



HAL
open science

**LUTTE CONTRE LES PATHOGENES
MULTIRESISTANTS : DEVELOPPEMENT DE
COMPOSES ANTIBACTERIENS et/ou
ANTIFONGIQUES**

Muriel Billamboz

► **To cite this version:**

Muriel Billamboz. LUTTE CONTRE LES PATHOGENES MULTIRESISTANTS : DEVELOPPEMENT DE COMPOSES ANTIBACTERIENS et/ou ANTIFONGIQUES. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lille, 2018. tel-04495123

HAL Id: tel-04495123

<https://hal.science/tel-04495123v1>

Submitted on 13 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE LILLE NORD DE France
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES DE L'UNIVERSITE DE LILLE
SECTION 86 : Sciences du médicament et des autres produits de santé
SECTION 32 : Chimie organique, minérale, industrielle

LUTTE CONTRE LES PATHOGENES MULTIRESISTANTS :
DEVELOPPEMENT DE COMPOSES
ANTIBACTERIENS et/ou ANTIFONGIQUES

Présentée par :

Muriel BILLAMBOZ

(Enseignant-Chercheur HEI, rattaché au LIRIC - UMR 995 Inserm / Université de Lille 2 / CHRU de Lille)



SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	2
REMERCIEMENTS	Erreur ! Signet non défini.
PREAMBULE.....	6
ACTIVITES DE RECHERCHE 2005-2016	8
« DU CONCEPT AU DEVELOPPEMENT DU PROCEDE »	8
I. Chimie pharmaceutique (B1, P1, P2, P3, P4, P6, P7, P14 et expériences industrielles).....	9
1. Travaux de doctorat	9
a. Concept et postulat	9
b. Synthèses variées et relations structures activités	10
i. P1- Monosubstitution en position 7	11
ii. P3- Alkylation en position 4	13
iii. P7- Intégration d'une fonction carboxamide en position 4	14
c. Evaluation des propriétés de complexation (validation du postulat)	18
i. P1- Preuve de concept.....	18
ii. Choix d'un candidat médicament et travaux futurs.....	20
iii. P10- Etude du mécanisme d'action et ADME Tox.....	20
2. Passage de la recherche à la production : développement de procédés (ORIL Industrie et ROOWIN SA)	22
a. En tant qu'Ingénieur Recherche en développement	22
i. Objectifs, contraintes et stratégie adoptée	22
i. Alkylation sélective.....	23
ii. Transformation diastéréosélective de la cétone en thiol	23
b. En tant que Responsable Laboratoire R&D.....	24
II. Chimie durable : synthèse et développement d'une molécule plateforme biosourcée.....	26
1. Cahier des charges et identification des points clés	26
2. Mise au point de l'étape de double déshydratation.....	27
a. Milieu solvant	27
b. Milieu sans solvant	28
3. Résultats autour de la réaction de couplage pinacolique	28
a. Objectifs : Economies d'énergie.....	29
b. Objectifs : développer la recyclabilité	30
c. Objectifs : synthèse micellaire.....	30
d. Développement en flux continu	31

4.	Développement d'un protocole en one-pot-two steps [P16 ; B2]	33
5.	Travaux en cours/Perspectives.....	33
6.	Quelles utilisations pour le DVG ?	34
III.	Travaux réalisés et en cours depuis septembre 2016	36
1.	Projet BIOANTIBIO : Peinture et vernis antibactériens/antifongiques	36
2.	Projet AMPHIBIOSTIM : amphiphiles biosourcés en tant que stimulateurs de défense des plantes.....	37
IV.	Analyse critique de mes activités de recherche :	38
	ACTIVITES DE RECHERCHE 2016-FUTUR	40
	« LUTTE CONTRE LES PATHOGENES MULTIRESISTANTS :	40
	DEVELOPPEMENT DE COMPOSES ANTIBACTERIENS et/ou ANTIFONGIQUES »	40
I.	Projet de recherche BIFUN - Servir la plante sans desservir l'homme : développement de fongicides biosourcés sans impact sur l'environnement	41
	Problématique.....	41
	Notre approche.....	43
II.	Projet de recherche – Développement de composés mixtes antibactériens/antifongiques.....	47
	Problématique.....	47
1.	Constat d'urgence	47
2.	Quelles bactéries ?	48
3.	Décisions et avancées :	48
4.	Mais ces bactéries sont-elles notre seul souci ?	49
	Bactéries versus Champignons	51
	Les Antibactériens existants	52
1.	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	52
a.	Les β -lactamines:.....	52
b.	Glycopeptides.....	53
c.	Fosfomycine	53
2.	Interaction avec l'ADN.....	54
a.	Sulfamides et 2,4-diaminopyridines.....	54
b.	Nitrofuranes	55
c.	5-nitroimidazolés.....	56
d.	Quinolones	56
3.	L'ARN et la synthèse protéique	58
a.	Oxazolidinones	58

b.	Rifampicine.....	58
c.	Cyclines.....	59
d.	Aminosides.....	59
e.	Macrolides.....	60
f.	Phénicolés.....	60
g.	Acide fusidique.....	61
h.	Polymyxines B et colistine.....	61
4.	La résistance aux antibiotiques.....	62
<i>Les Antifongiques existants.....</i>		63
1.	La famille des azolés.....	64
2.	La famille des polyènes.....	65
3.	La famille des échinocandines.....	66
4.	La famille des pyrimidines.....	67
5.	La famille des allylamines.....	67
<i>Acinetobacter Baumannii.....</i>		69
1.	Fiche d'identité.....	69
2.	Pathogénicité.....	69
3.	Problématique de la résistance.....	70
a.	Résistance naturelle.....	70
b.	Résistance acquise.....	70
i.	Résistance acquises aux β -lactamines.....	70
ii.	Résistance acquise aux aminosides.....	71
iii.	Résistance acquise aux fluoroquinolones.....	72
iv.	Résistance acquise aux autres antibiotiques.....	72
4.	Que tester dans ce cas ?.....	72
<i>Candida Albicans.....</i>		73
1.	Infections fongiques invasives.....	73
2.	Mycobiotte.....	73
3.	Candida albicans.....	74
4.	Les facteurs de risque.....	75
5.	Traitement et résistances.....	76
a.	Effets synergiques :.....	76
i.	<i>Candida</i> et <i>Staphylococcus</i>	76
ii.	<i>Candida albicans</i> et <i>Escherichia coli</i>	78
b.	Effets antagonistes.....	78

i. <i>Candida albicans</i> et <i>Acinetobacter baumannii</i>	78
ii. <i>Candida albicans</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
Notre Approche.....	79
AXE 1 : MODULATION CHIMIQUE – ETABLISSEMENT DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE	83
1. Axe 1.1. Modulation de la position 2	83
2. Axe 1.2. Modification des liaisons H - Introduction du groupement R ₃	85
a. Introduction d'un groupement aryle ou hétéroaryle.....	85
b. Introduction d'un groupement benzyle	85
c. Introduction d'un groupement acyle	86
3. Axe 1.3. Modification du groupement R ₁	86
4. Axe 1.4. Capitalisation des connaissances en R ₁ , R ₂ , R ₃	88
5. Axe 1.5. Introduction d'un hétéroatome en position 3 – Groupe Y.....	88
6. Axe 1.6. Modification du cycle	89
7. Axe 1.7. Rigidification du système.....	89
AXE 2 : EVALUATION DE L'ACTIVITE SUR <i>CANDIDA ALBICANS</i>.....	90
1. Partie 1 : Modèles <i>in vitro</i>	90
a. Screening d'action directe de molécules dans un modèle de bioluminescence	90
b. Mesure des CMI des composés.....	91
c. Effet des molécules antifongiques sectionnées sur les souches cliniques résistantes aux antifongiques.....	92
d. Etude préliminaire du mode d'action par cytométrie en flux et microscopie confocale	92
e. Effet des molécules antifongiques sélectionnées sur la perméabilité des cellules intestinales Caco-2.....	93
2. Partie 2 : tests <i>in vivo</i>	94
AXE 3 : EVALUATION DE L'ACTIVITE SUR <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>.....	94
1. Evaluation <i>in vitro</i>	94
2. Validation et mode d'action.....	94
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	95
ACTIVITES D'ENCADREMENT.....	98
LISTE DES PUBLICATIONS	102
ANNEXES.....	108
REFERENCES.....	112
PUBLICATIONS SELECTIONNEES	107

PREAMBULE

Ce mémoire regroupe les différentes phases de mon travail de recherche des dix dernières années, dont le fil conducteur est l'interdisciplinarité. Chacune de mes expériences professionnelles, aussi riche et variée qu'elle fut, s'est toujours située à une interface. Interface entre la chimie organique, la modélisation moléculaire et la biologie durant mes travaux de doctorat ; interface entre la recherche et le développement de procédés lors de mon premier emploi industriel ; interface entre les techniciens R&D et les clients en tant que responsable laboratoire ; interface entre les matériaux, les technologies et les principes de chimie verte durant mon poste à l'ESCOM (Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale)...

Je me présente aujourd'hui en tant qu'enseignant chercheur à HEI (Ecole des Hautes Etudes d'Ingénieur), un établissement d'Yncréa Hauts de France et là encore, mes activités de recherche m'amènent à la croisée des disciplines : chimie organique évidemment, mais également activités biologiques variées, protection des plantes ou formulation des matériaux. Dans le mémoire qui suit, je vais donc m'attacher à présenter le déroulement de mon parcours, dont chacune des expériences sert de base à mes projets de recherche à court et plus long terme.

