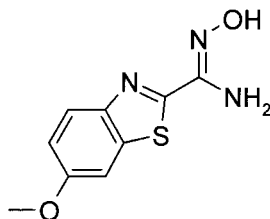
Tr = 3.72 min

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9.94 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 8.1$, 2H), 7.73 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.99 (s, 2H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 150.44, 137.66, 129.71 (q, $J = 32.0$ Hz), 126.53, 125.36, 122.76

F: 133.2-135.0°C

N-Hydroxy-6-méthoxy-benzothiazole-2-carboxamide



L'utilisation de 6-Méthoxy-benzothiazol-2-carbonitrile permet d'obtenir 522 mg (94 %) d'une poudre rose.

LC-MS: m/z 224 (M+H⁺)

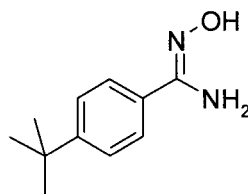
Tr = 4.12 min

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 10.39 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.9, 1H), 7.63 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 8.9 Hz J = 2.6 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H)

¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 159.98, 158.40, 147.74, 147.15, 136.30, 123.81, 116.08, 105.21, 56.18

F: 204.4-205.9°C

4-tert-Butyl-N-hydroxy-benzamide



L'utilisation de 4-tert-Butyl-benzonitrile permet d'obtenir 11.7 g (87 %) d'une poudre rouge.

LC-MS: m/z 193 (M+H⁺)

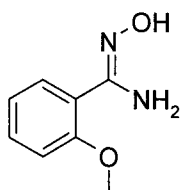
Tr = 4.53 min

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 9.52 (s, 1H), 7.56 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.73 (s, 2H), 1.26 (s, 9H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 151.81, 151.33, 131.10, 125.69, 125.27, 34.77, 31.51

F: 145.1-147.1°C

N-Hydroxy-2-méthoxy-benzamidine



L'utilisation de 2-Méthoxy-benzonitrile permet d'obtenir 14.78 g (99 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 167 (M+H⁺)

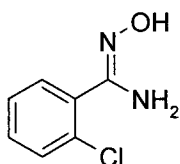
Tr = 2.75 min

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9.57 (s, 1H), 7.47 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.03 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.95 (m, 1H), 5.68 (s, 2H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 157.55, 151.42, 130.74, 129.97, 122.92, 120.67, 112.19

F: 90.5-100.0°C

2-Chloro-N-hydroxy-benzamidine



L'utilisation de 2-Chloro-benzonitrile permet d'obtenir 11.96 g (64 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 156 (M-14)

Tr = 3.56 min

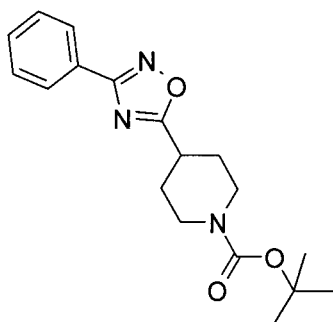
^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9.49 (s, 1H), 7.41 (m, 4H), 5.86 (s, 2H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 168.65, 137.61, 131.02, 130.10, 130.06, 129.12, 127.47

F : 135.2-137.1°C

4.3.2 Procédure générale pour la synthèse des composés 4-([1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle

4-(3-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (1i)



L'acide 1-Boc-pipéridine-4-carboxylique (458 mg, 1 équiv), l'HBTU (758 mg, 1 équiv) et la diisopropyléthylamine (2.2 équiv) sont solubilisés dans le diméthylformamide (20 mL). La solution est laissée sous agitation 5 minutes à température ambiante. La *N*-Hydroxybenzamidine (1 équiv) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité pendant une heure à température ambiante, puis porté à reflux pendant 24 heures. Le solvant est évaporé et le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (30 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse de NaHCO₃ à 5% (trois fois 20 mL), puis par une solution aqueuse de KHSO₄ 0.1N (trois fois 20 mL) et une solution de saumure (deux fois 20 mL), séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie flash sur silice (97:3 cyclohexane / acétate d'éthyle) pour obtenir 170 mg (26 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 274 (M-56+H⁺)

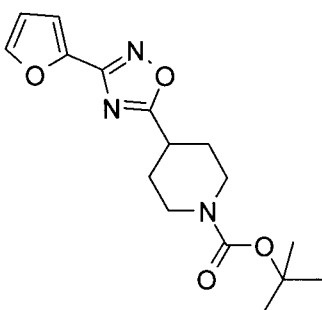
Tr = 7.33 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.07 (m, 2H), 7.48 (m, 3H), 6.82 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.13 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 3.00 (m, 2H), 2.12 (m, 2H), 1.90 (m, 2H), 1.48 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 182.29, 169.24, 155.61, 132.15, 129.83, 128.40, 125.00, 80.82, 39.17, 30.17, 29.41

F: 99.4 - 100.1°C

4-(3-furan-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (2i)



L'utilisation de la *N*-Hydroxy-furan-2-carboxamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (95:5 cyclohexane / acétate d'éthyle), 134 mg (50 %) d'une poudre blanche.

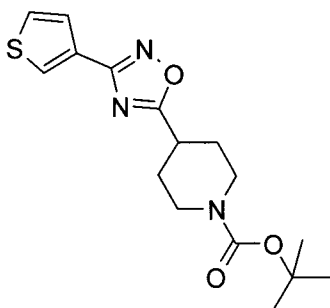
LC-MS: m/z 342 ($M+Na^+$)

Tr = 6.39 min

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.62 (dd, $J = 1.8$ Hz $J = 0.7$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J = 3.5$ Hz $J = 0.7$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 3.5$ Hz $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.92 (m, 2H), 2.12 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.49 (s, 9H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 181.38, 161.18, 154.56, 145.15, 142.22, 113.65, 111.80, 79.84, 42.88, 34.44, 29.07, 28.39

4-(3-thiophène-3-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-piperidine-1-carboxylate de *t*-butyle (**3i**)



L'utilisation de la *N*-Hydroxy-thiophène-3-carboxamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (98:2 cyclohexane / acétate d'éthyle), 113 mg (62 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 280(M-56+H⁺)

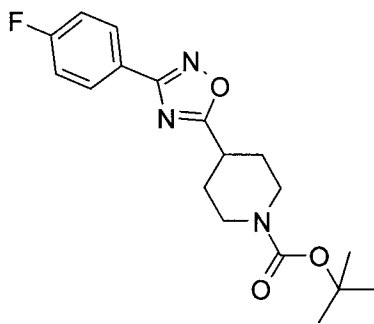
Tr = 7.29 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.71 (dd, J = 3.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 5.2 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 5.2 Hz J = 3.0 Hz, 1H), 3.72 (m, 2H), 2.79 (m, 1H), 2.62 (m, 2H), 1.72 (m, 2H), 1.48 (m, 2H), 1.11 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.26, 163.63, 153.54, 127.48, 126.75, 126.32, 125.07, 78.61, 42.03, 33.32, 28.19, 27.46

F : 86.6 – 88.2°C

4-[3-(4-fluoro-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (4i)



L'utilisation de la 4-Fluoro-*N*-hydroxy-benzamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (95:5 cyclohexane / acétate d'éthyle), 50 mg (14 %) d'une poudre blanche.

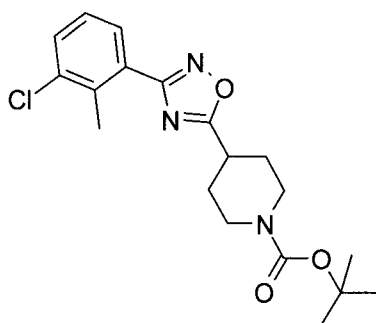
LC-MS: m/z 292 (M-56+H⁺)

Tr = 7.47 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.99 (dd, J = 8.8 Hz J = 3.6 Hz 2H), 7.10 (t, J = 8.8 Hz 2H), 4.06 (m, 2H), 3.10 (m, 1H), 2.93 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.42 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 166.25, 129.58 (d, J = 8.8 Hz), 116.05 (d, J = 21.5 Hz), 79.87, 34.50, 29.15, 28.43

4-[3-(3-chloro-2-méthyl-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle
(5i)



L'utilisation de la 3-Chloro-*N*-hydroxy-2-méthyl-benzamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (95:5 cyclohexane / acétate d'éthyle), 8 mg (2 %) d'une poudre jaune.

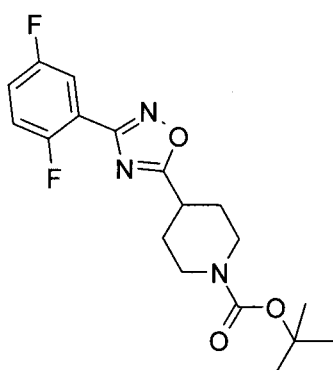
LC-MS: m/z 322 ($M-56+H^+$)

Tr = 8.55 min

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.77 (dd, $J = 7.9$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.50 (dd, $J = 7.5$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.22 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.18 (m, 1H), 3.00 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.13 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 184.89, 180.66, 168.55, 154.64, 136.09, 131.51, 128.81, 128.27, 126.76, 79.92, 34.41, 29.15, 28.43, 18.10

4-[3-(2,5-difluoro-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (**6i**)



L'utilisation de la 2,5-Difluoro-*N*-hydroxy-benzamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (8:2 cyclohexane / acétate d'éthyle), 45 mg (12 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 310 (M-56+H⁺)

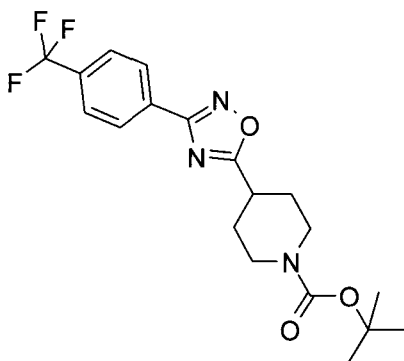
Tr = 7.50 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.65 (m, 1H), 7.09 (m, 2H), 4.04 (m, 2H), 3.12 (m, 1H), 2.92 (m, 2H), 2.04 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.39 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 181.16, 164.21 (m), 159.14 (dd, J = 129.2 Hz, J = 2.4 Hz), 155.83 (dd, J = 139.7 Hz, J = 3.0 Hz), 154.49, 119.12 (dd, J = 24.0 Hz, J = 8.7 Hz), 117.87 (dd, J = 24.0, J = 8.5 Hz), 116.87 (dd, J = 26.2 Hz, J = 3 Hz), 116.26 (dd, J = 15.3 Hz, J = 8.9 Hz), 79.70, 42.79, 34.27, 29.03, 28.32

F: 94.8 – 95.4°C

4-[3-(4-trifluorométhyl-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1- carboxylate de *t*-butyle
(7i)



L'utilisation de la *N*-Hydroxy-4-trifluorométhyl-benzamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (9:1 cyclohexane / acétate d'éthyle), 63 mg (16 %) d'une poudre blanche.

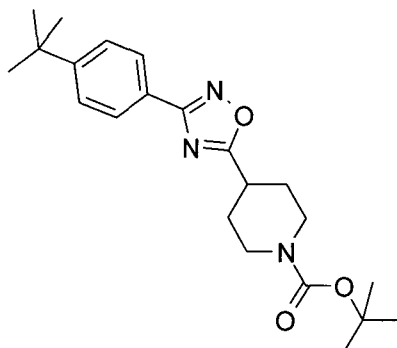
LC-MS: m/z 342 (M-56+H⁺)

Tr = 8.26 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.21 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.14 (m, 2H), 3.18 (m, 1H), 3.01 (m, 2H), 2.13 (m, 2H), 1.90 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 182.87, 168.30, 155.63, 131.24, 128.80, 126.89, 80.93, 35.55, 30.14, 29.44

4-[3-(4-*tert*-butyl-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1- carboxylate de *t*-butyle (8i)



L'utilisation de la 4-*tert*-Butyl-*N*-hydroxy-benzamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé BDM_14500 permet d'obtenir 6.822 g (68 %) d'une huile jaune.

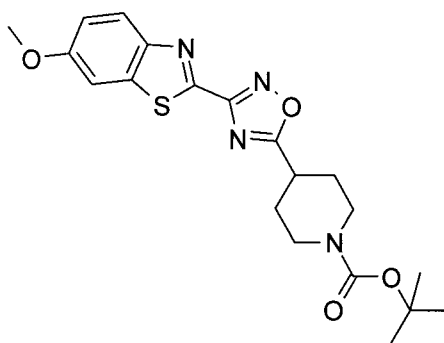
LC-MS: m/z 330 ($\text{M}-56+\text{H}^+$)

Tr = 9.15 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.98 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.10 (m, 2H), 3.15 (m, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.34 (s, 9H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 181.08, 168.12, 154.51, 127.19, 125.76, 123.97, 79.72, 42.89, 34.91, 34.43, 31.15, 29.13, 28.41

4-[3-(6-Méthoxy-benzothiazol-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1- carboxylate de *t*-butyle (9i)



L'utilisation de la *N*-Hydroxy-6-méthoxy-benzothiazole-2-carboxamide selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (7:3 cyclohexane / acétate d'éthyle), 205 mg (27 %) d'une poudre jaune.