Présentation succincte de mon parcours scientifique

Mon parcours de recherche a commencé en 2004 lors d'un projet de chimie organique de 4^{ème} année d'ingénieur au sein de l'ENSCL. Mes camarades et moi-même avons choisi de travailler avec le professeur Cotelle sur la synthèse de molécules hétérocycliques à visée antivirale. Le sujet était passionnant et, suite à ce premier contact, tout s'est enchaîné logiquement. J'ai ensuite effectué mon Master 2 Recherche au sein de l'équipe du professeur Cotelle et nous avons monté un dossier de bourse docteur ingénieur CNRS/Région qui a été sélectionné. Les trois années suivantes m'ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances en chimie organique, pharmaceutique (*via* l'obtention du Mastère Drug Design), en chimie analytique et en physico-chimie. J'ai eu l'opportunité de collaborer à l'international avec des biologiques et des modélisateurs moléculaires. Les résultats obtenus durant ces trois années ont fait l'objet d'un dépôt de brevet et un second financement a été dédié à la poursuite de ce travail. De ce fait, de nombreuses publications, dont certaines récentes, ont été réalisées.

Dès la fin de mon doctorat en 2008, j'ai été embauchée en tant qu'ingénieur-recherche en développement au sein du Laboratoire Industriel d'Oril Industrie (Laboratoires Servier). Mon rôle a été d'assurer la production d'un kilogramme de principe actif issu de la recherche interne afin de réaliser les essais précliniques. Durant cette période, *via* l'optimisation des 8 étapes, j'ai ainsi pu affiner mes connaissances en synthèse et en procédés. J'ai également pris conscience de l'importance de la maîtrise des risques chimiques en milieu industriel, et de l'importance des étapes de validation des procédés/procédures assurant la robustesse et la traçabilité d'une voie de synthèse d'un principe actif.

Cette première expérience industrielle épanouissante m'a permis d'accéder au poste de Responsable Laboratoire au sein de Roowin SA, une société de synthèse à façon de composés chimiques variés. J'ai ainsi eu la responsabilité d'une équipe de 4 techniciens à temps complet. Nous devons assurer la livraison dans les délais impartis des lots de composés conformes aux attentes de nos clients. Durant

cette période, mon sens de l'organisation et de prise de décision s'est largement développé, ainsi que mon relationnel client. La diversité des projets menés m'a également permis d'enrichir mes connaissances chimiques. Cependant, le monde de la recherche applicative me manquant, j'ai saisi l'opportunité présentée par le recrutement d'un enseignant-chercheur à l'Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale à Compiègne.

Lors de mes six années à l'ESCOM, j'ai saisi la chance de développer la synthèse et d'évaluer le potentiel d'une molécule plateforme peu commune : le divinylglycol. Autour de cette molécule et grâce aux nombreux appareils disponibles dans l'unité de recherche, j'ai acquis des compétences multiples en chimie organique durable, en nouvelles technologies d'activation et en intensification de procédés. J'ai également gagné mon autonomie dans la rédaction et la soumission de projets de recherche, principalement financés par la SAS PIVERT, Institut pour la Transition Energétique.

Riche de ces différentes expériences, j'ai alors décidé d'allier mes compétences en chimie durable et milieux non conventionnels avec ma passion initiale pour la synthèse de molécules biologiquement actives en intégrant le laboratoire de Chimie Durable et Santé de HEI début septembre 2016. Au sein de cette équipe dynamique, j'ai chaque jour l'occasion de développer de nouvelles idées dans les domaines de la santé, projets qui seront présentés dans la suite de ce rapport.

La suite de ce mémoire s'articulera selon 2 grands axes. Le premier couvrira mes activités de recherche avant mon intégration au sein du LIRIC. Son fil conducteur sera l'évolution d'un projet de recherche, de son concept aux étapes de développement des procédés associé. Il se scindera en 2 sous parties, l'une dédiée au domaine pharmaceutique, la seconde au domaine de la chimie agrosourcée.

Le second axe comprendra mes activités de recherche depuis mon intégration au sein de l'équipe HEI (septembre 2016). J'y aborderai mes projets de recherche en cours, ainsi que mes projets à moyen et long terme. Comme on peut le constater, chacun de ces projets vise une interface chimie/biologie, chimie/matériaux ou chimie/environnement qui me sont chères.

ACTIVITES DE RECHERCHE 2005-2016

« DU CONCEPT AU DEVELOPPEMENT DU PROCEDURE »

Dans cette première partie seront présentées les différentes étapes menant de l'idée (concept) au développement du procédé de synthèse du composé ciblé. Naturellement, le cheminement verra apparaître les étapes de synthèse chimique, de validation des hypothèses de travail et d'évaluation du potentiel des molécules envisagées.

Cette démarche sera réalisée dans le domaine pharmaceutique, couvrant mes recherches entre 2005 et 2010 puis dans le domaine de la chimie durable, couvrant la période 2010-2016.

I. Chimie pharmaceutique (B1, P1, P2, P3, P4, P6, P7, P14 et expériences industrielles)

1. Travaux de doctorat

J'ai effectué mon doctorat d'octobre 2005 à septembre 2008 au sein du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (UMR CNRS 8009) de l'Université de Lille 1 sous la direction du Professeur Philippe Cotelle grâce à une bourse docteur-ingénieur CNRS-Région Nord-Pas-de-Calais.

a. Concept et postulat

Mon travail a consisté à étudier le motif 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione en tant que noyau d'intérêt pour le développement d'une nouvelle famille d'inhibiteurs potentiellement mixtes de deux fonctions enzymatiques : l'intégrase et la fonction Ribonucléase H du VIH-1, en se basant sur leurs similitudes de structure et d'action. Elles possèdent en effet des sites actifs similaires comportant un motif DDE (2 acides aspartiques et 1 glutamique) récurrent capable de complexer deux ions métalliques divalents.¹ Le pharmacophore des inhibiteurs de ces fonctions (Figure 1) se compose de trois atomes d'oxygène capables d'interagir avec deux ions métalliques divalents distants de 4-5 Å. Un composé capable de chélater de façon compétitive les cations Mg^{2+} nécessaires à l'activité enzymatique pourrait alors se révéler un inhibiteur puissant.

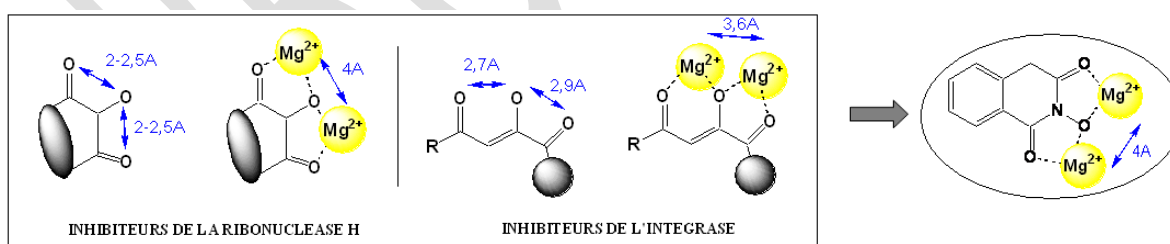


Figure 1. Structure des inhibiteurs connus des fonctions ciblées et motif 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione.

- Puisque la 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione est un inhibiteur connu simple de la fonction Ribonucléase H correspondant à cette définition, nous avons choisi de le développer de façon à obtenir une activité sur l'intégrase.²

¹ Andreola, M. L. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3713-3723.

² Hang, J. Q.; Rajendran, S.; Yang, Y.; Li, Y.; Wong Kai In, P.; Overton, H.; Parkes, K. E. B.; Cammack, N.; Martin, J. A.; Klumpp, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *317*, 321-329.

- Ayant défini notre squelette de base, nous avons eu recours à l'expertise de l'équipe du Dr Maria Letizia Barreca pour définir une stratégie de pharmacomodulation. En utilisant l'un des modèles les plus récents de pharmacophore des inhibiteurs de l'intégrase disponible à l'époque,³ nous avons défini les positions à moduler (Figure 2).

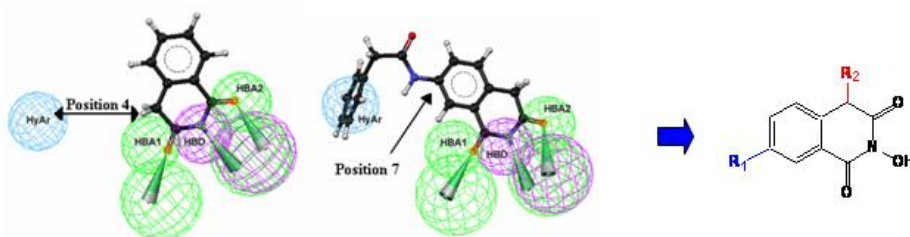


Figure 2. 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione et un dérivé comportant en position 7 un groupement phénylacétamide définissant les positions les plus probantes de modulation, insérés dans le modèle.

Deux axes de travail complémentaires ont été approfondis :

- D'une part, nous avons travaillé de manière rationnelle en collaboration avec les modélisateurs et les biologistes. Chacune des positions choisies a été étudiée et les résultats confrontés au modèle. Les conclusions de chaque famille de dérivés ont servi de base à l'élaboration de la famille suivante dans un souci d'optimisation de la substitution et des activités biologiques.
- D'autre part, nous avons tenté d'asseoir notre concept d'inhibiteur mixte chélatant en étudiant le comportement du motif en présence de cations divalents.

b. Synthèses variées et relations structures activités

Diverses familles de dérivés de la 2-hydroxy-isoquinoléine-1,3-dione ont été synthétisées en la substituant sur les deux positions préalablement définies comme capables d'engendrer un gain d'activité biologique (positions 4 et 7).

Le schéma de synthèse global est représenté ci-dessous (Schéma 1).

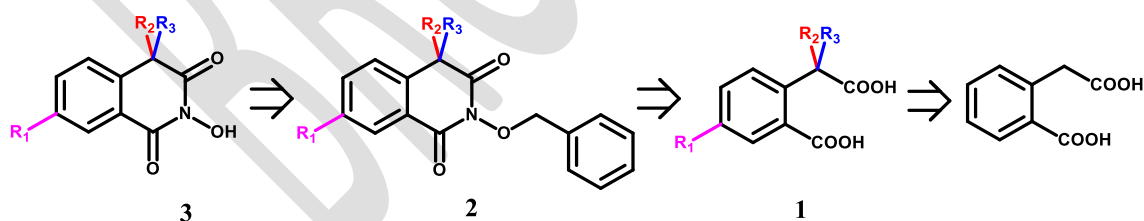


Schéma 1. Rétrosynthèse des dérivés de la 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione

Il consiste à obtenir des dérivés substitués de l'acide homophtalique **1** qui sont ensuite cyclisés par action de la benzylhydroxylamine conduisant aux dérivés de type benzyloxyisoquinoléine-1,3-dione **2**. La fonction N-hydroxyle est ensuite libérée par clivage de la protection benzylique. Différentes tentatives de substitution directe des noyaux isoquinoléine-1,3-dione protégés ou non nous ont prouvé que la substitution devait être mise en place au niveau de l'acide homophtalique.

³ Barreca, M. L.; Rao, A.; De Luca, L.; Zappalà, M.; Gurnari, C.; Monforte, P.; De Clercq, E.; Van Maele, E.; Debysier, Z.; Witvrouw, M.; Briggs, J.M.; Chimirri, A. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 1450-1455.

i. P1- Monosubstitution en position 7 :

Notre premier axe de travail a consisté à substituer le cycle aromatique en position 7, en nous basant sur les travaux de Ames et Grey.⁴ Suivant le schéma rétrosynthétique proposé, différentes familles de dérivés monosubstitués de la 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione **3** ont été synthétisées (Schéma 2). Cette famille est composée de 18 dérivés, appartenant à 3 sous-groupes : des substituants hétéroatomiques de petites tailles, des dérivés arylés et des amides. Chronologiquement, nous avons préparé une première série de composés substitués par un groupement à faible nombre d'atomes (≤ 3). La synthèse des composés halogénés nous a permis d'accéder aux groupements de type aryle par couplage de Suzuki. Dans un dernier temps, nous avons synthétisé des dérivés substitués par différents groupements amides à partir de l'acide 5-amino-2-carboxyméthylbenzoïque.

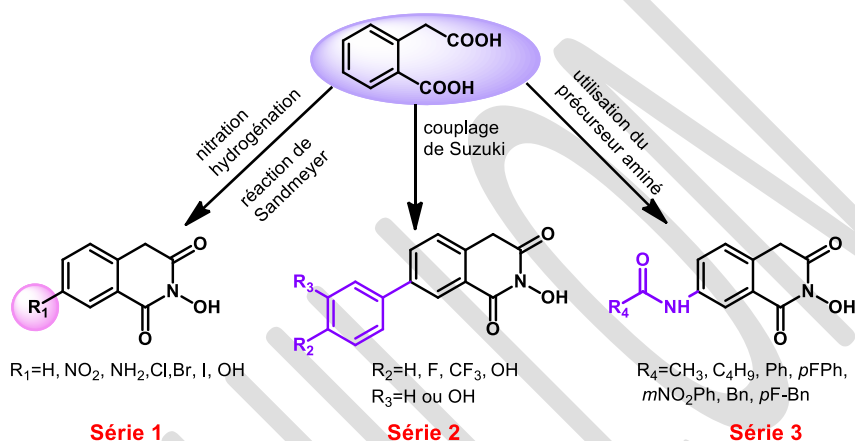


Schéma 2. Structure des dérivés en position 7⁵

Les activités biologiques sur intégrase et Ribonucléase H du VIH-1 sont reportées dans le tableau suivant (Tableau 1).

On peut constater que cette première famille de dérivés ne conduit pas à une amélioration flagrante de l'activité anti-RNase H. En effet, la 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione **1** possède une concentration inhibitrice de 5.9 μ M vis-à-vis de la fonction RNase H, et aucun dérivé ne se révèle plus performant.

En revanche, l'activité anti-intégrase est fortement impactée par la nature du substituant en position 7. Tous les composés testés inhibent l'intégrase avec des Cl₅₀ allant de 0,09 à 18,8 μ M. Les groupements amides en position 7 sont particulièrement intéressants. En effet, les composés **12** et **13** présentent des Cl₅₀ de l'ordre de 100 nM et une excellente sélectivité vis-à-vis de l'intégrase versus RNase H. Malheureusement, ces deux composés ne sont pas actifs sur cellules MT-4.⁶ Les 2 seuls composés faiblement actifs sur cellules (**7** et **9**) sont cependant des dérivés amides, ce qui confirme l'intérêt de ce groupement pour la pharmacomodulation du motif 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione. Le potentiel des amides a été confirmé par modélisation moléculaire (Figure 3). L'augmentation de

⁴ Ames, D. E.; Grey, T. F. *J. Chem. Soc.* **1955**, 351, 3518–3521.

⁵ Billamboz, M.; Bailly, F.; Barrecca, M.L.; De Luca, L.; Mouscadet, J.F.; Calmels, C.; Andréola, M.L.; Witvrouw, M.; Christ, F.; Debyser, Z.; Cotelle, P. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7717-7730.

⁶ La lignée MT4 est une lignée de cellules T humaines transformées par le virus HTLV1. Ces cellules sont particulièrement sensibles au virus HIV1 puisque 6 à 7 jours après surinfection par des quantités infimes de virus HIV1, elles montrent un effet cytopathogène important (formation de syncytia) conduisant 50 à 80% des cellules vers la mort.

l'activité anti-intégrase pourrait être attribuée à une meilleure interaction du motif avec le site actif de l'enzyme, notamment *via* l'atteinte d'une poche hydrophobe par la chaîne aryle amide.

Tableau 1. Activités biologiques des dérivés monosubstitués en position 7

	Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM)			CE ₅₀ ^d (μM)	CC ₅₀ ^e (μM)
			Overall IN ^a	RT RNaseH ^b	RNaseH/IN ^c		
SERIE 1	1	H	6.32	5.9	0.9	NT ^f	NT ^f
	2	NO ₂	8.50	48.0	5.6	>205	>205
	3	Cl	0.80	28.9	36.1	>48	>48
	4	Br	0.58	>96	165.5	>64	>64
	5	I	1.22	58.0	48.3	>70	>70
	6	OH	2.22	37.4	17.0	>48	>48
SERIE 3	7	NHCOCH ₃	0.59	40.7	69.0	148	>250
	8	NHCOCH ₂ Ph	18.80	>80	4.2	>250	>250
	9	NHCO(4-F)Ph	1.24	5.7	4.7	22	84
	10	NHCO(3-NO ₂)Ph	0.41	7.1	17.3	>120	>120
	11	NHCO(3-NO ₂)Ph	8.90	10.8	1.2	NT ^f	NT ^f
	12	NHCOCH ₂ Ph	0.09	>80	888.9	>121	>121
	13	NHCOCH ₂ (4-F)Ph	0.13	35.3	271.5	>116	>116
SERIE 2	14	4-F-Ph	1.47	22.2	15.8	>46	>46
	15	4-CF ₃ -Ph	1.80	10.7	5.9	>47	>47
	16	Ph	1.73	>80	47.0	>66	>66
	17	4-OH-Ph	5.42	7.2	1.3	>186	>186
	18	3,4-diOH-Ph	0.56	6.6	11.8	>89	>89

^a Concentration requise pour inhiber 50% de l'activité globale de l'intégrase *in vitro*. ^b Concentration requise pour inhiber 50% de l'activité globale de la Ribonucléase H *in vitro*. ^c Ratio des IC₅₀ des deux fonctions ciblées. ^d Concentration effective pour réduire de 50% la croissance cellulaire. ^e Concentration requise pour réduire de 50% la viabilité des cellules MT-4. ^f Non testé.