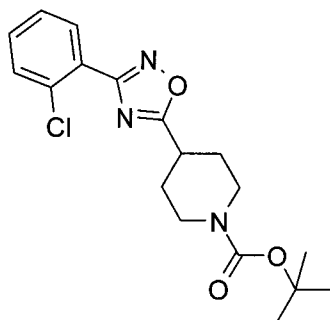
LC-MS: m/z 417 ($M+H^+$)

Tr = 7.31 min

1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), δ 7.15 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.23 (m, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.14 (m, 2H), 1.96 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 182.62, 164.49, 159.17, 154.59, 148.07, 145.28, 137.14, 125.36, 117.03, 103.64, 79.94, 55.86, 42.96, 34.72, 29.08, 28.43

4-[3-(2-chloro-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (**10i**)



L'utilisation de la 2-Chloro-*N*-hydroxy-benzamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé BDM_14500 permet d'obtenir 7.63 g (63 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 308 ($M-56+H^+$)

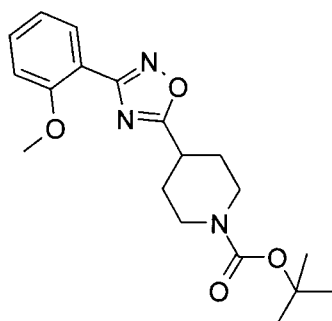
Tr = 8.19 min

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.85 (dd, $J = 7.4$ Hz $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 7.3$ Hz $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.32 (qd, $J = 7.4$ Hz $J = 1.9$ Hz, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.14 (m, 1H), 2.94 (m, 2H), 2.07 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.41 (s, 9H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 180.78, 166.96, 154.55, 133.35, 131.65, 130.87, 126.85, 126.05, 79.76, 42.84, 34.31, 29.08, 28.38

F: 92.8 – 94.1°C

4-[3-(2-méthoxy-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridine-1- carboxylate de *t*-butyle (11i)



L'utilisation de la *N*-Hydroxy-2-méthoxy-benzamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé BDM_14500 permet d'obtenir 7.03 g (75 %) d'une huile orange.

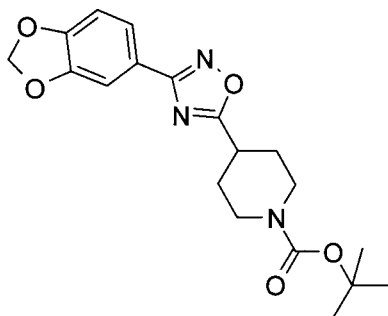
LC-MS: m/z 304 ($M-56+H^+$)

Tr = 7.58 min

1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.90 (dd, $J = 7.6$ Hz $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.37 (td, $J = 7.6$ Hz $J = 7.6$ Hz $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.97 (m, 2H), 4.00 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.09 (m, 1H), 2.90 (m, 2H), 2.02 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.39 (s, 9H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 179.96, 166.59, 158.00, 154.54, 132.24, 131.24, 120.58, 115.73, 111.60, 79.68, 55.89, 42.91, 34.26, 29.10, 28.36

4-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (12i)



L'utilisation de la *N*-Hydroxy-benzo[1,3]dioxole-5-carboxamidine selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (95:5 cyclohexane / acétate d'éthyle), 23 mg (6 %) d'une poudre blanche.

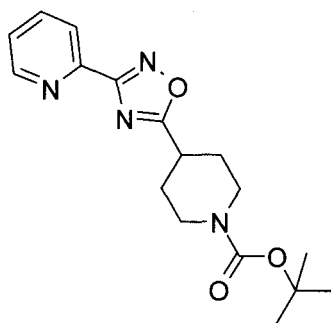
LC-MS: m/z 318 (M-56+H⁺)

Tr = 7.13 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.56 (dd, J = 8.3 Hz J = 1.5 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.07 (m, 1H), 2.91 (m, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.40 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 182.07, 155.63, 151.10, 124.91, 123.33, 121.66, 109.70, 109.64, 108.45, 102.59, 80.77, 35.48, 30.13, 29.43

4-(3-pyridin-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridine-1- carboxylate de *t*-butyle (**13i**)



L'utilisation de la *N*-Hydroxy-pyridine-2-carboxamide selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (75:25 cyclohexane / acétate d'éthyle), 67 mg (20 %) d'une huile jaune.

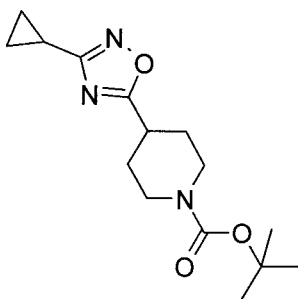
LC-MS: m/z 331 (M+H⁺)

Tr = 5.61 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.82 (dd, J = 4.9 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 8.14 (dd, J = 7.8 Hz J = 1.8 Hz, 1H), 7.88 (td, J = 7.8 Hz J = 7.8 Hz J = 1.8 Hz, 1H), 7.46 (ddd, J = 7.8 Hz J = 4.9 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.21 (m, 1H), 2.98 (m, 2H), 2.15 (m, 2H), 1.93 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 182.2, 168.0, 154.6, 150.3, 146.2, 137.1, 125.5, 123.2, 79.8, 43.1, 34.6, 29.1, 28.4

4-(3-cyclopropyl-[1,2,4]-oxadiazol-5-yl)-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (**14i**)



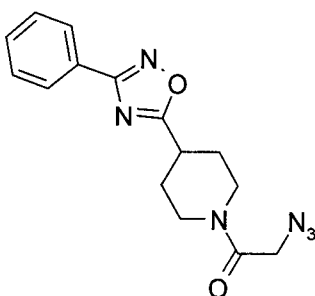
L'utilisation de la *N*-Hydroxy-cyclopropanecarboxamide selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1i** permet d'obtenir, après purification par chromatographie flash sur silice (95:5 cyclohexane / acétate d'éthyle), 70 mg (24 %) d'une huile jaune clair.

LC-MS: m/z 238 ($M-56+H^+$)

Tr = 6.24 min

4.3.3 Procédure générale pour la synthèse des dérivés acétyle-azoture (19-32)

2-azido-1-[4-(3-phényl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (**1**)



Le composé **1i** (70 mg, 1 équiv) est dissous dans l'éthanol absolu et une solution d'HCl 4N dans le dioxane (710 μ L, 15 équiv) est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 12 heures, puis évaporé pour donner l'intermédiaire chlorhydrate désiré. Du dichlorométhane (1 mL), de la triéthylamine (182 μ L, 6 équiv) et du chlorure de chloroacétyle (17 μ L, 1 équiv) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 12 heures, puis évaporé. Le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (30 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse de $KHSO_4$ 0.1N (trois fois 15 mL), puis par une

solution de saumure (deux fois 15 mL), séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le résidu obtenu est dissous dans du diméthylformamide (5 mL) et de l'azoture de sodium (65 mg, 5 équiv) est ajouté. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 12 heures, puis évaporé. Le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (2 mL). La phase organique est alors filtrée, puis évaporée pour donner 20 mg (4 %) d'une huile jaune clair.

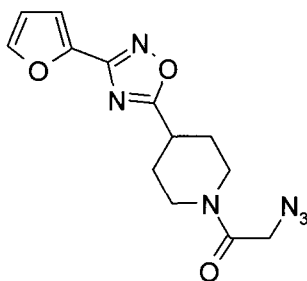
LC-MS: m/z 313 (M+H⁺)

Tr = 6.39 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.03 (dd, J = 7.0 Hz J = 1.8 Hz, 1H), 7.45 (m, 3H), 4.41 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.71 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.04 (m, 1H), 2.17 (m, 2H), 1.94 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.55, 168.28, 165.64, 131.31, 128.89, 127.39, 126.59, 50.73, 44.13, 41.17, 33.97, 29.38, 28.75

2-azido-1-[4-(3-furan-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (2)



L'utilisation du composé **2i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 17 mg (16 %) d'une huile jaune.

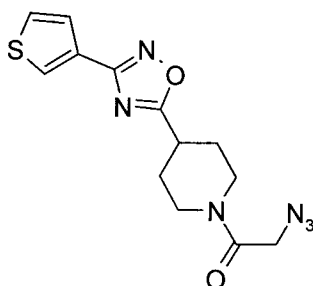
LC-MS: m/z 303 (M+H⁺)

Tr = 4.47 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.58 (dd, J = 1.7 Hz J = 0.8 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 3.5 Hz J = 0.8 Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 3.5 Hz J = 1.7 Hz, 1H), 4.41 (m, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.72 (m, 1H), 3.25 (m, 2H), 3.01 (m, 1H), 2.16 (m, 2H), 1.90 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.61, 165.63, 161.21, 145.32, 142.01, 113.92, 111.90, 50.75, 44.15, 41.17, 33.97, 29.33, 28.72

2-azido-1-[4-(3-thiophèn-3-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-éthanone (3)



L'utilisation du composé **3i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 35 mg (55 %) d'une huile orange.

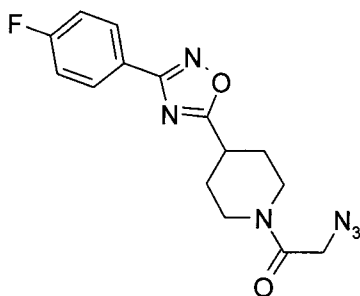
LC-MS: m/z 319 (M+H⁺)

Tr = 5.10 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.05 (dd, J = 3.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 5.1 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 5.1 Hz J = 3.0 Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.77 (m, 1H), 3.28 (m, 2H), 3.09 (m, 1H), 2.21 (m, 2H), 1.98 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.30, 165.59, 164.78, 128.5, 127.78, 127.14, 126.00, 50.79, 44.19, 41.19, 33.97, 29.42, 28.77

2-azido-1-{4-[3-(4-fluoro-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl}-éthanone (4)



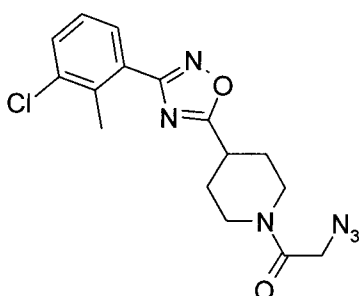
L'utilisation du composé **4i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 10 mg (3 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 331 (M+H⁺)

Tr = 5.66 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 8.07 (dd, $J = 8.8$ Hz $J = 5.0$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.46 (m, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.76 (m, 1H), 3.29 (m, 2H), 3.10 (m, 1H), 2.22 (m, 2H), 1.97 (m, 2H)

2-azido-1-{4-[3-(3-chloro-2-méthyl-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl}-éthanone
(5)



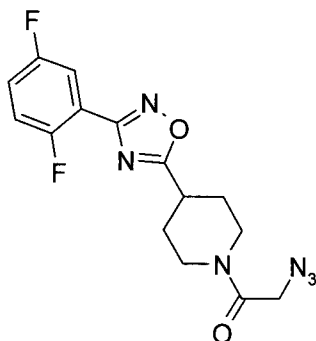
L'utilisation du composé **5i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 32 mg (16 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 361 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 6.57 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.77 (dd, $J = 7.9$ Hz $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 7.9$ Hz $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.77 (m, 1H), 3.31 (m, 2H), 3.10 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.24 (m, 2H), 1.97 (m, 2H)

2-azido-1-{4-[3-(2,5-difluoro-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl}-éthanone (**6**)



L'utilisation du composé **6i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 2 mg (2 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 349 (M+H⁺)

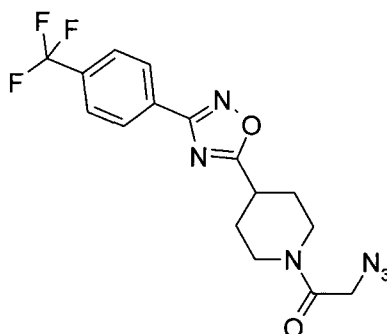
Tr = 5.54 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.70 (m, 1H), 7.18 (m, 2H), 4.44 (m, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.75 (m, 1H), 3.31 (m, 2H), 3.06 (m, 1H), 2.21 (m, 2H), 1.95 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.45, 165.62, 119.38 (dd, J = 24.0 Hz, J = 8.6 Hz), 118.06 (dd, J = 24 Hz, J = 8.7 Hz), 116.93 (dd, J = 26.4 Hz, J = 3.1 Hz), 50.78, 44.14, 41.15, 33.93, 29.37, 28.77

F : 79.7 - 80.7°C

2-azido-1-{4-[3-(4-trifluorométhyl-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl}-éthanone
(7)



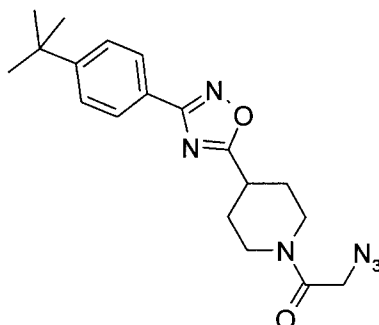
L'utilisation du composé 7i selon la procédure employée pour la synthèse du composé 1 permet d'obtenir 7 mg (8 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 381 (M+H⁺)

Tr = 6.65 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.17 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.46 (m, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.76 (m, 1H), 3.30 (m, 2H), 3.07 (m, 1H), 2.22 (m, 2H), 1.96 (m, 2H)

2-azido-1-{4-[3-(4-*tert*-butyl-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl}-éthanone (8)



L'utilisation du composé **8i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 65 mg (71 %) d'une poudre blanche.

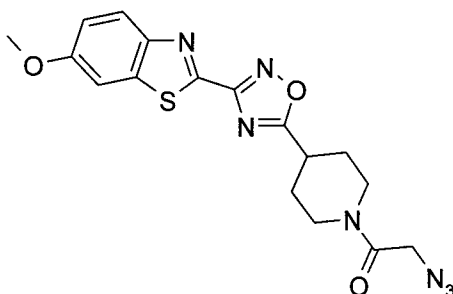
LC-MS: m/z 369 (M+H⁺)

Tr = 7.2 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.99 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.45 (m, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.75 (m, 1H), 3.28 (m, 2H), 3.10 (m, 1H), 2.21 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.35 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 181.00, 165.72, 154.92, 127.37, 126.70, 126.02, 123.90, 50.98, 44.37, 41.36, 35.14, 34.19, 31.33, 29.63, 28.96

2-Azido-1-{4-[3-(6-méthoxy-benzothiazol-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl}-éthanone (9)



L'utilisation du composé **9i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 126 mg (69 %) d'une poudre jaune.