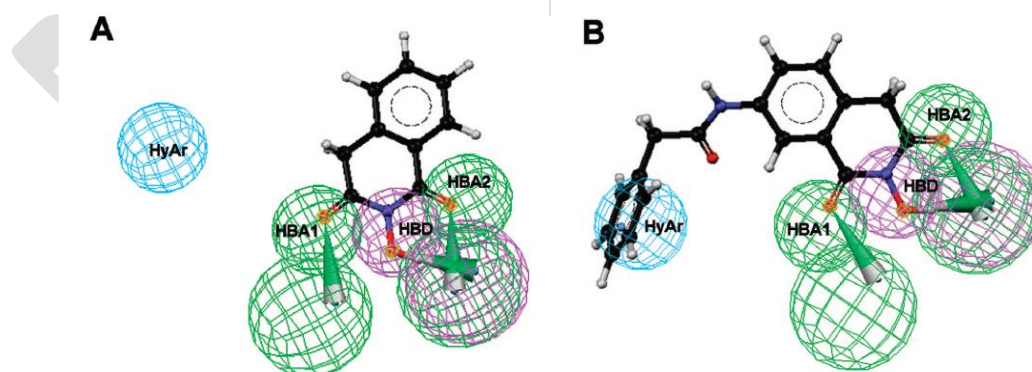


Figure 3. Modèle de pharmacophore HypoGen en présence de 1 (A) et de 12 (B)

Tout en gardant en mémoire l'apport d'une chaîne amide aromatique en position 7, nous avons cherché à interagir avec la poche hydrophobe *via* l'introduction de groupements lipophiles en position 4.⁷

⁷ Billamboz, M. ; Bailly, F. ; Lion, C. ; Calmels, C. ; Andréola, M.-L. ; Witvrouw, M. ; Christ, F. ; Debyser, Z. ; De

ii. P3- Alkylation en position 4 :

Les composés substitués en position 4 ont été synthétisés selon le schéma suivant (schéma 3).

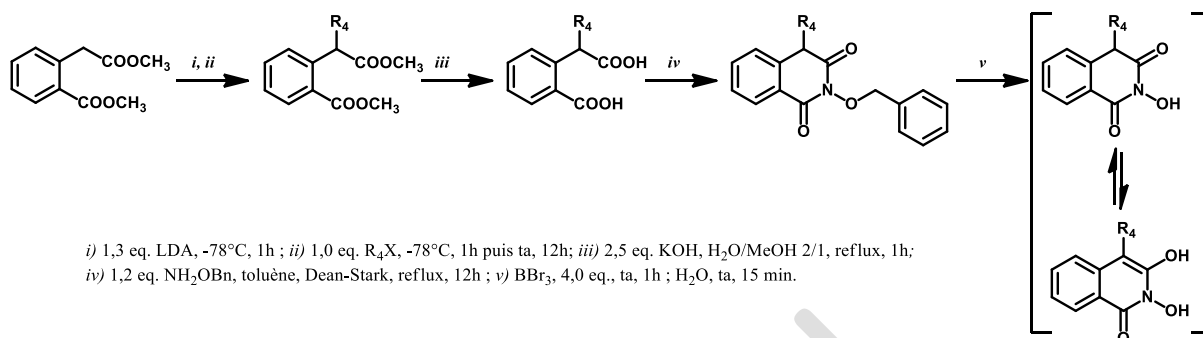


Schéma 3. Synthèse des dérivés alkyles/aryles en position 4 de la 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione

Une quinzaine de composés alkylés ou arylés en position 4 ont été synthétisés et testés vis-à-vis de l'intégrase et de la fonction RNase H du VIH-1. Les composés ont été isolés majoritairement sous la forme céto (>90%). Les résultats obtenus sont compilés dans le [tableau 2](#).

Tableau 2. Activités biologiques des dérivés monosubstitués en position 4 par des groupements alkyles/aryles

Composé	Substituant	CI ₅₀ (μM)			CE ₅₀ ^d (μM)	CC ₅₀ ^e (μM)
		Overall IN ^a	RT RNaseH ^b	RNaseH/IN ^c		
1	H	6.32	5.9	0.9	NT ^f	NT ^f
19	CH ₃	3.3	38.8	11.8	>250	250
20	C ₂ H ₅	15.7	70.0	4.5	>250	205
21	C ₃ H ₇	21.1	46.8	2.2	>25.4	25.4
22	CH(CH ₃) ₂	35.5	18.5	0.5	>122.5	122.5
23	C ₄ H ₉	40.2	13.2	0.3	>25.4	25.4
24	C ₅ H ₁₁	1.35	33.6	24.9	>98.3	98.3
25	C ₆ H ₁₃	11.4	38.0	3.3	>4.4	4.4
26	C ₇ H ₁₅	113.1	45.0	0.4	NT ^f	NT ^f
27	CH ₂ Ph	37.7	NA	-	>95	95
28	CH ₂ -(4-CH ₃)C ₆ H ₄	3.4	80.0	23.5	>5.5	5.5
29	CH ₂ -(4-CF ₃)C ₆ H ₄	23.2	42.7	1.8	>6.0	6.0
30	(CH ₂) ₂ Ph	27.8	NA	-	>30	30
31	(CH ₂) ₃ Ph	2.6	66.8	25.7	>5.2	5.2

^a Concentration requise pour inhiber 50% de l'activité globale de l'intégrase *in vitro*. ^b Concentration requise pour inhiber 50% de l'activité globale de la Ribonucléase H *in vitro*. ^c Ratio des IC₅₀ des deux fonctions ciblées. ^d Concentration effective pour réduire de 50% la croissance cellulaire. ^e Concentration requise pour réduire de 50% la viabilité des cellules MT-4. ^f Non testé. ^g Non actif.

Nous avons pu en conclure que :

- L'addition d'un motif alkyle ou arylalkyle en position 4 diminue l'activité anti-RNase H.

- Quelques composés présentent un gain d'activités modéré vis-à-vis de l'intégrase ; c'est le cas pour le dérivé **24**, comportant une chaîne pentyle et le composé **31**, comportant une chaîne arylpropyle. Expérimentalement, l'activité anti-intégrase est fortement dépendante de la longueur de la chaîne. Des études de docking utilisant différents modèles⁸ ont confirmées l'optimum d'activités pour les chaînes alkyles linéaires entre 5 et 7 carbones par occupation de la poche hydrophobe issue du déplacement de l'extrémité adénosine en 3'. Concernant les dérivés aryles, la meilleure affinité est obtenue pour un espaceur $-(CH_2)_3-$ entre le noyau isoquinoléine-1,3-dione et l'aromatique. La présence d'un bras flexible permet des interactions de type $\pi-\pi$ stacking et hydrophobiques tout en maintenant la capacité de chélation des métaux dans le site actif de l'enzyme.

Globalement, la monosubstitution en position 4 par des groupements alkyles et arylalkyles ne conduit pas à l'identification d'un composé lead intéressant mais a permis de valider le modèle de docking développé dans l'équipe.

Nous avons ensuite synthétisé et évalué différents composés disubstitués en positions 4 et 7 (**SERIE 5**/Figure 4). Les groupements conservés en position 7 sont les plus facilement accessibles chimiquement et ont montré un gain d'activité biologique lors des premiers tests : $-\text{NO}_2$, $-\text{Br}$, $-\text{Cl}$, $-\text{I}$, $-\text{NHCOCH}_3$. Les résultats biologiques nous ont prouvés que le gain d'activité apporté par la monosubstitution en position 7 est complètement aboli par l'addition d'un substituant en position 4. Nous avons donc choisi de développer la diversité chimique en position 4.

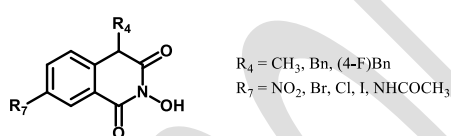


Figure 4. Composés de la série 5

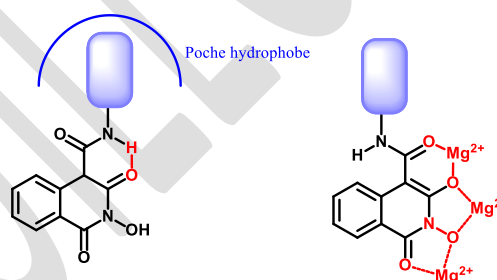


Figure 5. Rationalisation de l'introduction d'un groupement carboxamide en position 4

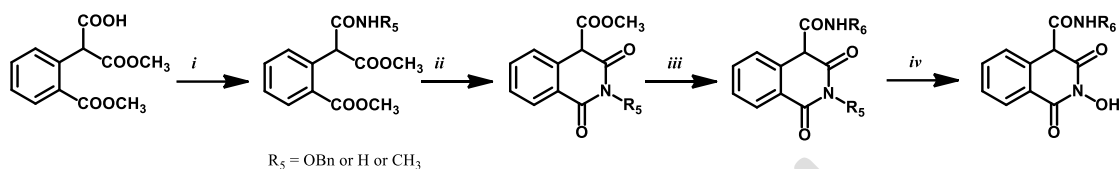
iii. P7- Intégration d'une fonction carboxamide en position 4 :

A ce stade de notre travail, un groupement carboxamide, connu pour sa grande stabilité physiologique, a été intégré en position 4 afin de renforcer la capacité de chélation. En effet, de par nos premiers résultats, il semblerait que les composés ne sont pas capables de chélater les 2 cations métalliques utilisés par les enzymes. Ajouter un groupement chélateur pourrait augmenter cette capacité de complexation. Cet espaceur devait également permettre de créer une liaison hydrogène intramoléculaire avec l'oxygène en position 3, ce qui orienterait les substituants vers la poche hydrophobe du site actif de l'intégrase (Figure 5).⁹ Afin de réaliser ces produits, nous avons tiré profit

⁸ a) De Luca, L. ; De Grazia, S. ; Ferro, S. ; Gitto, R. ; Christ, F. ; Debyser, Z. ; Chimirri, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46(2), 756-764 ; b) Jones, G. ; Willett, P. ; Glen, R.C. ; Leach, A.R. ; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727-748 ; c) Korb, O. ; Stützle, T. ; Exner, T. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 84-96.

⁹ Hare, S. ; Gupta, S.S. ; Valkov, E. ; Engelma, A. ; Cherepanov, P. *Nature*, **2010**, 464, 232-236.

de la cyclisation intramoléculaire que nous avons observé sur ce type de composés (Schéma 4).¹⁰ L'acide 3-méthoxy-2-(2-(méthoxycarbonyl)phényl)-3-oxopropanoïque est tout d'abord couplé avec l'amine NH₂R₅ souhaitée. En milieu basique, on observe la cyclisation intramoléculaire des composés. Une étape d'aminolyse de l'ester méthylique résiduel permet ensuite d'introduire les groupements amides ciblés. La fonction N-hydroxyle est ensuite régénérée par débenzylation selon les conditions classiquement décrites (Schéma 4).



i) For R₅ = OBn or CH₃ : BnONH₂ or CH₃NH₂, BOP, NMM, CH₂Cl₂, ta ; For R₅ = H : SOCl₂ then AcOEt, NH₃g ii) 2,5M KOH/MeOH; rt; iii) R₆NH₂, toluène, reflux; iv) BBr₃, CH₂Cl₂, ta, then H₂O, ta.

Schéma 4. Synthèse des dérivés carboxamides en position 4 de la 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione

Suivant cette voie, une quinzaine de dérivés 4-carboxamide-2-isoquinoléine-1,3-diones ont été synthétisés et testés. Les résultats biologiques sont compilés dans le tableau 3.

❖ Une première information est que la fonction N-hydroxyle est essentielle à l'activité biologique, puisque les composés **32** et **33** sont inactifs vis-à-vis de l'intégrase. Ce constat sera relié par la suite à la capacité de complexation du motif N-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione.

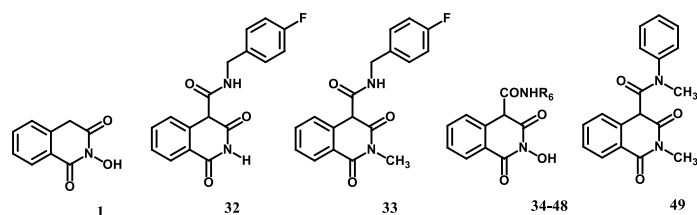
❖ L'introduction d'un motif phénylcarboxamido en position 4 (composés **34-37**) conduit à l'obtention de puissants inhibiteurs de l'intégrase, avec des Cl₅₀ dans la gamme de 10 à 100 nM, similaires à celle du composé de référence Raltegravir. L'introduction d'un bras espaceur méthylène ou diméthylène ne semble pas avoir d'impact sur les activités biologiques. La substitution du noyau aromatique par des groupements halogénés semble bénéfique. En ce qui concerne les groupements donneurs mésomères oxygénés (-OMe et -OH), la disubstitution en ortho/para semble nettement meilleure que celle en méta/para. Ceci peut être expliqué par des gênes stériques diminuant les interactions dans la poche hydrophobe plutôt que par les effets électroniques.

❖ Comme proposé lors du choix de ce motif carboxamide, l'importance de la capacité de liaison hydrogène N-H a été confirmée : en effet, la méthylation de l'azote du lien amide (composé **49**) provoque une forte chute de l'activité inhibitrice anti-intégrase. Ce résultat confirme l'importance de l'orientation du groupement amide et de la capacité de liaison hydrogène du motif dans la liaison avec le site actif de l'enzyme.

L'activité sur cellules MT-4 a également été mesurée. De façon satisfaisante, la plupart des composés inhibent l'activité cellulaire à des concentrations de 1 à 10 µM. Pour la première fois pour le squelette isoquinoléine-1,3-dione, des index thérapeutiques supérieurs à 50 ont été mesurés.

¹⁰ Billamboz, M.; Bailly, F.; Cotelle, P. J. *Het. Chem.* **2009**, *46*, 392-398.

Tableau 3. Activités biologiques des dérivés monosubstitués en position 4



Composé	R ₆	CI ₅₀ (μM)						
		Overall IN ^a	RNaseH ^b	CE ₅₀	CC ₅₀	ST ^c	3'P ^d	3'P/ST ^e
1	-	6.32	5.9	NT ^f	NT ^f	0.9	NT ^f	NT ^f
32	-	199		>250	>250	79		
33	-	>250		>250	>250	>250		
34		0.31		4.95	105.5	0.73		
35		0.020	16.6	3.34	12.3	0.277	1.58	5.7
36		0.010	7.31	2.47	64.0	0.110		
37		0.8		1.75	114.5	1.12		
38		0.08		3.12	130	0.03		
39		0.076	14.0	5.7	>125	0.084		
40		1.19		17.63	118.5	1.03		
41		0.035	0.63	9.24	60.4	0.254		
42		0.035	0.52	7.94	>125	0.572	2.35	4.1
43		0.235		>125	125	0.307		
44		0.205	0.90	>11	11	0.258		
45		0.056	0.36	2.34	202	0.099	0.06	0.7
46		0.030		5.08	123	0.020		
47		0.495	3.85	70.77	>125	0.126		
48		0.673	0.13	>63	63	0.296		
49	-	5.21		-	-	5.6		
Raltegravir^g		0.010		0.006	>8.0	0.007	0.90	128

SERIE 6

^{a, c, d} Concentration requise pour inhiber, respectivement, 50% de l'activité globale, de l'étape de strand transfer et de l'étape de 3'processing de l'intégrase *in vitro*. ^b Concentration requise pour inhiber 50% de l'activité globale de la Ribonucléase H *in vitro*. ^e Ratio des IC₅₀ des étapes de strand transfer et de 3'processing. ^f Non testé. ^g Molécule de référence.

En adaptant selon la nécessité ce schéma global de synthèse, 90 dérivés du motif appartenant à 4 grandes familles ont été obtenus, testés et font l'objet de publications : composés monosubstitués en position 7 ou en position 4 ainsi que des composés disubstitués en position 4 et en position 4 et 7.^{5,11} Les substituants intégrés sont variés et ont permis d'établir des relations structure activité précieuses pour la continuation des travaux (Schéma 5). Parallèlement à ce travail, nous avons également mis au point une voie de synthèse des 4-alkoxyisoquinoléine-1,3-diones et des benzazépine-1,3-diones.¹⁰

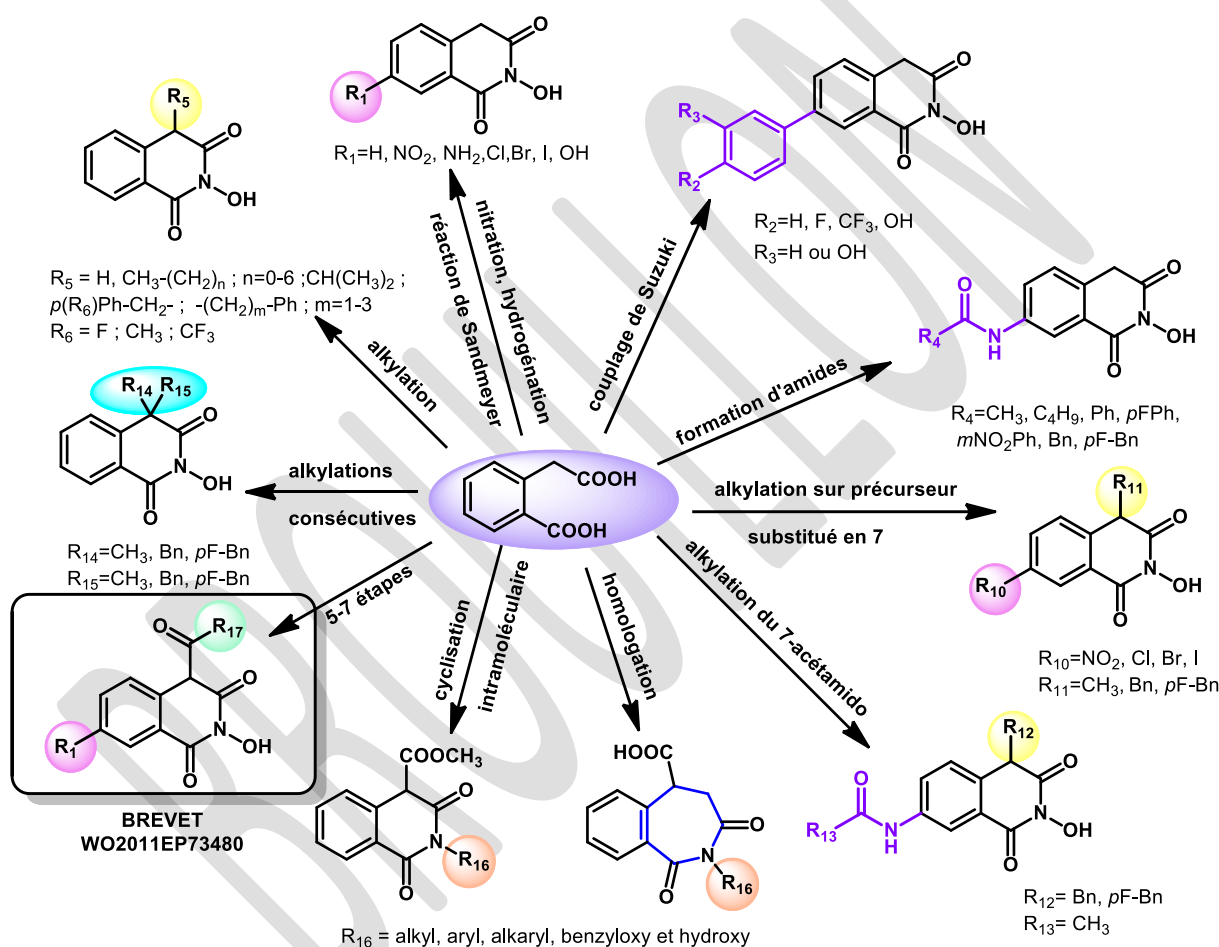


Schéma 5. Bibliothèque des composés obtenus

Dans un souci de validation du mécanisme d'action, nous avons cherché à mesurer la capacité de complexation de ces composés et de les relier à l'activité anti-intégrase.