LC-MS: m/z 400 (M+H⁺)

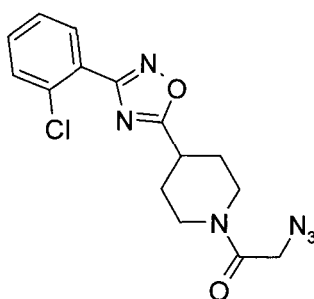
Tr = 5.56 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 8.08 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J = 9.0$ Hz $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.48 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.76 (m, 1H), 3.37 (m, 1H), 3.26 (m, 1H), 3.04 (m, 1H), 2.26 (m, 2H), 2.00 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 181.79, 165.61, 164.54, 159.22, 150.78, 148.02, 137.14, 125.35, 117.11, 103.64, 55.87, 50.82, 44.22, 41.21, 34.25, 29.33, 28.74

F: 127.5-129.5°C

2-azido-1-{4-[3-(2-chloro-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl}-éthanone (10)



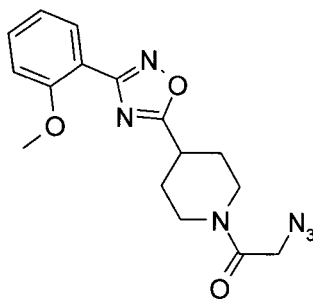
L'utilisation du composé **10i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 38 mg (33 %) d'une huile incolore.

LC-MS: m/z 347 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 5.60 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.88 (dd, $J = 7.4$ Hz $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 7.4$ Hz $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.41 (td, $J = 7.4$ Hz $J = 7.4$ Hz $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 7.4$ Hz $J = 7.4$ Hz $J = 1.6$ Hz, 1H), 4.42 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.30 (m, 2H), 3.08 (m, 1H), 2.19 (m, 2H), 1.95 (m, 2H)

2-azido-1-[4-[3-(2-méthoxy-phényl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-éthanone (11)



L'utilisation du composé **11i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 95 mg (47 %) d'une huile incolore.

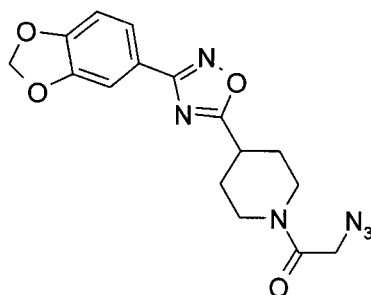
LC-MS: m/z 343 (M+H⁺)

Tr = 4.90 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.96 (dd, J = 7.5 Hz J = 1.6 Hz, 1H), 7.46 (ddd, J = 9.3 Hz J = 7.5 Hz J = 1.9 Hz 1H), 7.06 (m, 2H), 4.42 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.29 (m, 2H), 3.08 (m, 1H), 2.19 (m, 2H), 1.95 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 179.22, 166.77, 165.57, 158.09, 132.44, 131.30, 120.70, 115.60, 111.69, 55.99, 50.80, 44.20, 41.20, 33.89, 29.45, 28.82

2-azido-1-[4-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-éthanone (12)



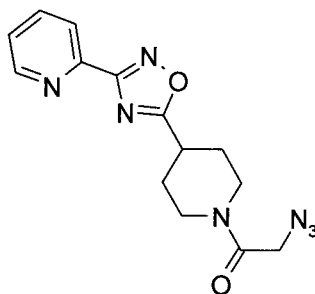
L'utilisation du composé **12i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 110 mg (90 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 357 (M+H⁺)

Tr = 5.20 min

^1H NMR (CD_3OD): δ 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 6.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.05 (s, 2H), 4.43 (m, 1H), 4.16 (m, 2H), 3.83 (m, 1H), 3.06 (m, 1H), 2.19 (m, 2H), 1.92 (m, 2H)
 ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 181.14, 167.71, 166.85, 150.38, 148.30, 121.91, 120.39, 108.24, 106.60, 101.81, 50.27, 43.80, 40.96, 33.74, 29.07, 28.54

2-azido-1-[4-(3-pyridin-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (13)



L'utilisation du composé **13i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 15 mg (6 %) d'une huile jaune.

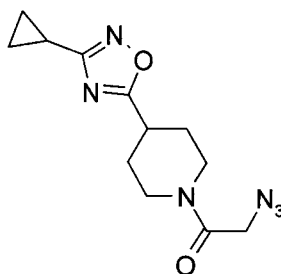
LC-MS: m/z 314 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 3.83 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 8.73 (m, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.79 (td, $J = 7.7$ Hz $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.38 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 2.98 (m, 1H), 2.17 (m, 2H), 1.93 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 181.88, 181.43, 168.10, 165.59, 150.35, 146.02, 137.16, 125.67, 123.23, 50.72, 44.17, 41.19, 34.14, 29.33, 28.74

2-azido-1-[4-(3-cyclopropyl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (14)



L'utilisation du composé **14i** selon la procédure employée pour la synthèse du composé **1** permet d'obtenir 28 mg (10 %) d'une huile jaune.

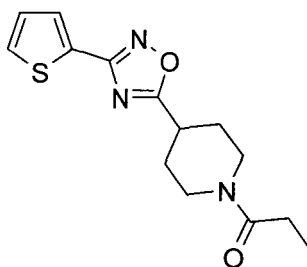
LC-MS: m/z 277 (M+H⁺)

Tr = 4.23 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 4.40 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.13 (m, 3H), 2.09 (m, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.06 (m, 5H)

4.3.4 Procédure générale pour la synthèse des analogues de BDM_14801 par couplage avec des chlorures d'acide

1-[4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-propan-1-one (16)



Le chlorhydrate de 4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridine (100 mg, 1 équivalent) et la diisopropyléthylamine (252 µL, 4 équivalent) sont solubilisés dans du dichlorométhane préalablement séché sur MgSO₄ (1.5 mL). Le Propionyle chlorure (32 µL, 1 équivalent) est ajouté au goutte à goutte et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant deux heures à température ambiante. De l'acétate d'éthyle (15 mL) est alors ajouté. La phase organique est lavée successivement par une solution aqueuse de NaOH 1M (trois fois 20 mL), une solution aqueuse d'HCl 1M (trois fois 20 mL) et une solution de saumure (20 mL), puis séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner 60 mg (56 %) d'une poudre blanche.

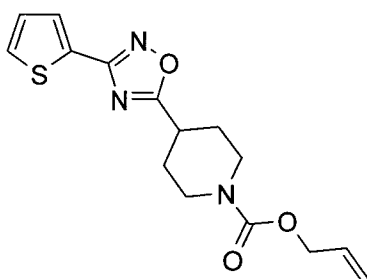
LC-MS: m/z 292 (M+H⁺)

Tr = 4.92 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.75 (dd, J = 3.8 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.8 Hz, 1H), 4.1 (m, 2H), 3.21 (m, 1H), 3.07 (m, 2H), 2.35 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 2.13 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.13 (t, J = 7.5 Hz, 3H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.88, 172.29, 164.33, 129.59, 129.33, 128.21, 127.98, 34.37, 29.27, 26.49, 9.52
F: 67.2-68.1°C

4-(3-Thiophèn-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridine-1-carboxylate d'allyle (17)



L'utilisation d'allylchloroformate selon la procédure employée pour la synthèse du composé **16** permet d'obtenir 106 mg (87 %) d'une huile jaune.

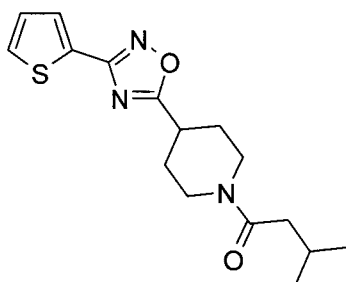
LC-MS: m/z 320 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 6.3 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.76 (dd, $J = 3.7$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.92 (m, 1H), 5.29 (tdd, $J = 17.2$ Hz $J = 2.9$ Hz $J = 1.4$ Hz, 1H), 5.20 (tdd, $J = 10.4$ Hz $J = 2.9$ Hz $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.59 (td, $J = 5.5$ Hz $J = 1.4$ Hz $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.16 (m, 2H), 4.1 (s, 2H), 3.16 (m, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.12 (m, 2H), 1.91 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 181.06, 164.35, 154.97, 132.98, 129.56, 129.28, 128.31, 127.97, 117.52, 66.14, 43.03, 34.31, 29.01

3-Méthyl-1-[4-(3-thiophèn-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-butan-1-one (21)



L'utilisation du composé **2** et de 3-Méthylbutyryle chloride selon la procédure employée pour la synthèse du composé **33** permet d'obtenir 80 mg (68 %) d'une huile jaune.

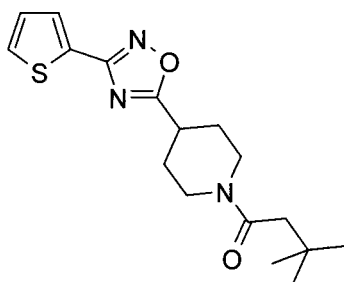
LC-MS: m/z 320 (M+H⁺)

Tr = 5.77 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.76 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.52 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.21 (m, 2H), 2.91 (m, 1H), 2.22 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 2.12 (m, 3H), 1.87 (m, 2H), 0.96 (d, J = 6.4 Hz, 1H),

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.86, 176.47, 171.22, 164.31, 129.60, 129.33, 128.16, 127.97, 44.96, 42.06, 40.72, 34.34, 29.68, 29.01, 25.82, 22.70

3,3-Diméthyl-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-butan-1-one (**23**)



L'utilisation de 3,3-Diméthylbutyryle chloride selon la procédure employée pour la synthèse du composé **33** permet d'obtenir 76 mg (62 %) d'une huile jaune.

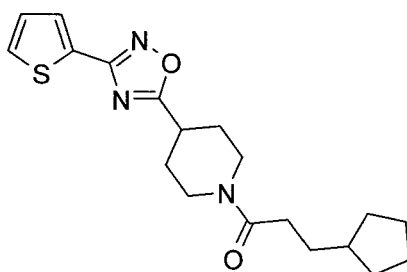
LC-MS: m/z 334 (M+H⁺)

Tr = 6.15 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.74 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.46 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.8 Hz, 1H), 4.51 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 3.00 (m, 2H), 2.27 (s, 2H), 2.13 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.03 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.90, 170.47, 164.33, 129.59, 129.31, 128.21, 127.98, 44.69, 34.35, 31.49, 30.06, 29.37

3-Cyclopentyl-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-propan-1-one (31)



L'utilisation de 3-Cyclopentylpropionyle chloride selon la procédure employée pour la synthèse du composé **16** permet d'obtenir 100 mg (76 %) d'une huile jaune.

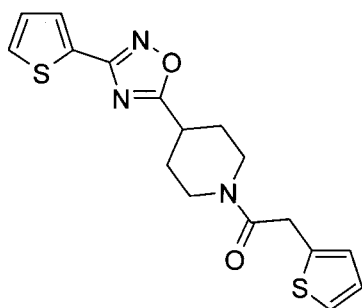
LC-MS: m/z 360 (M+H⁺)

Tr = 6.92 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.73 (dd, J = 3.6 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.47 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.20 (m, 2H), 2.91 (m, 1H), 2.33 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 1.40-1.87 (m, 13H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.88, 171.83, 164.32, 129.57, 129.31, 128.22, 127.97, 39.84, 34.36, 32.65, 32.52, 31.62, 29.15, 25.13

2-Thiophène-2-yl-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (40)



L'utilisation de Thiophène-2-yl-acétyle chloride selon la procédure employée pour la synthèse du composé **16** permet d'obtenir 51 mg (39 %) d'une huile jaune.

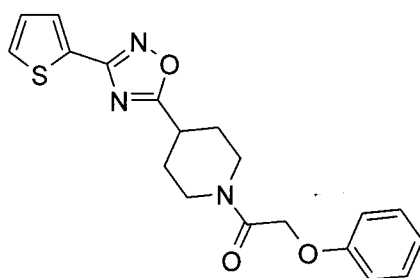
LC-MS: m/z 360 (M+H⁺)

Tr = 5.77 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.76 (dd, $J = 3.7$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.89 (dd, $J = 3.5$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 4.48 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.18 (m, 2H), 3.00 (m, 1H), 2.11 (m, 2H), 1.84 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.71, 168.44, 164.36, 136.33, 129.64, 129.38, 128.01, 126.94, 126, 09, 124.86, 45.35, 41.07, 35.24, 34.15, 29.29, 28.70

2-Phénoxy-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (41)



L'utilisation de Phénoxyacétyle chloride selon la procédure employée pour la synthèse du composé **16** permet d'obtenir 136 mg (99 %) d'une huile jaune.