¹¹ Billamboz, M.; Bailly, F.; Lion, C.; Calmels, C.; Andréola, M.-L.; Witvrouw, M.; Christ, F.; Debyser, Z.; De Luca, L.; Chimirri, A.; Cotelle, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 535-546.

c. Evaluation des propriétés de complexation (validation du postulat)

i. P1- Preuve de concept

Dans un premier temps, la capacité de complexation du motif N-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione a été montrée par différentes techniques spectroscopiques : RMN ^1H et ^{13}C , IR et UV (schéma 6). L'impact de différents sels, capables ou non d'être complexés par le motif N-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione a été évalué. Nous avons ainsi montré que l'ajout d'un sel basique (acétate ou hydroxyde) entraînait l'énolisation du motif ainsi que la formation du bis-anion. Cette forme énolate est nécessaire à la complexation des cations divalents. En effet, lorsque la capacité d'énolisation disparaît, nous n'avons pas été capables de mettre en évidence la formation de complexes (par exemple pour les composés benzoxazine **50** et bis-substitué **51**), prouvant l'importance de la forme énolate pour la complexation (Figure 6).

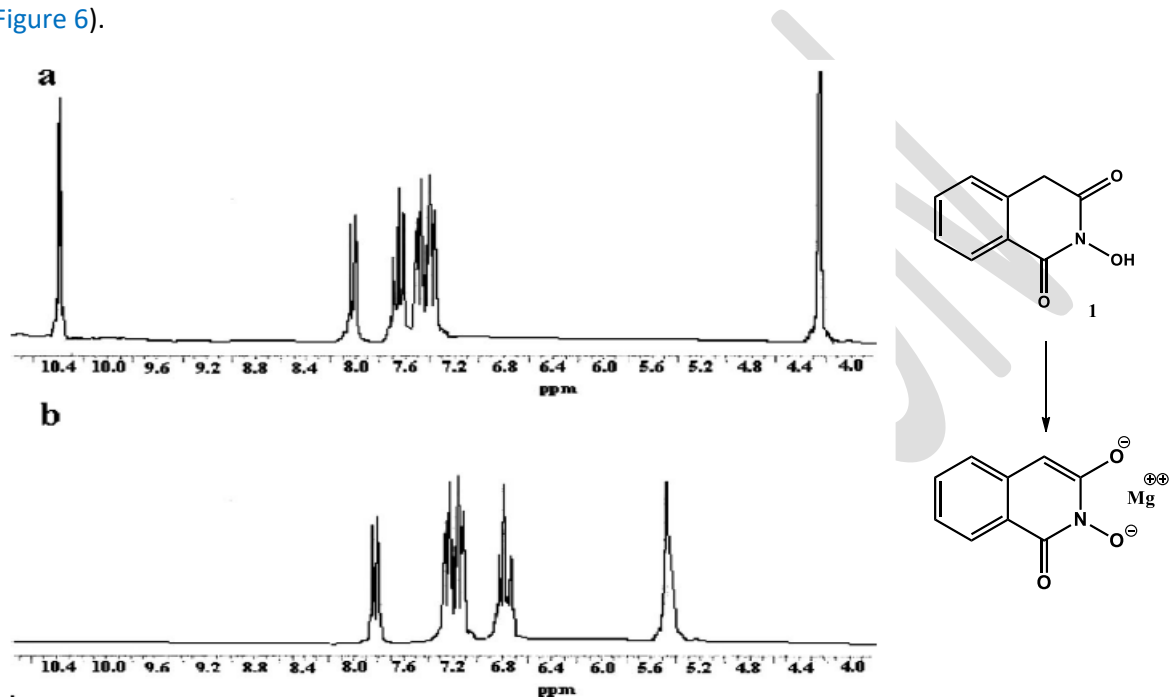


Schéma 6. Evolution du spectre RMN ^1H de **1** en présence d'acétate de magnésium.

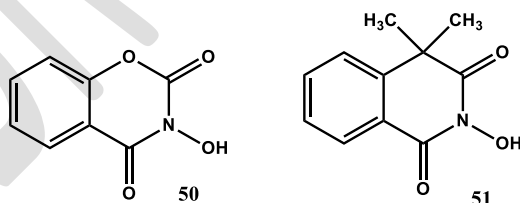


Figure 6. Structure des composés **50** et **51**.

Par la méthode des variations continues (ou méthode de JOB), nous avons évalué la stœchiométrie ainsi que la constante de stabilité du complexe entre **1** et l'acétate de magnésium. Le complexe formé est de stœchiométrie ligand/métal 1/1 avec une constante d'association égale à $5,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.

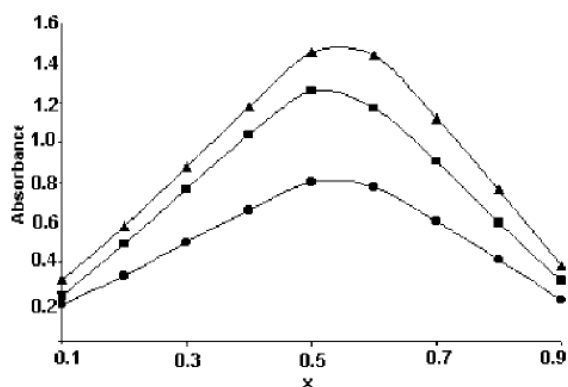


Figure 7. Courbes de JOB du composé **1** en présence de Mg^{2+} à $5 \cdot 10^{-4}M$ à $\lambda=365.5$ nm (●); à $5 \cdot 10^{-4}M$ à $\lambda=302.5$ nm (■); à $8 \cdot 10^{-4}M$ à $\lambda=365.5$ nm (▲).

En appliquant cette méthodologie, nous avons évalué la capacité de complexation d'une trentaine de composés, appartenant aux différentes séries chimiques synthétisées. Nous avons pu ainsi mettre en évidence que :

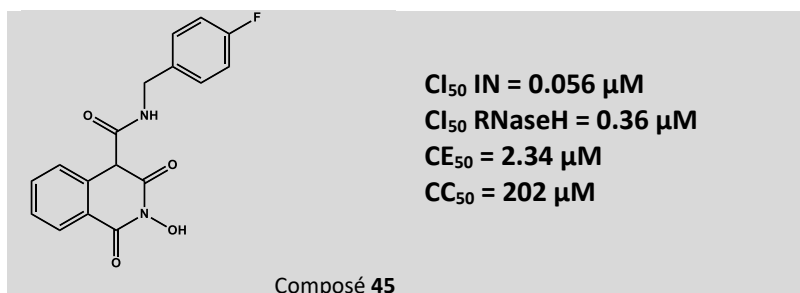
- ❖ L'ensemble des dérivés de la 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione dépourvus de leur capacité de tautomérisation ne complexent pas les cations Mg^{2+} ;
- ❖ A contrario, tous les dérivés tautomérisables complexent les cations Mg^{2+} avec des stœchiométries et des stabilités variables ;
- ❖ Les composés capables de lier 2 métaux sur un même ligand, notamment grâce à la présence d'un groupement carbonyle supplémentaire en position 4, présentent des activités anti-intégrases fortes ($CI_{50} < 50$ nm). Dans ce cas, les constantes de stabilité sont très fortes ($K_s > 1 \cdot 10^6 M^{-1}$) ;
- ❖ Une large gamme de composés, ayant des activités bonnes à modérées ($CI_{50} < 8 \mu M$) forment en solution des complexes MgL , représentatifs de bonnes capacités de complexation ;
- ❖ Enfin, les composés formant des complexes MgL_2 présentent des activités anti-intégrase plutôt modérées ($CI_{50} > 10 \mu M$).

Il semblerait donc que la stœchiométrie du complexe formé majoritairement en solution, directement attribuable à la capacité de complexation du composé, puisse être un premier indicateur de l'activité anti-intégrase. Cependant, la réciproque n'est pas forcément vraie. Le fait que l'on ne puisse établir de lien direct et quantifiable entre la nature du complexe ou la constante de complexation et l'activité biologique est plutôt rassurant, puisque l'inhibition de l'enzyme peut être due, non seulement à la chélation des cations, mais également à la capacité de la molécule à interagir avec le site actif, donc à ces caractéristiques structurales globales.