LC-MS: m/z 370 ($\text{M}+\text{H}^+$)

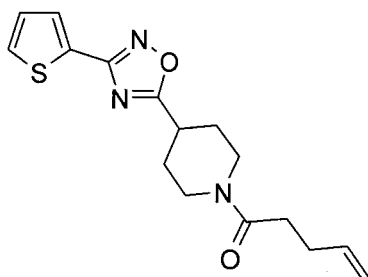
Tr = 6 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.77 (dd, $J = 3.8$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 8.6$ Hz $J = 1.2$ Hz, 2H), 7.14 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 3.8$ Hz, 1H), 6.96 (m, 3H), 4.70 (s, 2H), 4.44 (m, 1H), 4.1 (m, 1H), 3.32 (m, 2H), 3.04 (m, 1H), 2.15 (m, 2H), 1.92 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.66, 166.54, 164.38, 157.79, 129.69, 129.64, 129.36, 128.21, 121.77, 114.5767.84, 44.51, 41.25, 34.20, 29.57, 28.83

4.3.5 Procédure générale pour la synthèse des analogues de BDM_14801 par couplage avec des acides carboxyliques

1-[4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-pent-4-ène-1-one (18)



L'acide Pent-4-énoïque (37 mg, 2 équiv), l'EDCI (141 mg, 2 équiv) et la triéthylamine (207 μ L, 4 équiv) sont solubilisés dans du dichlorométhane préalablement séché sur $MgSO_4$ (2 mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation cinq minutes à température ambiante. Le chlorhydrate de 4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridiné (1 équiv) est ajouté et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. De l'acétate d'éthyle est alors ajouté (20 mL). La phase organique est lavée successivement par une solution aqueuse de NaOH 1M (trois fois 30 mL), une solution aqueuse d'HCl 1M (trois fois 30 mL) et une solution de saumure (30 mL), puis séchée sur $MgSO_4$ et évaporée pour obtenir 19 mg (59 %) d'une poudre blanche.

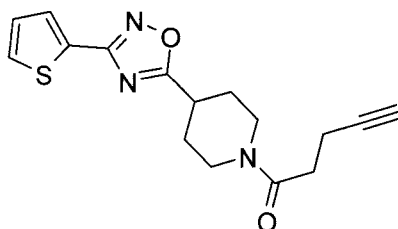
LC-MS: m/z 318 ($M+H^+$)

Tr = 5.63 min

1H RMN ($CDCl_3$): δ 7.74 (dd, $J = 3.7$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.47 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.80 (m, 1H), 5.00 (m, 2H), 4.50 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.23 (m, 2H), 2.92 (m, 1H), 2.42 (m, 4H), 2.13 (m, 2H), 1.87 (m, 2H)

^{13}C RMN ($CDCl_3$): δ 180.84, 170.69, 164.35, 137.38, 129.60, 129.33, 128.22, 127.99, 115.35, 44.63, 40.75, 34.35, 32.53, 29.61, 29.29, 28.98

1-[4-(3-Thiophène-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-pent-4-yn-1-one (19)



L'utilisation d'acide Pent-4-ynoïque selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 33 mg (57 %) d'une huile jaune.

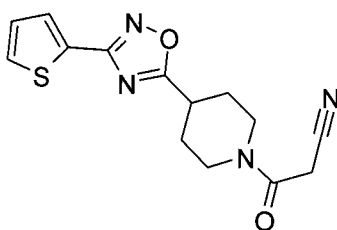
LC-MS: m/z 316 (M+H⁺)

Tr = 5.39 min

¹H RMN (CDCl₃): δ 7.73 (m, 1H), 7.46 (dd, J = 5.1 Hz J = 1.3 Hz, 1H), 7.10 (m, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.88 (m, 1H), 3.21 (m, 2H), 2.93 (m, 1H), 2.53 (m, 4H), 2.12 (m, 2H), 1.96 (s, 1H), 1.86 (m, 2H)

¹³C RMN (CDCl₃): δ 180.77, 169.30, 164.32, 129.62, 129.37, 128.17, 128.00, 83.44, 68.90, 44.49, 40.86, 34.25, 32.15, 29.51, 28.90, 14.54

3-Oxo-3-[4-(3-thiophène-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-propionitrile (20)



L'utilisation d'acide Cyano-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 26 mg (46 %) d'une huile jaune.

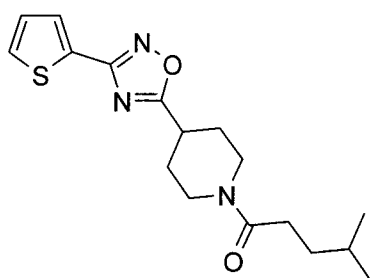
LC-MS: m/z 303 (M+H⁺)

Tr = 4.70 min

^1H RMN (CD_2Cl_2): δ 7.81 (dd, $J = 3.6$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 4.8$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.21 (dd, $J = 4.8$ Hz $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.30 (m, 2H), 3.09 (m, 1H), 2.25 (m, 2H), 2.00 (m, 2H)

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 180.36, 164.46, 160.16, 129.78, 129.52, 128.12, 114.03, 45.51, 41.59, 33.81, 29.18, 28.61, 25.11

4-Méthyl-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-pentan-1-one (22)



L'utilisation d'acide 4-méthyl-valérique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 102 mg (83 %) d'une huile jaune clair.

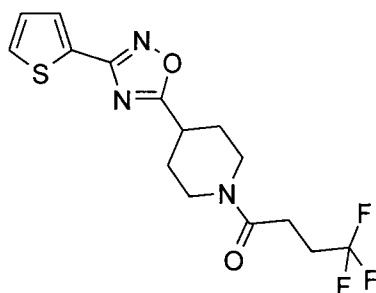
LC-MS: m/z 334 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 6.3 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.72 (dd, $J = 3.7$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.19 (m, 2H), 2.90 (m, 1H), 2.3 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.49 (m, 3H), 0.86 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.87, 171.86, 164.30, 129.58, 129.32, 128.19, 127, 98, 44,55, 40.73, 34.35, 34.21, 31.37, 29.27, 27.91, 22.39

4,4,4-Trifluoro-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-butan-1-one (24)



L'utilisation d'acide 4,4,4-Trifluoro-butyrique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 100 mg (76 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 346 (M+H⁺)

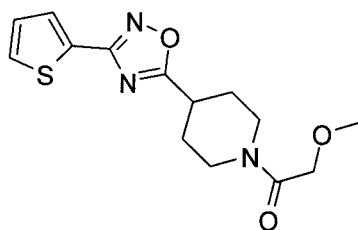
Tr = 5.95 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.74 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.1 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.1 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.23 (m, 2H), 2.96 (m, 1H), 2.52 (m, 4H), 2.13 (m, 2H), 1.88 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.66, 168.07, 164.34, 129.63, 129.36, 128.89, 125.24, 44.38, 40.98, 34.15, 29.74, 29.38, 28.81, 25.87

F: 54.7-56.2°C

2-Méthoxy-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (**25**)



L'utilisation d'acide Méthoxy-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 18 mg (32 %) d'une huile jaune.

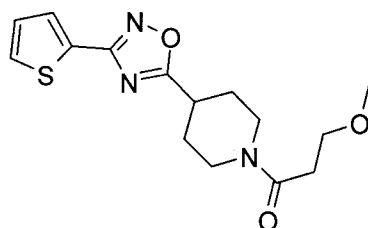
LC-MS: m/z 308 (M+H⁺)

Tr = 4.55 min

¹H RMN (CDCl₃): δ 7.72 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.07 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 3.90 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.20 (m, 2H), 2.94 (m, 1H), 2.12 (m, 2H), 1.87 (m, 2H)

¹³C RMN (CDCl₃): δ 180.76, 167.54, 164.32, 129.60, 129.35, 128.17, 127.98, 71.87, 59.07, 44.08, 40.94, 34.22, 29.56, 28.89

3-Méthoxy-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-propan-1-one (26)



L'utilisation d'acide 3-Méthoxy-propionique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 23 mg (69 %) d'une huile jaune.

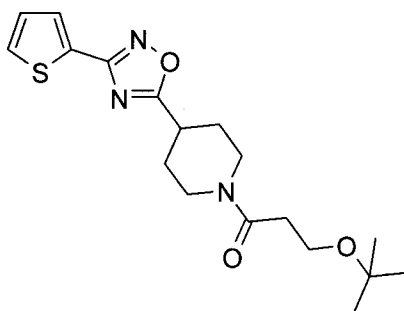
LC-MS: m/z 322 (M+H⁺)

Tr = 4.69 min

¹H RMN (CDCl₃): δ 7.70 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.1 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.1 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.44 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.63 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.29 (s, 3H), 3.17 (m, 2H), 2.89 (m, 1H), 2.57 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.08 (m, 2H), 1.85 (m, 2H)

¹³C RMN (CDCl₃): δ 180.85, 169.44, 164.28, 129.57, 129.32, 128.19, 127.96, 68.75, 58.86, 44.81, 40.72, 34.25, 33.46, 29.52, 28.87

3-tert-Butoxy-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-propan-1-one (27)



L'utilisation d'acide 3-tert-Butoxy-propionique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **27** permet d'obtenir 133 mg (99 %) d'une huile jaune.

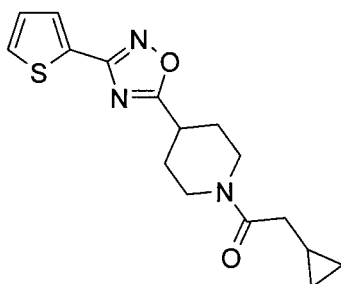
LC-MS: m/z 364 (M+H⁺)

Tr = 5.77 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.70 (dd, $J = 3.7$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.07 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.62 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.17 (m, 2H), 2.87 (m, 1H), 2.53 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.07 (m, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.12 (s, 9H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.90, 170.18, 164.27, 129.54, 129.29, 128.20, 127.94, 73.10, 58.50, 44.96, 40.71, 34.29, 34.29, 29.56, 28.95, 27.47

2-Cyclopropyl-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (30)



L'utilisation d'acide Cyclopropyl-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 45 mg (78 %) d'une huile incolore.

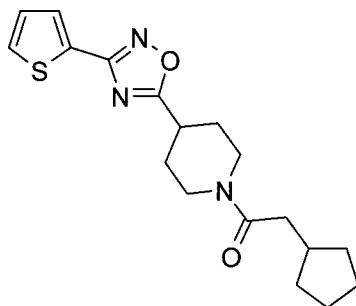
LC-MS: m/z 318 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 5.33 min

^1H NMR (CDCl_3): ^1H RMN (CD_2Cl_2): δ 7.80 (dd, $J = 3.9$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.56 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.55 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.27 (m, 2H), 2.94 (m, 1H), 2.27 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.21 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.06 (m, 1H), 0.58 (m, 2H), 0.20 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.86, 171.07, 164.32, 129.58, 129.32, 128.21, 127.98, 44.79, 40.66, 38.54, 34.35, 29.64, 29.00, 7.31, 4.57

2-Cyclopentyl-1-[4-(3-thiophène-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-éthanone (32)



L'utilisation d'acide Cyclopentyl-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 119 mg (94 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 346 (M+H⁺)

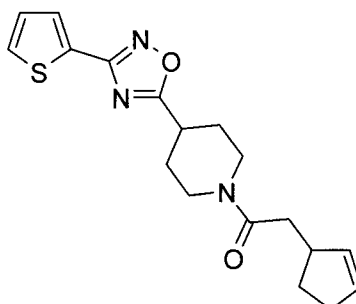
Tr = 6.4 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.70 (dd, J = 3.6 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.6 Hz, 1H), 4.47 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.86 (m, 1H), 2.32 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.80 (m, 4H), 1.54 (m, 4H), 1.11 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.96, 171.36, 164.34, 129.63, 129.37, 128.26, 128.02, 44.88, 40.70, 39.25, 36.79, 34.41, 32.75, 29.71, 29.06, 25.00

F: 85.3-86.8°C

2-Cyclopent-2-ényl-1-[4-(3-thiophène-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-éthanone (33)



L'utilisation d'acide Cyclopent-2-ényl-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 126 mg (99 %) d'une poudre jaune.

LC-MS: m/z 344 (M+H⁺)

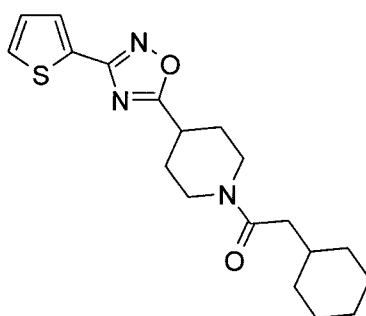
Tr = 6.16 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.71 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.1 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.1 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 5.69 (m, 1H), 5.63 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.16 (m, 2H), 3.07 (m, 1H), 2.84 (m, 1H), 2.30 (m, 4H), 2.09 (m, 3H), 1.81 (m, 2H), 1.39 (m, 1H),

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.87, 170.73, 164.28, 134.23, 131.27, 129.59, 129.33, 128.16, 127.97, 44.73, 42.12, 40.66, 39.23, 34.32, 31.79, 29.94, 29.61, 28.97

F : 63.3-63.9°C

2-Cyclohexyl-1-[4-(3-thiophène-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-éthanone (34)



L'utilisation d'acide cyclohexyl-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 132 mg (99 %) d'une huile blanche.

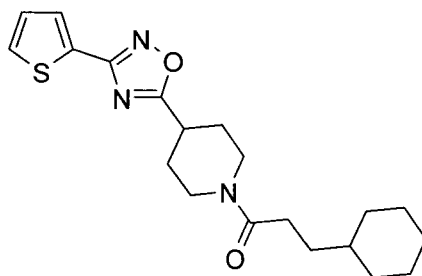
LC-MS: m/z 360 (M+H⁺)

Tr = 6.75 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.69 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.44 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.88 (m, 1H), 2.17 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 2.09 (m, J = 6.7 Hz J = 2.7 Hz, 3H), 1.59-1.83 (m, 12H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.84, 171.29, 164.24, 129.60, 129.34, 128.07, 127.95, 45.06, 41.97, 40.67, 35.017, 34.25, 33.30, 32.95, 29.64, 28.96, 26.03

3-Cyclohexyl-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-propan-1-one (35)



L'utilisation d'acide 3-Cyclohexyl-propionique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 137 mg (99 %) d'une huile jaune clair.