Cela dit, les dérivés carboxamides appartenant à la **série 6**, sont ceux capables de complexer 2 métaux et dont les activités antivirales sont les plus probantes. Le choix du candidat médicament s'est donc porté sur un représentant de cette série.

ii. Choix d'un candidat médicament et travaux futurs

Suite aux études préliminaires, le composé **45** a été sélectionné comme lead.



iii. P10- Etude du mécanisme d'action et ADME Tox

Des études biologiques plus poussées ont été réalisées sur ce composé LEAD afin de définir son mode d'action ainsi que son potentiel par rapport aux inhibiteurs spécifiques de l'étape de transfert de brins de l'intégrase déjà utilisés (INSTIs) tels que le Raltégravir. On peut retenir que :

❖ Contrairement au Raltegravir, composé de référence, qui est un inhibiteur reconnu sélectif de l'étape de transfert de brins, le dérivé **45** a sensiblement la même activité inhibitrice sur les 2 étapes catalysées par l'intégrase (3'-processing et ST). Différentes expériences ont prouvé que le composé **45** agissait effectivement sur l'étape d'intégration.

❖ Le composé **45** possède un large spectre d'activité : tout comme le Raltégravir, il est actif sur les différents sous-types du VIH-1, ainsi que du VIH-2 et du VIS (virus d'immunodéficience simienne, lignée spécifique du macaque).

❖ Le point essentiel est que le composé **45** conserve son activité sur les souches du VIH-1 résistantes au Raltégravir, à l'AZT et à l'efavirenz, trois antirétroviraux largement utilisés et donc les profils de résistance sont croisés. De façon particulièrement intéressant, **45** ne montre aucune perte d'activité sur toutes les souches résistantes utilisées.

❖ Des essais de sélection de résistance en présence de concentrations croissantes du composé **45** ont été réalisés durant 15 mois (100 passages). Même après ce laps de temps, l'activité du composé **45** reste la même sur le virus muté. Ces expériences prouvent la grande capacité du composé **45** à éviter le développement de résistance, ce qui est très intéressant pour un futur candidat médicament.

❖ Différents essais d'évaluation de la toxicité et du métabolisme ont été réalisés et ont prouvé que :

- **45** n'inhibe pas l'activité des cytochromes testés (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4) à une concentration de 10 μM ;
- A 100 μM , **45** ne montre aucune toxicité sévère sur la croissance cellulaire, la taille des noyaux, la perméabilité membranaire ou le potentiel de la membrane mitochondriale ;
- **45** n'inhibe par l'activité de hERG (human Ether-a-gogo-Related Gene potassium channel 1), un canal potassique essentiel à l'activité cardiaque.

En résumé, la famille des **HIDs** (HydroxyIsoquinoléineDione) est proposée en tant que famille d'intérêt pour la conception d'inhibiteurs de l'intégrase de seconde génération. Bien que des études ADMETox plus poussées soient nécessaires, le composé HIT **45** présente de nombreuses qualités prouvant son potentiel.

BROUILLON

2. Passage de la recherche à la production : développement de procédés (ORIL Industrie et ROOWIN SA)

Une fois que le candidat médicament a été identifié, il est nécessaire de réaliser des essais précliniques puis cliniques afin de s'assurer de son efficacité ainsi que de sa non-toxicité. Dans ce cadre, différents lots de principe actif sont requis et une phase de développement de procédés est donc enclenchée afin de les produire.

a. En tant qu'Ingénieur Recherche en développement

Dès la fin de mon doctorat, j'ai intégré le Laboratoire Industriel (LI) de la société ORIL Industrie (Les Laboratoires Servier) en tant qu'Ingénieur Recherche en Développement. Le LI est responsable du transfert des produits issus de la recherche vers le stade Pilote c'est-à-dire du choix de la voie de synthèse la plus pertinente et de son industrialisation. Les essais sont donc menés sur des échelles allant du gramme au kilogramme, ceci afin de ne transférer au stade Pilote que des synthèses robustes.

i. Objectifs, contraintes et stratégie adoptée

Dès mon arrivée, j'ai été chargée, en collaboration avec une jeune chef de projet et un technicien aguerri, de rendre la synthèse d'un principe actif antithrombotique innovant suffisamment robuste pour assurer la livraison, à terme, des lots destinés aux tests précliniques (10g, 50g puis 1kg).

La molécule, dont la structure globale est confidentielle, présente un réel défi chimique puisqu'elle se distingue par (schéma 7) :

- 2 carbones asymétriques adjacents soit 4 énantiomères dont un seul était souhaité avec des spécifications en terme de qualité strictes : ed>97% ; ee>97%
- La présence d'un groupement thiol, relativement sensible et d'une amine primaire.

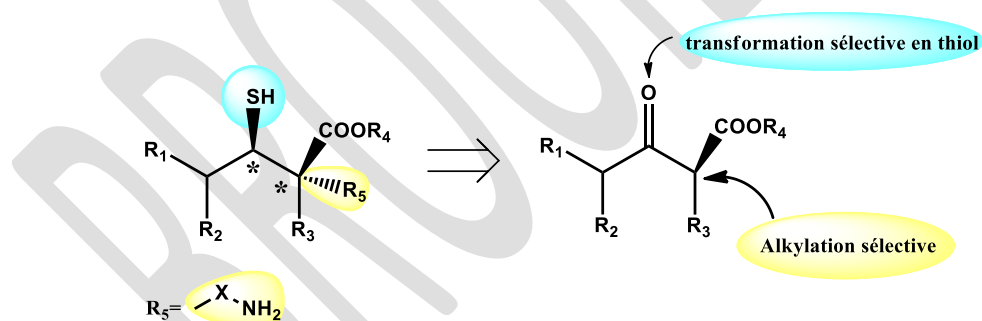


Schéma 7. Vue globale du projet

Nous avons alors envisagé une transformation précédemment décrite et faisant appel à une réduction enzymatique suivie de l'alkylation sélective assistée par chélation du métal (schéma 8).¹²

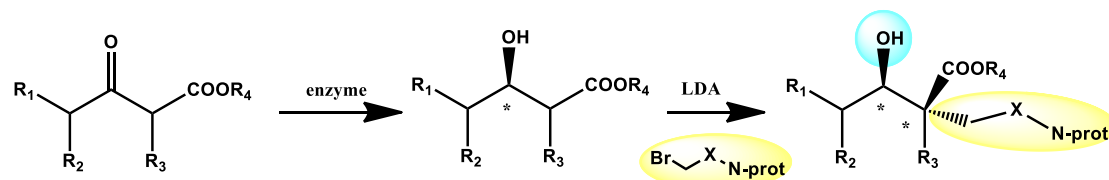


Schéma 8.

¹² Fräter, G. ; Müller U. ; Günther, W. *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 1269-1277.

Cette voie de synthèse n'a malheureusement pas eu les résultats escomptés. Nous avons donc eu recours à la stratégie suivante :

- Alkylation sélective au niveau du céto-ester, ceci afin de profiter de l'acidité du proton présent et d'introduire l'amine sous forme protégée prioritairement au thiol
- Séquence de transformation de la cétone en thiol par passage par un thioester énantio pur,
- Déprotections concomitantes respectives de l'amine et du thiol, conduisant au produit ciblé.

Par souci de confidentialité, seuls le type de réaction et ses résultats globaux seront présentés.

i. Alkylation sélective

Le premier centre asymétrique est introduit par une réaction d'addition de Micaël énantiosélective catalysée par un dérivé de la quinine synthétisé au laboratoire. Cette voie de synthèse permet l'obtention d'un produit pur ($ee > 99\%$). Le groupement amine protégé est ensuite introduit en 3 étapes avec un rendement global de 70% (Schéma 9). Diverses protections de l'amine ont été testées et 3 groupements clivables en milieu acide ont été sélectionnés : deux carbamates (Boc, di-Boc) et un amide (TFA).

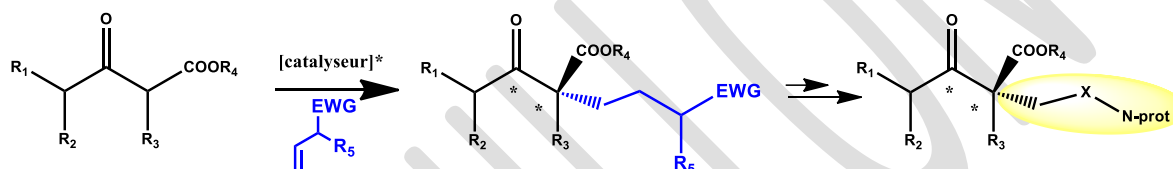


Schéma 9.

ii. Transformation diastéréosélective de la cétone en thiol

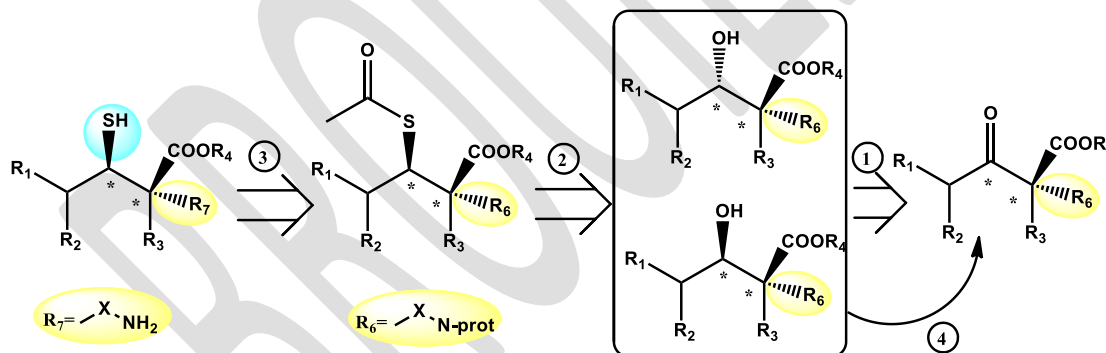


Schéma 10.