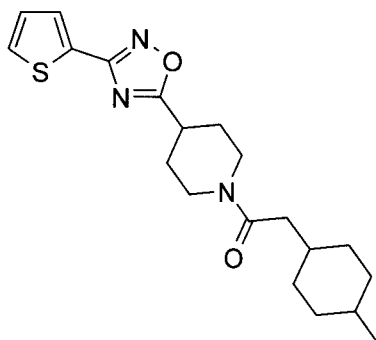
LC-MS: m/z 374 (M+H⁺)

Tr = 7.40 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.71 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.18 (m, 2H), 2.86 (m, 1H), 1.45-2.35 (m, 19H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.87, 172.12, 164, 228, 129.58, 129.32, 128.17, 121.97, 44.75, 40.71, 37.44, 34.33, 33.10, 32.80, 30.90, 29.63, 28.94, 26.52, 26.22

2-(4-Méthyl-cyclohexyl)-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (36)



L'utilisation d'acide (4-Méthyl-cyclohexyl)-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 137 mg (99 %) d'une huile blanche.

LC-MS: m/z 374 (M+H⁺)

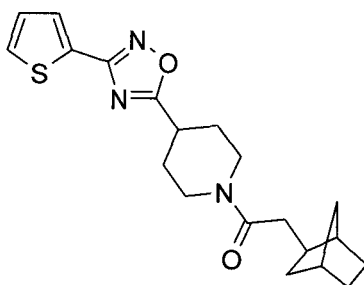
Tr = 7.28 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.74 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.46 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.49 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.21 (m, 2H), 2.91 (m, 1H), 2.30 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 1.18-2.16 (m, 11H), 0.93 (m, 1H), 0.88 (d, J = 6.8 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.88, 171.14, 164.33, 129.59, 129.32, 128.21, 127.98, 44.98, 40.67, 37.97, 34.97, 34.40, 33.34, 32.67, 30.77, 28.74, 22.60, 20.06

F : 60.4-62.2°C

2-Bicyclo[2.2.1]hept-2-yl-1-[4-(3-thiophène-2-yl)-[1,2,4]oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl]-éthanone (37)



L'utilisation de l'acide Bicyclo[2.2.1]hept-2-yl-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 136 mg (99 %) d'une huile jaune.

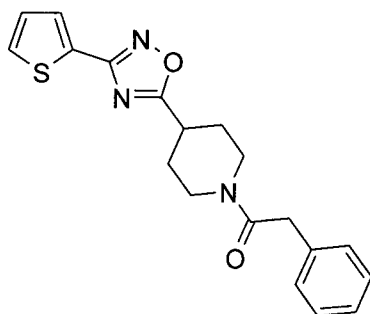
LC-MS: m/z 372 (M+H⁺)

Tr = 6.93 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.71 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), δ 3.87 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.86 (m, 1H), 1.81-2.31 (m, 11H), 1.23-1.42 (m, 4H), 1 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.87, 171.06, 164.27, 129.58, 129.32, 128.16, 127.97, 44.79, 41.14, 40.65, 40.04, 38.58, 38.02, 36.75, 35.30, 34.33, 29.86, 29.65, 28.99, 28.55

2-Phényl-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (38)



L'utilisation d'acide phényl-acétique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 129 mg (99 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 354 (M+H⁺)

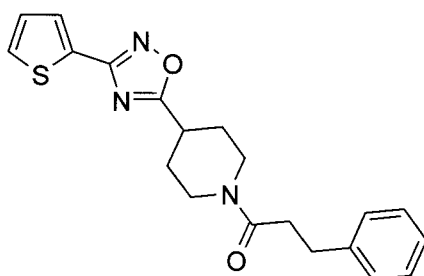
Tr = 5.89 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.73 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 5.1 Hz J = 1.2 Hz, 1H), 7.21-7.32 (m, 5H), 7.10 (dd, J = 5.1 Hz J = 3.7 Hz, 1H), 4.47 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.13 (m, 2H), 2.94 (m, 1H), 1.6-2.12 (m, 4H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.79, 169.44, 164.30, 134.95, 129.62, 129.38, 128.82, 128.57, 128.19, 128.03, 126.90, 45.18, 41.08, 40.88, 34.15, 29.23, 28.77

F: 79.6-80.2°C

3-Phényl-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-propan-1-one (39)



L'utilisation d'acide 3-Phényl-propionique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **18** permet d'obtenir 96 mg (71 %) d'une huile blanche.

LC-MS: m/z 368 (M+H⁺)

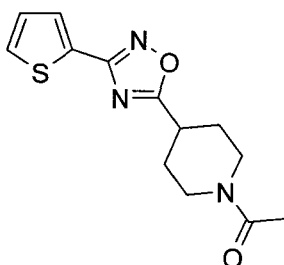
Tr = 6.22 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.76 (dd, $J = 3.6$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.46 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.18-7.30 (m, 5H), 7.12 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.51 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.13 (m, 2H), 2.97 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.64 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.06 (m, 2H), 2.64 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.74 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.83, 170.69, 164.34, 141.14, 129.59, 129.35, 128.57, 128.47, 128.30, 126.27, 44.68, 40.81, 35.03, 34.28, 31.59, 29.41, 28.90

4.3.6 Procédure générale pour la synthèse des analogues de BDM_14801 par couplage avec des anhydrides d'acide

1-[4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone (15)



Le chlorhydrate de 4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridinium (50 mg, 1 équiv) et la diisopropyléthylamine (77 μL , 3 équiv) sont solubilisés dans du dichlorométhane préalablement séché sur MgSO_4 (1 mL). De l'anhydride acétique (39 μL , 1.2 équiv) est ajouté au goutte à goutte et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. De l'acétate d'éthyle est alors ajouté (15 mL). La phase organique est lavée successivement par une solution aqueuse de NaOH 1M (trois fois 20 mL), une solution aqueuse d' HCl 1M (trois fois 20 mL) et une solution de saumure (20 mL), puis séchée sur MgSO_4 et évaporée pour donner 41 mg (98 %) d'une poudre jaune.

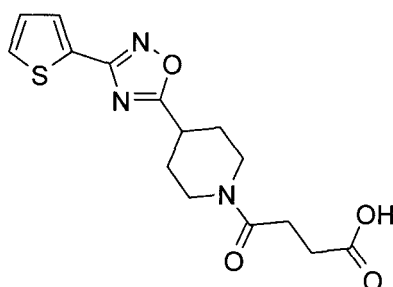
LC-MS: m/z 278 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 4.53 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.76 (dd, $J = 3.7$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.48 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.23 (m, 2H), 2.94 (m, 1H), 2.12 (m, 5H), 1.90 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.79, 169.09, 164.37, 129.61, 129.35, 128.21, 128.00, 34.25, 29.70, 21.37
F: 62.3-63.4°C

Acide 4-Oxo-4-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-butyrique (28)



L'utilisation d'anhydride succinique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **15** permet d'obtenir 39 mg (86 %) d'une poudre jaune.

LC-MS: m/z 336 ($\text{M}+\text{H}^+$)

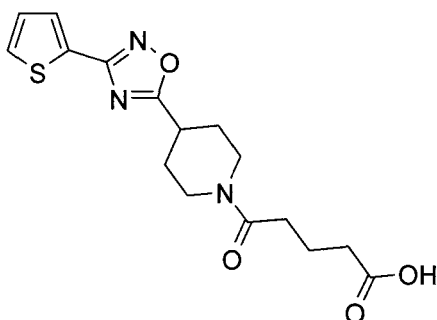
Tr = 4.35 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.77 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.15 (dd, $J = 4.9$ Hz $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.48 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.27 (m, 2H), 3.02 (m, 1H), 2.72 (s, 4H), 2.17 (m, 2H), 1.96 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 180.77, 176.86, 170.22, 164.40, 129.68, 129.39, 128.15, 128.02, 34.19, 29.48, 27.97

F: 110.4-112.4°C

Acide 5-Oxo-5-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-pentanoïque (29)



L'utilisation d'anhydride glutarique selon la procédure employée pour la synthèse du composé **15** permet d'obtenir 31 mg (64 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 350 (M+H⁺)

Tr = 4.47 min

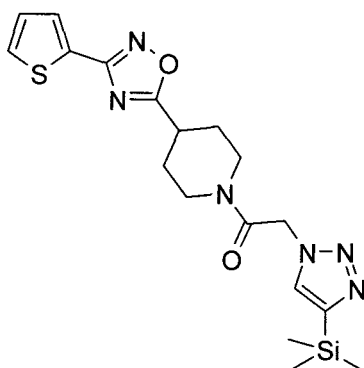
¹H NMR (CDCl₃): δ 7.78 (dd, J = 3.7 Hz J = 1.1 Hz, 1H), δ 7.50 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.1 Hz, 1H), δ 7.15 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.7 Hz, 1H), δ 4.51 (m, 1H), δ 3.93 (m, 1H), δ 3.26 (m, 2H), δ 2.97 (m, 1H), δ 2.48 (m, J = 7 Hz, 4H), δ 2.18 (m, 2H), δ 1.95 (m, 4H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 180.76, 177.70, 171.12, 164.35, 129.66, 129.38, 128.16, 128.01, 34.24, 33.18, 32.14, 20.26

F : 125.3 – 126.4°C

4.4 Synthèse des composés 1,2,3-triazoles

1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-2-(4-triméthylsilyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-éthanone



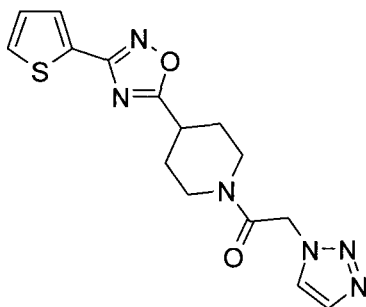
Le composé BDM_14801 (159 mg, 1 équiv), l'iodure de cuivre (2.16 mg, 0.1 équiv) et l'éthynyltriméthylsilane (52 µl, 2.2 équiv) sont mis en solution dans l'acétonitrile (2 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 48 heures sous atmosphère inerte. L'acétonitrile est évaporé, puis le résidu est purifié sur gel de silice (80 :20 Acétate d'éthyle/Cyclohexane) pour donner 86 mg (41 %) d'un solide jaune.

LC-MS: m/z 417 (M+H⁺)

Tr: 5.84 min

^1H NMR (DMSO- d_6): 8,30 (s, 1H), 7,80 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 7,52 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 7,17 (dd, $J = 5,0$ Hz, $J = 3,0$ Hz, 1H), 5,84 (s, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,38 (m, 1H), 3,21 (m, 1H), 2,21 (m, 2H), 1,98 (m, 2H), 0,50 (s, 9H)

1-[4-(3-thiophèn-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-2-[1,2,3]triazol-1-yl-éthanone



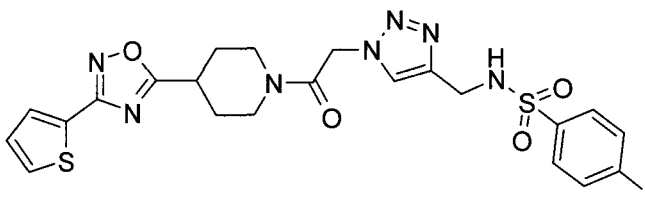
Le 1-[4-(3-thiophèn-2-yl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-2-(4-triméthylsilanyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-éthanone (38 mg, 1 équiv) et le fluorure de tétrabutylammonium (100 μL , 1.05 équiv) sont mis en solution dans le tétrahydrofurane (0,9 mL). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant une heure. Le tétrahydrofurane est évaporé, puis le résidu est purifié sur gel de silice (90:10 : CH_2Cl_2 :méthanol) pour donner 16 mg (50 %) d'un solide jaune clair.

LC-MS: m/z 350 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tr = 4.33 min

^1H NMR (CDCl_3) : 8,30 (s, 2H), 7,78 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 7,51 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 7,16 (dd, $J = 5,0$ Hz, $J = 3,0$ Hz, 1H), 5,36 (s, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,01 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 3,11 (m, 1H), 2,21 (m, 2H), 1,94 (m, 2H)

4-iodo-*N*-{[1-(2-oxo-2-{4-[3-(2-thiényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]pipéridin-1-yl}éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]méthyl}-benzènesulfonamide



Le composé BDM_14801 (19 mg, 1 équiv), l'iodure de cuivre (2 mg, 0.05 équiv) et le 4-Iodo-*N*-prop-2-ynyl-benzènesulfonamide (19 mg, 1 équiv) sont solubilisés dans d'acétonitrile (400 μ L). Le milieu réactionnel est mis sous agitation à température ambiante pendant 18 heures, puis est filtré pour donner 21 mg d'une poudre blanche.

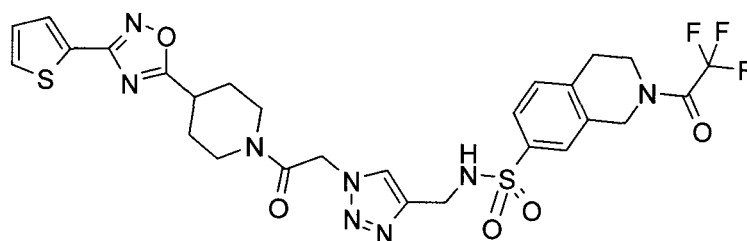
LC-MS: m/z 640 (M+H⁺)

Tr = 5.80 min

¹H NMR (DMF-d₇): 8,20 (s, 1H), 8,09 (m, 2H), 7,94 (m, 2H), 7,87 (m, 1H), 7,70 (m, 2H), 7,33 (m, 1H), 5,60 (m, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,24 (s, 2H), 4,14 (m, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,00 (m, 1H), 2,21 (m, 2H), 2,04 (m, 1H), 1,76 (m, 1H)

¹³C NMR (DMF-d₇): 182.00, 164.39, 164.17, 143.51, 140.80, 138.44, 130.45, 129.91, 128.67, 128.52, 128.12, 125.14, 99.66, 50.89, 43.81, 41.00, 38.71, 33.84, 30.05, 30.00

N-{[1-(2-oxo-2-{4-[3-(2-thiényl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-pipéridin-1-yl}éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]méthyl}-2-(trifluoroacétyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoléine-7-sulfonamide :



Le composé BDM_14801 (19 mg, 1 équiv), l'iodure de cuivre (2 mg, 0.05 équiv) et le 2-(2,2,2-Trifluoro-acétyl)-1,2,3,4-tétrahydro-isoquinoline-7-sulfonic acid prop-2-ynylamide (19 mg, 1 équiv) sont solubilisés dans d'acétonitrile (400 μ L). Le milieu réactionnel est mis sous agitation à température ambiante pendant 18 heures, puis est filtré pour donner 21 mg d'une poudre beige.

LC-MS: m/z 665 (M+H⁺)

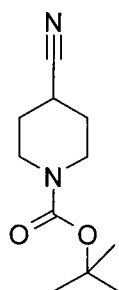
Tr = 5.74 min

¹H NMR (DMF-d₇): 7,31-8,08 (m, 8H), 5,60 (m, 2H), 4,93 and 4,99 (2xs, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,14 (m, 1H), 3,97 (m, 2H), 3,51 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,10 (m, 2H), 3,00 (m, 1H), 2,22 (m, 2H), 2,00 (m, 1H), 1,76 (m, 1H)

^{13}C NMR (DMF- d_7): 181.99, 164.40, 164.18, 143.69, 139.30, 138.88, 133.24, 130.45, 129.90, 129.60, 128.51, 128.12, 125.30, 125.17, 50.86, 45.19, 43.78, 43.00, 40.99, 38.80, 33.84, 30.05, 30.00

4.5 Synthèse des composés 1,2,4-triazoles

4-Cyano-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle



Le 1-Boc-pipéridine-4-carboxamide (5 g, 1 équiv) et la diisopropyléthylamine (7.51 mL, 2 équiv) sont dissous dans le tétrahydrofurane anhydre (50 mL) sous atmosphère inerte. Le mélange est refroidi à 0°C, puis l'anhydride trifluoroacétique est ajouté au goutte à goutte. Après 15 minutes, de l'acétate d'éthyle est ajouté au milieu. La phase organique est lavée à l'eau (trois fois 100 mL) et avec une solution saturée en NaCl (100 mL), puis séchée sur MgSO_4 et évaporée pour donner 4.53 g (98 %) d'un solide jaune.

LC-MS: m/z 155 ($\text{M}-56+\text{H}^+$)

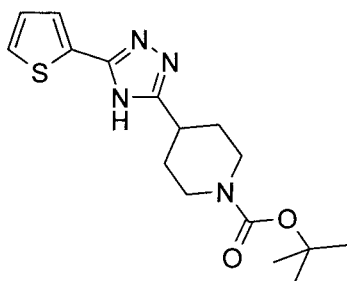
Tr = 5.04 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 3.36 (m, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.57 (m, 1H), 1.58 (m, 2H), 1.47 (m, 2H), 1.16 (m, 9H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 145.99, 116.16, 78.86, 44.81, 32.74, 32.61, 30.65

F: 48.2-49.5°C

4-(5-Thiophèn-2-yl-4H-[1,2,4]triazol-3-yl)-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle



L'Ester *t*-butylique de l'acide 4-Cyano-pipéridine-1-carboxylique (4.611 g, 1 équiv), le 2-thiophène hydrazide (3.118 g, 1 équiv) et le carbonate de potassium (3.032 g, 1 équiv) sont mélangés dans le *n*-butanol (50 mL). Le milieu réactionnel est porté à reflux (150°C) pendant 24 heures. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie flash sur silice (7:3 cyclohexane / acétate d'éthyle), puis par recristallisation dans l'acétate d'éthyle pour donner 2.206 g (30 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 279 (M-56+H⁺)

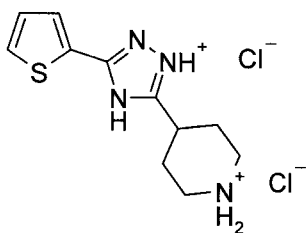
Tr = 5.17 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.60 (dd, J = 3.6 Hz J = 1.0 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 5.0 Hz J = 1.0 Hz, 1H), 7.04 (dd, J = 5.0 Hz J = 3.6 Hz, 1H), 4.09 (m, 2H), 2.93 (m, 1H), 2.77 (m, 2H), 1.96 (m, 2H), 1.73 (m, 2H), 1.44 (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 162.08, 154.83, 132.50, 127.85, 126.90, 126.59, 79.95, 43.69, 34.77, 30.29, 28.47

F: 191.9-192.3°C

Chlorhydrate de 4-(5-Thiophèn-2-yl-4H-[1,2,4]triazol-3-yl)-pipéridine



L'Ester *t*-butylique de l'acide 4-(5-Thiophèn-2-yl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl)-pipéridine-1-carboxylique (2.1 g, 1 équiv) est dissous dans l'éthanol absolu (15 mL), puis une solution d'HCl 4N dans le dioxane (15 mL, 10 équiv) est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 heures, puis filtré pour donner 1.572 g (81 %) d'une poudre blanche.

LC-MS: m/z 235 ($M+H^+$)

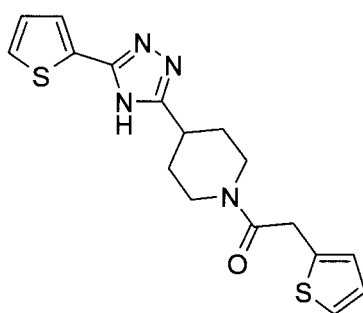
Tr = 2.48 min

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 12.52 (s, 2H), 9.39 (m, 1H), 9.14 (m, 1H), 7.80 (dd, $J = 3.6$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 5.0$ Hz $J = 3.6$ Hz, 1H), 3.29 (m, 2H), 3.20 (m, 1H), 3.02 (m, 2H), 2.19 (m, 2H), 2.02 (m, 2H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 160.67, 153.38, 131.27, 128.83, 128.58, 127.77, 42.64, 31.58, 26.91
F: 259.7-261.5°C

2-Thiophèn-2-yl-1-[4-(5-thiophèn-2-yl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone

L'acide 2-thiophène-acétique (166 mg, 3 équiv), l'EDCI (252 mg, 3 équiv) et la diisopropyléthylamine (368 μL , 6 équiv) sont mélangés dans du dichlorométhane (5 mL) préalablement séché sur MgSO_4 . Le milieu réactionnel est laissé cinq minutes sous agitation à température ambiante, puis le chlorhydrate de 4-(5-Thiophèn-2-yl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl)-pipéridinium (150 mg, 1 équiv) est ajouté. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 heures, puis évaporé. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (9:1 dichlorométhane/méthanol) pour donner 110 mg (72 %) d'une poudre jaune.



LC-MS: m/z 359 ($M+H^+$)

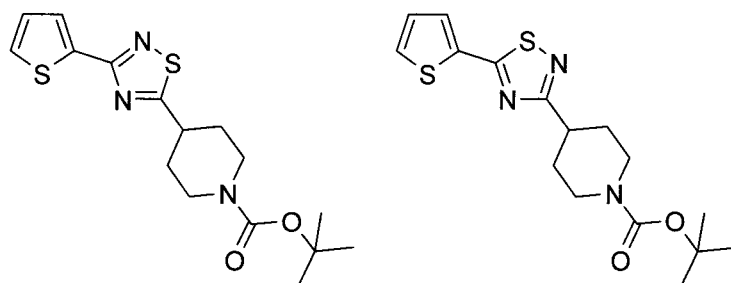
Tr = 4.45 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.58 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.01 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H), 6.84 (m, 2H), 4.52 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.75 (m, 1H), 1.98 (m, 2H), 1.71 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 160.67, 153.38, 131.27, 128.83, 128.58, 127.77, 42.64, 31.58, 26.91
F: 93.1-95.0°C

4.6 Synthèse des composés 1,2,4-thiadiazoles

4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]thiadiazol-5-yl)-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle ou 4-(5-Thiophène-2-yl-[1,2,4]thiadiazol-3-yl)-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle



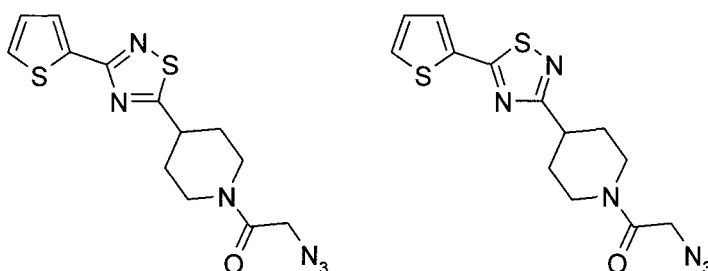
Le 4-Carbamoyl-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (122 mg, 1 équiv), le thiophène-2-thiocarboxamide (72 mg, 1 équiv) et l'iodobenzène diacétate (243 mg, 1.5 équiv) sont mélangés dans du dichlorométhane (5 mL) préalablement séché sur MgSO_4 . Le milieu réactionnel est laissé deux heures sous agitation à température ambiante, puis évaporé. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (98:2 cyclohexane/acétate d'éthyle) pour donner 136 mg (77 %) d'une huile jaune.

LC-MS: m/z 296 ($\text{M}-56+\text{H}^+$)

Tr = 7.52 min

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.65 (dd, $J = 3.9$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J = 4.9$ Hz $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J = 4.9$ Hz $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.16 (m, 2H), 3.17 (m, 1H), 2.92 (m, 2H), 2.12 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)

2-Azido-1-[4-(3-thiophène-2-yl-[1,2,4]thiadiazol-5-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone ou 2-Azido-1-[4-(5-thiophène-2-yl-[1,2,4]thiadiazol-3-yl)-pipéridin-1-yl]-éthanone



Le 4-(3-Thiophène-2-yl-[1,2,4]thiadiazol-5-yl)-pipéridine-1-carboxylate de *t*-butyle (102 mg, 1 équivalent) est dissous dans l'éthanol absolu, et une solution d'HCl 4N dans le dioxane (1 mL, 15 équivalent) est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 12 heures, puis évaporé pour donner l'intermédiaire chlorhydrate désiré. Du dichlorométhane (1 mL), de la triéthylamine (182 μ L, 6 équivalent) et du chlorure de chloroacétyle (17 μ L, 1 équivalent) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 12 heures, puis évaporé. Le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (30 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse de KHSO₄ 0.1N (trois fois 15 mL), puis par une solution de saumure (deux fois 15 mL), séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le résidu obtenu est dissous dans du diméthylformamide (5 mL), et de l'azote de sodium (65 mg, 5 équivalent) est ajouté. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 12 heures, puis évaporé. Le résidu obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (2 mL). La phase organique est alors filtrée, puis évaporée pour donner 3 mg (3 %) d'une poudre jaune.

LC-MS: m/z 335 ($M+H^+$)

Tr = 5.40 min

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.65 (dd, $J = 3.7$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.56 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.15 (dd, $J = 5.1$ Hz $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.55 (m, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.76 (m, 1H), 3.29 (m, 2H), 2.99 (m, 1H), 2.22 (m, 2H), 1.95 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 130.47, 129.85, 128.52, 50.83, 47.40, 46.50, 39.53, 30.80, 30.40

5 Etudes des caractéristiques physico-chimiques des composés

5.1 Détermination de la solubilité des composés

40 µL d'une solution 10 mM de composé dans le DMSO sont ajoutés à 1.960 mL de méthanol et à 1.960 mL de tampon PBS (50 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄ (7.4), 675 mM NaCl, 13.5 mM KCl). Les mélanges sont laissés sous agitation douce pendant 24 heures à température ambiante, puis centrifugés pendant cinq minutes et filtrés sur 0.45 µm. 20 µL de ces solutions sont alors prélevés et dilués dans 180 µL de méthanol, puis analysés par LCMS-MS par détection MRM ou SIM (ionisation par électrospray, Declustering potential : 50 V, collision-activated dissociation : 1.5 mTorr, énergie de collision : 20 eV). La solubilité est déterminée par l'établissement du ratio des signaux de masse PBS/méthanol.

5.2 Détermination du log D

40 µL d'une solution 10 mM de composé dans le DMSO sont ajoutés à 1.960 mL d'un mélange *n*-octanol/PBS (7.4) 1/1. Le mélange est laissé sous agitation douce pendant deux heures à température ambiante, puis centrifugé pendant cinq minutes. 20 µL de chaque phase sont alors prélevés et dilués dans 180 µL de méthanol, puis analysés par LCMS-MS par détection MRM ou SIM (ionisation par électrospray, Declustering potential : 50 V, collision-activated dissociation : 1.5 mTorr, énergie de collision : 20 eV). Le Log D est déterminé comme le logarithme du ratio des signaux de masse *n*-octanol/PBS.

5.3 Etudes des propriétés pharmacocinétiques des composés

5.3.1 Etudes de stabilité dans les fluides digestifs

40 µL d'une solution 5 mM de composé dans le méthanol sont ajoutés à 1.960 mL de milieu digestif SGF, FaSSIF ou FeSSIF. Le mélange est laissé sous agitation 24 heures à 37°C. Des aliquotes de 200 µL sont prélevées à différents moments entre 0 et 24 heures et diluées avec 200 µL d'acide phosphorique ou d'acétonitrile. Après centrifugation, 10 µL d'une solution d'étalon interne sont ajoutés. 100 µL du surnageant sont alors dilués avec 100 µL d'acétonitrile et analysés par LCMS-MS par détection MRM (ionisation par électrospray,

Declustering potential : 50 V, collision-activated dissociation : 1.5 mTorr, énergie de collision : 20 eV).

Composition des milieux digestifs :

SGF (Simulated Gastric Fluid) : 2 g Chlorure de sodium, 3.2 g pepsine, 7 mL d'acide chlorhydrique, eau purifiée qsp 1 L

FeSSIF (Fed State Simulated Intestinal Fluid): 15 mM Taurocholate de sodium, 3.75 mM Lécithine, 4.04 g soude, 8.65 g Acide acétique glacial, 11.874 g Chlorure de sodium, eau purifiée qsp 1 L

FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid): 6 mM Taurocholate de sodium, 1.5 mM Lécithine, 348 mg soude, 3.954 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6.186 g Chlorure de sodium, eau purifiée qsp 1 L

5.3.2 Etudes de stabilité plasmatique

40 μL d'une solution 5 mM de composé dans le DMSO sont ajoutés à 1.960 mL de plasma de rat (rat Zucker mâle, Laboratoires Charles River). Le mélange est laissé sous agitation 96 heures à 37°C. Des aliquotes de 200 μL sont prélevées à différents moments entre 0 et 96 heures et diluées avec 200 μL d'acide phosphorique (0.14 M). 10 μL d'une solution 2 mM d'étalon interne sont ajoutés et les composés sont extraits à l'acétate d'éthyle (trois fois 2 mL). La phase organique est évaporée, reprise dans 200 μL de méthanol et quantifiée par LCMS-MS par détection MRM (ionisation par électrospray, Declustering potential : 50 V, collision-activated dissociation : 1.5 mTorr, énergie de collision : 20 eV).

5.3.3 Etudes de stabilité microsomale

150 μL d'une solution 100 μM de composé dans le méthanol sont ajoutés à 1.350 mL de milieu contenant 0.5 mg/mL de microsomes hépatiques de souris mâle, 5 mM de MgCl_2 , 1 mM de NADP, 5 mM de glucose-6-phosphate, 0.4 U/mL de glucose-6-phosphate déshydrogénase et 100 mM de K_2HPO_4 (7.4). Le mélange est laissé sous agitation à 37°C. Des prélèvements sont réalisés à 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 minutes, dilués au demi dans une solution d'acétonitrile glacé contenant 1 μM d'étalon interne, centrifugés à 4000 g pendant 10 minutes à 4°C et analysés par LCMS-MS (ionisation par électrospray, Declustering potential : 50 V, collision-activated dissociation : 1.5 mTorr, énergie de collision : 20 eV).

Pour chaque point de la cinétique, les ratios (composé/étalon interne) des aires mesurées dans les aliquotes sont exprimés en pourcentage du ratio (composé/étalon interne) des aires mesurées dans le contrôle T_0 . La clairance et le $T_{1/2}$ sont calculés selon les formules suivantes :

$Cl_{int} = \text{Dose}/AUC$, exprimée en $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$

$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/kz$

$T_{1/2} = 0.693/kz$, exprimé en minutes

Bibliographie

1. Pr Marquette et Pr Lafitte. Année universitaire 2004-2005
2. Daniel, M. Thomas *Captain of death : the story of tuberculosis*
3. Antoine, D.; Che, D. *Medecine et Maladies Infectieuses* **2007**, *37*, 245-52.
4. Report of the meeting of the WHO global task force on XDR-TB October 2006
5. Woese, C. R. *Microbiol Rev* **1987**, *51*, 221-71.
6. Fu, L. M.; Fu-Liu, C. S. *Tuberculosis* **2002**, *82*, 85-90.
7. Kremer, L. B.; Besra, G. S.; Brennan, P. J.; Baulard, A.R. *medecine/sciences* **1999**, *15*, 842-850.
8. Faller, M.; Niederweis, M.; Schulz, G. E. *Science* **2004**, *303*, 1189-92.
9. Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. *Clin Microbiol Rev* **2005**, *18*, 81-101.
10. Smith, S.; Witkowski, A.; Joshi, A. K. *Progress in Lipid Research* **2003**, *42*, 289-317.
11. Choi, K.-H.; Kremer, L.; Besra, G. S.; Rock, C. O. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28201-7.
12. Scarsdale, J. N.; Kazanina, G.; He, X.; Reynolds, K. A.; Wright, H. T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20516-22.
13. Kremer, L.; Dover, L. G.; Carrere, S.; Nampoothiri, K. M.; Lesjean, S.; Brown, A. K.; Brennan, P. J.; Minnikin, D. E.; Loch, C.; Besra, G. S. *Biochem J* **2002**, *364*, 423-30.
14. Marrakchi, H.; Laneelle, G.; Quemard, A. *Microbiology* **2000**, *146*, 289-296.
15. Yuan, Y.; Crane, D. C.; Musser, J. M.; Sreevatsan, S.; Barry, C. E., 3rd *J Biol Chem* **1997**, *272*, 10041-9.
16. Dubnau, E.; Chan, J.; Raynaud, C.; Mohan, V. P.; Laneelle, M. A.; Yu, K.; Quemard, A.; Smith, I.; Daffe, M. *Mol Microbiol* **2000**, *36*, 630-7.
17. Dinadayala, P.; Laval, F.; Raynaud, C.; Lemassu, A.; Laneelle, M. A.; Laneelle, G.; Daffe, M. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 7310-9.
18. Yuan, Y.; Barry, C. E., 3rd *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 12828-33.
19. Glickman, M. S.; Cahill, S. M.; Jacobs, W. R., Jr. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 2228-33.
20. Glickman, M. S. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 7844-9.
21. Portevin, D.; De Sousa-D'Auria, C.; Houssin, C.; Grimaldi, C.; Chami, M.; Daffe, M.; Guilhot, C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 314-9.
22. Sathyamoorthy, N.; Takayama, K. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 13417-23.
23. Shimakata, T.; Minatogawa, Y. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, *380*, 331-8.
24. Belisle, J. T.; Vissa, V. D.; Sievert, T.; Takayama, K.; Brennan, P. J.; Besra, G. S. *Science* **1997**, *276*, 1420-2.
25. Puech, V.; Bayan, N.; Salim, K.; Leblon, G.; Daffe, M. *Mol Microbiol* **2000**, *35*, 1026-41.
26. Puech, V.; Guilhot, C.; Perez, E.; Tropis, M.; Armitige, L. Y.; Gicquel, B.; Daffe, M. *Mol Microbiol* **2002**, *44*, 1109-22.
27. Ronning, D. R.; Klabunde, T.; Besra, G. S.; Vissa, V. D.; Belisle, J. T.; Sacchettini, J. C. *Nat Struct Biol* **2000**, *7*, 141-6.
28. Bernstein, J.; Lott, W. A.; Steinberg, B. A.; Yale, H. L. *Am Rev Tuberc* **1952**, *65*, 357-64.
29. Timmins, G. S.; Deretic, V. *Mol Microbiol* **2006**, *62*, 1220-7.
30. Winder, F. G.; Collins, P. B. *J Gen Microbiol* **1970**, *63*, 41-8.
31. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. *Nature* **1992**, *358*, 591-3.
32. Heym, B.; Alzari, P. M.; Honore, N.; Cole, S. T. *Mol Microbiol* **1995**, *15*, 235-45.
33. Bertrand, T.; Eady, N. A.; Jones, J. N.; Jesmin; Nagy, J. M.; Jamart-Gregoire, B.; Raven, E. L.; Brown, K. A. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 38991-9.
34. Slayden, R. A.; Barry, r. C. E. *Microbes and Infection* **2000**, *2*, 659-69.
35. Johnsson, K.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7425-6.
36. Johnsson, K.; King, D. S.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5009-10.
37. Sipe, H. J.; Jaszewski, A. R.; Mason, R. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 226-33.
38. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W. R., Jr. *Science* **1994**, *263*, 227-30.
39. Rozwarski, D. A.; Vilcheze, C.; Sugantino, M.; Bittman, R.; Sacchettini, J. C. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 15582-9.
40. Nguyen, N.; Claparols, C.; Bernadou, J.; Meunier, B. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 877-83.
41. Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 13881-6.
42. Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H.; Jacobs, W. R., Jr.; Sacchettini, J. C. *Science* **1998**, *279*, 98-102.
43. Argyrou, A.; Vetting, M. W.; Aladegbami, B.; Blanchard, J. S. *Nat Struct Mol Biol* **2006**, *13*, 408-13.
44. Argyrou, A.; Jin, L.; Siconilfi-Baez, L.; Angeletti, R. H.; Blanchard, J. S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 13947-53.
45. Bardou, F.; Raynaud, C.; Ramos, C.; Laneelle, M. A.; Laneelle, G. *Microbiology* **1998**, *144* (Pt 9), 2539-44.

46. Upton, A. M.; Mushtaq, A.; Victor, T. C.; Sampson, S. L.; Sandy, J.; Smith, D. M.; van Helden, P. V.; Sim, E. *Mol Microbiol* **2001**, *42*, 309-17.
47. Hearn, M. J.; Cynamon, M. H. *J Antimicrob Chemother* **2004**, *53*, 185-9 McClure, W. R.; Cech, C. L. *J Biol Chem* **1978**, *253*, 8949-56.
48. McClure, W. R.; Cech, C. L. *J Biol Chem* **1978**, *253*, 8949-56.
49. Chorine V. *Comp Rend Acad Sci (Paris)* **1945**, *220*, 150-1.
50. Kushner, S.; Dalalian, H.; Sanjurjo, J. L.; Bach, F. L.; Safir, S. R.; Smith, V. K.; Williams, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3617-21.
51. Zhang, Y.; Mitchison, D. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003**, *7*, 6-21.
52. Fox, H. H. *Science* **1952**, *116*, 129-34.
53. Rist, N.; Grumbach, F.; Libermann, D. *Am Rev Tuberc* **1959**, *79*, 1-5.
54. Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z. *J Antimicrob Chemother* **2003**, *52*, 790-5.
55. Kaim, G.; Dimroth, P. *FEBS Letters* **1998**, *434*, 57-60.
56. Zimhony, O.; Vilcheze, C.; Arai, M.; Welch, J. T.; Jacobs, W. R., Jr. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, 752-4.
57. Belanger, A. E.; Besra, G. S.; Ford, M. E.; Mikusova, K.; Belisle, J. T.; Brennan, P. J.; Inamine, J. M. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, *93*, 11919-24.
58. Lety, M. A.; Nair, S.; Berche, P.; Escuyer, V. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, *41*, 2629-33.
59. Sharma, K.; Gupta, M.; Pathak, M.; Gupta, N.; Koul, A.; Sarangi, S.; Baweja, R.; Singh, Y. *J Bacteriol* **2006**, *188*, 2936-44.
60. Aubry, A.; Pan, X. S.; Fisher, L. M.; Jarlier, V.; Cambau, E. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, *48*, 1281-8.
61. Takiff, H. E.; Salazar, L.; Guerrero, C.; Philipp, W.; Huang, W. M.; Kreiswirth, B.; Cole, S. T.; Jacobs, W. R., Jr.; Telenti, A. *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, *38*, 773-80.
62. Leshner, G. Y.; Froelich, E. J.; Gruett, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R. P. *J Med Pharm Chem* **1962**, *91*, 1063-5.
63. Koga, H.; Itoh, A.; Murayama, S.; Suzue, S.; Irikura, T. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 1358-63.
64. Sato, K.; Matsuura, Y.; Inoue, M.; Une, T.; Osada, Y.; Ogawa, H.; Mitsushashi, S. *Antimicrob Agents Chemother* **1982**, *22*, 548-53.
65. Mitscher, L. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 559-92.
66. Maher, D. Chaullet, P, Spinaci, S, Harries, A. *Le traitement de la tuberculose. Principes à l'attention des programmes nationaux WHO* **1997**
67. Pletz, M. W.; De Roux, A.; Roth, A.; Neumann, K. H.; Mauch, H.; Lode, H. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, *48*, 780-2.
68. Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, *407*, 340-8.
69. Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Shinnick, T. M. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49*, 3192-7.
70. Sreevatsan, S.; Pan, X.; Stockbauer, K. E.; Williams, D. L.; Kreiswirth, B. N.; Musser, J. M. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**, *40*, 1024-6.
71. Mukherjee, J. S.; Rich, M. L.; Socci, A. R.; Joseph, J. K.; Viru, F. A.; Shin, S. S.; Furin, J. J.; Becerra, M. C.; Barry, D. J.; Kim, J. Y.; Bayona, J.; Farmer, P.; Fawzi, M. C. S.; Seung, K. J. *The Lancet* **2004**, *363*, 474-81.
72. Caceres, N. E.; Harris, N. B.; Wellehan, J. F.; Feng, Z.; Kapur, V.; Barletta, R. G. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5046-55.
73. Feng, Z.; Barletta, R. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 283-91.
74. LeMagueres, P.; Im, H.; Ebalunode, J.; Strych, U.; Benedik, M. J.; Briggs, J. M.; Kohn, H.; Krause, K. L. *Biochemistry* **2005**, *44*, 1471-81.
75. Lehmann, J. *The Lancet* **1946**, *247*, 15-6.
76. Nopponpunth, V.; Sirawaraporn, W.; Greene, P. J.; Santi, D. V. *J Bacteriol* **1999**, *181*, 6814-21.
77. Rengarajan, J.; Sasseti, C. M.; Naroditskaya, V.; Sloutsky, A.; Bloom, B. R.; Rubin, E. J. *Molecular Microbiology* **2004**, *53*, 275-82.
78. Adilakshmi, T.; Ayling, P. D.; Ratledge, C. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 264-71.
79. Ratledge, C. *Tuberculosis* **2004**, *84*, 110-30.
80. Vannelli, T. A.; Dykman, A.; Ortiz de Montellano, P. R. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 12824-9.
81. Fraaije, M. W.; Kamerbeek, N. M.; Heidekamp, A. J.; Fortin, R.; Janssen, D. B. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 3354-60.
82. Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R., Jr.; Sacchettini, J. C. *J Exp Med* **2007**, *204*, 73-8.
83. Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R. A.; Brennan, P. J.; Loch, C.; Besra, G. S. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 28326-31.

84. DeBarber, A. E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L. G.; Barry, C. E., 3rd *Proc Natl Acad Sci US A* **2000**, *97*, 9677-82.
85. Qian, L.; OrtizdeMontellano, P. R. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 443-9.
86. Phetsuksiri, B.; Jackson, M.; Scherman, H.; McNeil, M.; Besra, G. S.; Baulard, A. R.; Slayden, R. A.; DeBarber, A. E.; Barry, C. E., 3rd; Baird, M. S.; Crick, D. C.; Brennan, P. J. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 53123-30.
87. Jeffcoat, R.; Pollard, M. R. *Lipids* **1977**, *12*, 480-5.
88. Bhowruth, V.; Brown, A. K.; Reynolds, R. C.; Coxon, G. D.; Mackay, S. P.; Minnikin, D. E.; Besra, G. S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 4743-7.
89. Glickman, S. W.; Rasiel, E. B.; Hamilton, C. D.; Kubataev, A.; Schulman, K. A. *Science* **2006**, *311*, 1246-7.
90. Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Gohlmann, H. W.; Neefs, J. M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; Williams, P.; de Chaffoy, D.; Huitric, E.; Hoffner, S.; Cambau, E.; Truffot-Pernot, C.; Lounis, N.; Jarlier, V. *Science* **2005**, *307*, 223-7.
91. Koul, A.; Dendouga, N.; Vergauwen, K.; Molenberghs, B.; Vranckx, L.; Willebrords, R.; Ristic, Z.; Lill, H.; Dorange, I.; Guillemont, J.; Bald, D.; Andries, K. *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 323-4.
92. Manjunatha, U. H.; Boshoff, H.; Dowd, C. S.; Zhang, L.; Albert, T. J.; Norton, J. E.; Daniels, L.; Dick, T.; Pang, S. S.; Barry, C. E., 3rd *Proc Natl Acad Sci US A* **2006**, *103*, 431-6.
93. Manjunatha, U. H.; Lahiri, R.; Randhawa, B.; Dowd, C. S.; Krahenbuhl, J. L.; Barry, C. E., 3rd *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50*, 3350-4.
94. Potkar, C.; Gogtay, N.; Gokhale, P.; Kshirsagar, N. A.; Ajay, S.; Cooverji, N. D.; Bruzzese, T. *Chemotherapy* **1999**, *45*, 147-53.
95. Jia, L.; Coward, L.; Gorman, G. S.; Noker, P. E.; Tomaszewski, J. E. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, *315*, 905-11.
96. Chen, P.; Gearhart, J.; Protopopova, M.; Einck, L.; Nacy, C. A. *J Antimicrob Chemother* **2006**, *58*, 332-7.
97. Nikonenko, B. V.; Protopopova, M.; Samala, R.; Einck, L.; Nacy, C. A. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, 1563-5.
98. Jones, P. B.; Parrish, N. M.; Houston, T. A.; Stapon, A.; Bansal, N. P.; Dick, J. D.; Townsend, C. A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3304-14.
99. Parrish, N. M.; Houston, T.; Jones, P. B.; Townsend, C.; Dick, J. D. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45*, 1143-50.
100. Parrish, N. M.; Ko, C. G.; Hughes, M. A.; Townsend, C. A.; Dick, J. D. *J Antimicrob Chemother* **2004**, *54*, 722-9.
101. Colca, J. R.; McDonald, W. G.; Waldon, D. J.; Thomasco, L. M.; Gadwood, R. C.; Lund, E. T.; Cavey, G. S.; Mathews, W. R.; Adams, L. D.; Cecil, E. T.; Pearson, J. D.; Bock, J. H.; Mott, J. E.; Shinabarger, D. L.; Xiong, L.; Mankin, A. S. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 21972-9.
102. Erturan, Z.; Uzun, M. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2005**, *26*, 78-80.
103. Fortun, J.; Martin-Davila, P.; Navas, E.; Perez-Elias, M. J.; Cobo, J.; Tato, M.; De la Pedrosa, E. G.; Gomez-Mampaso, E.; Moreno, S. *J Antimicrob Chemother* **2005**, *56*, 180-5.
104. Von der Lippe, B.; Sandven, P.; Brubakk, O. *Journal of Infection* **2006**, *52*, 92-6.
105. Das, B.; Rudra, S.; Yadav, A.; Ray, A.; Rao, A. V. S. R.; Srinivas, A. S. S. V.; Soni, A.; Saini, S.; Shukla, S.; Pandya, M.; Bhateja, P.; Malhotra, S.; Mathur, T.; Arora, S. K.; Rattan, A.; Mehta, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 4261-7.
106. Frenois, F.; Engohang-Ndong, J.; Loch, C.; Baulard, A. R.; Villeret, V. *Molecular Cell* **2004**, *16*, 301-7.
107. Morlock, G. P.; Metchock, B.; Sikes, D.; Crawford, J. T.; Cooksey, R. C. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, *47*, 3799-805.
108. Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. *Nature* **1998**, *393*, 537-44.
109. Hanouille, X.; Wieruszkeski, J.-M.; Rousselot-Pailley, P.; Landrieu, I.; Baulard, A. R.; Lippens, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *331*, 452-8.
110. Hanouille, X.; Wieruszkeski, J. M.; Rousselot-Pailley, P.; Landrieu, I.; Loch, C.; Lippens, G.; Baulard, A. R. *J Antimicrob Chemother* **2006**, *58*, 768-72.
111. Aramaki, H.; Yagi, N.; Suzuki, M. *Protein Eng* **1995**, *8*, 1259-66.
112. Grkovic, S.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *Semin Cell Dev Biol* **2001**, *12*, 225-37.
113. Ramos, J. L.; Martinez-Bueno, M.; Molina-Henares, A. J.; Teran, W.; Watanabe, K.; Zhang, X.; Gallegos, M. T.; Brennan, R.; Tobes, R. *Microbiol Mol Biol Rev* **2005**, *69*, 326-56.
114. Hillen, W.; Berens, C. *Annu Rev Microbiol* **1994**, *48*, 345-69.

- 115.Orth, P.; Cordes, F.; Schnappinger, D.; Hillen, W.; Saenger, W.; Hinrichs, W. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *279*, 439-47.
- 116.Orth, P.; Schnappinger, D.; Hillen, W.; Saenger, W.; Hinrichs, W. *Nat Struct Biol* **2000**, *7*, 215-9.
- 117.Hinrichs, W.; Kisker, C.; Duvel, M.; Muller, A.; Tovar, K.; Hillen, W.; Saenger, W. *Science* **1994**, *264*, 418-20.
- 118.Orth, P.; Saenger, W.; Hinrichs, W. *Biochemistry* **1999**, *38*, 191-8.
- 119.Kamionka, A.; Majewski, M.; Roth, K.; Bertram, R.; Kraft, C.; Hillen, W. *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 3834-41
- 120.Mitchell, B. A.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, *42*, 475-7.
- 121.Mitchell, B. A.; Paulsen, I. T.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 3541-8.
- 122.Paulsen, I. T.; Brown, M. H.; Littlejohn, T. G.; Mitchell, B. A.; Skurray, R. A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 3630-5.
- 123.Paulsen, I. T.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *Microbiol Rev* **1996**, *60*, 575-608.
- 124.Grkovic, S.; Brown, M. H.; Schumacher, M. A.; Brennan, R. G.; Skurray, R. A. *J Bacteriol* **2001**, *183*, 7102-9.
- 125.Schumacher, M. A.; Brennan, R. G. *Molecular Microbiology* **2002**, *45*, 885-93.
- 126.Schumacher, M. A.; Miller, M. C.; Grkovic, S.; Brown, M. H.; Skurray, R. A.; Brennan, R. G. *Embo J* **2002**, *21*, 1210-8.
- 127.Grkovic, S.; Brown, M. H.; Roberts, N. J.; Paulsen, I. T.; Skurray, R. A. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 18665-73.
- 128.Schumacher, M. A.; Miller, M. C.; Grkovic, S.; Brown, M. H.; Skurray, R. A.; Brennan, R. G. *Science* **2001**, *294*, 2158-63.
- 129.Grkovic, S.; Hardie, K. M.; Brown, M. H.; Skurray, R. A. *Biochemistry* **2003**, *42*, 15226-36.
- 130.Murray, D. S.; Schumacher, M. A.; Brennan, R. G. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 14365-71.
- 131.Dover, L. G.; Corsino, P. E.; Daniels, I. R.; Cocklin, S. L.; Tatituri, V.; Besra, G. S.; Futterer, K. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *340*, 1095-1105.
- 132.Frenois, F.; Baulard, A. R.; Villeret, V. *Tuberculosis* **2006**, *86*, 110-4.
- 133.Engohang-Ndong, J.; Baillat, D.; Aumercier, M.; Bellefontaine, F.; Besra, G. S.; Loch, C.; Baulard, A. R. *Molecular Microbiology* **2004**, *51*, 175-88.
- 134.Diana, G. D.; Volkots, D. L.; Nitz, T. J.; Bailey, T. R.; Long, M. A.; Vescio, N.; Aldous, S.; Pevear, D. C.; Dutko, F. J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2421-36.
- 135.Borg, S.; Vollinga, R. C.; Labarre, M.; Payza, K.; Terenius, L.; Luthman, K. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4331-42.
- 136.Jagerovic, N.; Hernandez-Folgado, L.; Alkorta, I.; Goya, P.; Navarro, M.; Serrano, A.; RodriguezdeFonseca, F.; Dannert, M. T.; Alsasua, A.; Suardiaz, M.; Pascual, D.; Martin, M. I. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2939-42.
- 137.Carroll, W. A.; Kalvin, D. M.; Perez Medrano, A.; Florjancic, A. S.; Wang, Y.; Donnelly-Roberts, D. L.; Namovic, M. T.; Grayson, G.; Honore, P.; Jarvis, M. F. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 4044-8.
- 138.Baindur, N.; Chadha, N.; Brandt, B. M.; Asgari, D.; Patch, R. J.; Schalk-HiHi, C.; Carver, T. E.; Petrounia, I. P.; Baumann, C. A.; Ott, H.; Manthey, C.; Springer, B. A.; Player, M. R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1717-20.
- 139.Butera, J. A.; Antane, M. M.; Antane, S. A.; Argentieri, T. M.; Freeden, C.; Graceffa, R. F.; Hirth, B. H.; Jenkins, D.; Lennox, J. R.; Matelan, E.; Norton, N. W.; Quagliato, D.; Sheldon, J. H.; Spinelli, W.; Warga, D.; Wojdan, A.; Woods, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1187-202.
- 140.Gilbert, A. M.; Antane, M. M.; Argentieri, T. M.; Butera, J. A.; Francisco, G. D.; Freeden, C.; Gundersen, E. G.; Graceffa, R. F.; Herbst, D.; Hirth, B. H.; Lennox, J. R.; McFarlane, G.; Norton, N. W.; Quagliato, D.; Sheldon, J. H.; Warga, D.; Wojdan, A.; Woods, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1203-14.
- 141.Poulain, R. F.; Tartar, A. L.; Deprez, B. P. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 1495-8.
- 142.Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; and Feeney, P. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- 143.Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, K. Barry Sharpless. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-21.
- 144.Huisgen, *Proceedings of the Chemical Society* **1961**, 357-96.
- 145.Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Manimaran, T. L. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3619-20.
- 146.Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Adhya, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5302-8.
- 147.Vsevolod V. Rostovtsev, Luke G. Green, Valery V. Fokin, K. Barry Sharpless. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-99.
- 148.Christoph Nolte, Peter Mayer, Bernd F. Straub. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 2101-3.
- 149.Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-9.
- 150.Warren G. Lewis, Luke G. Green, Flavio Grynszpan, Zoran Radic, Paul R. Carlier, Palmer Taylor, M. G. Finn, K. Barry Sharpless. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1053-7.

151. Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radic, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809-18.
152. Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**, *101*, 1449-54.
153. Krasinski, A.; Radic, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686-92.
154. Vani P. Mocharla, B. C., Lac V. Lee, Stefanie Röper, K. Barry Sharpless, Chi-Huey Wong, Hartmuth C. Kolb *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 116-20.
155. Matthew Whiting, J. M., Ying-Chuan Lin, Steven M. Silverman, William Lindstrom, Arthur J. Olson, Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, K. Barry Sharpless, John H. Elder, Valery V. Fokin *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1435-9.
156. Mansuy, D.; Valadon, P.; Erdelmeier, I.; Lopez-Garcia, P.; Amar, C.; Girault, J. P.; Dansette, P. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7825-6.
157. Valadon, P.; Dansette, P. M.; Girault, J. P.; Amar, C.; Mansuy, D. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1403-13
158. Treiber, A.; Dansette, P. M.; El Amri, H.; Girault, J. P.; Ginderow, D.; Mornon, J. P.; Mansuy, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1565-71.
159. Handlon, A. L.; Oppenheimer, N. J. *Pharm Res* **1988**, *5*, 297-9.
160. Nicholls, D.; Gescher, A.; Griffin, R. J. *Xenobiotica* **1991**, *21*, 935-43.
161. Reardon, J. E.; Crouch, R. C.; St John-Williams, L. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 23, 15999-6008.
162. Yeung, K.-S.; Farkas, M. E.; Kadow, J. F.; Meanwell, N. A. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 3429-32.
163. Willand, N.; Joossens, J.; Gesquiere, J.-C.; Tartar, A. L.; Evans, D. M.; Roe, M. B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5741-6.
164. Nassar, A.-E. F.; Kamel, A. M.; Clarimont, C. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 1020-8.