Le schéma 10 reprend la voie de synthèse envisagée pour introduire le second centre chiral. Le but est de valoriser chacun des diastéréoisomères potentiellement obtenu.

- 1- Des protocoles variés ont été testés pour réduire sélectivement la cétone : hydrogénation sur catalyseur chiral, réduction enzymatique et réduction chimique. Des réducteurs classiques type NaBH_4 , en présence d'additifs ou non, ainsi que des réducteurs spécifiques (DIP-Cl, L-sélectride) ont été tentés avec des résultats variables. Il est notable que selon les conditions, le rapport diastéréoisomérique peut être inversé. La voie retenue a été transférée au stade Pilote sur un kilogramme et a conduit à un mélange des diastéréoisomères dans un ratio 75 : 25 avec un rendement de 98%.

- 2- L'introduction du thioester est réalisée *via* l'activation intermédiaire de l'alcool. La synthèse repose sur un contrôle parfait de la stéréochimie lors de l'activation et de la substitution par le thiolate de potassium. Une réaction de Mitsunobu directe n'a pas permis d'accéder au composé souhaité de façon satisfaisante.
- 3- La régénération des fonctions amine primaire et thiol se déroule en one-pot en milieu acide sous atmosphère inerte pour éviter toute oxydation en sulfure. Le composé final est obtenu par un retour à pH neutre par simple précipitation. Par recristallisation, on obtient des cristaux blancs conformes aux spécifications.
- 4- Le diastéréoisomère minoritaire est valorisé par réoxydation de l'alcool en cétone. Cette étape, évitant une perte économique notable, est réalisée de manière quantitative par action du réactif de Dess Martin ou en conditions plus douces par un mélange TEMPO/eau de Javel.

Pour conclure, après un an de travail, 8 étapes de synthèse ont pu être transférées avec succès au stade Pilote sur des quantités supérieures au kilogramme. Ceci a permis la livraison dans les délais et selon les spécifications requises des produits demandés.

b. En tant que Responsable Laboratoire R&D

ROOWIN SA est une société de synthèse à façon créée en 2003. Elle compte à ce jour environ 35 personnes, réparties en 4 unités de travail : 4 laboratoires R&D, 1 Kilolab, 1 unité de production, 1 laboratoire d'analyse et de contrôle qualité.

J'y ai été engagée en tant que Responsable d'un laboratoire R&D. Dans ce cadre, j'ai assuré la gestion complète en parallèle des projets – choix de la synthèse, gestion des ressources, planification des délais, rapports de synthèse, reporting client – ainsi que l'encadrement à temps complet de 4 techniciens.

Ce travail fut particulièrement enrichissant d'un point de vue chimique, puisque j'ai pu travailler sur une dizaine de projets d'enjeux et durée variables. En raison de la confidentialité des structures des composés que nous avons livrés, je vous propose uniquement quelques exemples de structures sur lesquelles j'ai été amené à intégrer des modulations synthétiques plus ou moins complexes (Figure 8).

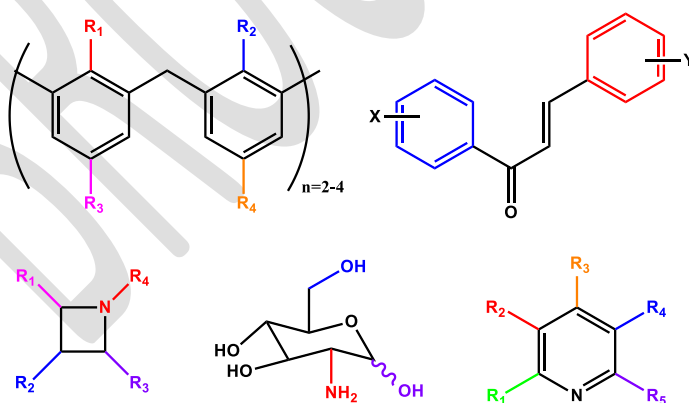


Figure 8.

- A titre d'exemple, les dérivés d'azétidine, molécule a priori simple mais difficile d'accès, ont requis de nombreux essais d'activation avant d'obtenir une cyclisation intramoléculaire efficace. Ce projet, que j'ai coordonné de la recherche à la production Kilolab a conduit à une livraison de 500 grammes d'un composé, synthon intervenant dans la synthèse d'un nouveau principe actif en tests cliniques.

Naturellement, grâce à ces défis, j'ai acquis un sens développé de l'organisation et de la présentation ainsi qu'un degré d'adaptabilité et de réactivité aigu. En effet, étant responsable, aux yeux du client, de la livraison dans les délais et selon les qualités requises, j'étais chargée de communiquer, soit par mail, soit lors de réunions, l'avancée de nos travaux. Ce reporting aux clients m'a appris à contrôler mes paroles et à rester particulièrement professionnelle. Chaque avancée, mais également chaque écueil devait être circonscrit avec attention, ce qui m'a rendu particulièrement attentive aux détails d'une synthèse.

Ces différentes expériences en chimie organique à l'interface avec la biologie ont été particulièrement enrichissantes ; à leur suite, j'ai saisi l'opportunité de développer un nouvel axe de recherche, en intégrant une unité de recherche dédiée à la chimie verte et la valorisation des agroressources.

BROUILLON

II. Chimie durable : synthèse et développement d'une molécule plateforme biosourcée

En septembre 2010, j'ai rejoint l'Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale (ESCOM) en tant qu'enseignant chercheur. Mes activités de recherche se sont alors déroulées au sein de l'EA 4297 TIMR « Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable », unité conjointe Université de Technologies de Compiègne/ESCOM. Ces travaux ont été principalement financés par 2 contrats de 3 ans avec la SAS PIVERT et sont couverts par la confidentialité. Je ne vous présenterai donc que les concepts et les résultats publiés.

1. Cahier des charges et identification des points clés

L'un des objectifs du groupe TIMR est de développer de nouvelles voies de synthèse pour des produits à haute valeur ajoutée à partir des déchets des agroressources. Dans ce cadre, mon choix s'est porté sur la valorisation du glycérol, coproduit du biodiesel et plus spécifiquement sur une molécule plateforme plurifonctionnalisée : le DiVinylGlycol (DVG) (Figure 9). Lorsque nous avons débuté le projet, le DVG était principalement utilisé en tant que synthon pour la chimie fine.¹³ Quelques brevets couvraient également le DVG et ses dérivés en tant que réticulant pour la synthèse de polymères variés.

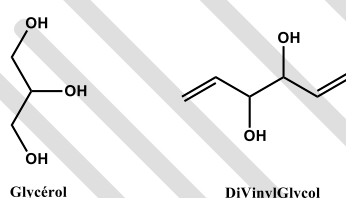


Figure 9.

En partenariat avec la SAS PIVERT, nous avons donc souhaité : i) développer une synthèse industrialisable de DVG ; ii) évaluer son potentiel en tant que molécule plateforme. La voie de synthèse retenue est la suivante (Schéma 11) :

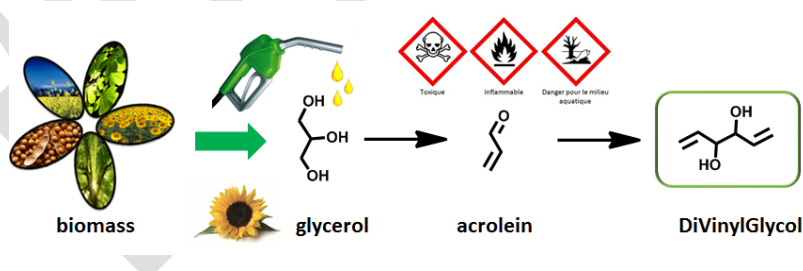


Schéma 11. Voie de synthèse du DVG à partir du glycérol *via* l'acroléine

¹³ a) Spangler, C.W.; McCoy, R.K.; Dembek, A.A.; Sapochak, L.S.; Gates, B.D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1989**, 1, 151-154; b) Schwarzwaldner, G.M.; Steinhardt, S.E.; Pham, H.V.; Houk, K.N.; Vanderwal, C.D. *Org. Lett.*, **2013**, 15(23), 6014-6017; c) Brown, D.M.; Li, M.T.-P. U.S. Pat. Appl. Publ., 20150329511, 19 Nov **2015**; d) Brown, D. M. U.S. Pat. Appl. Publ., 20140155638, 05 Jun **2014**; e) Lin, C.-W.; Liu, S.-W.; Hou, D.-R. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11(32), 5292-5299; f) Ohmiya, H.; Yoshida, M.; Sawamura, M. *Synlett*, **2010**, 14, 2136-2140; g) Donohoe, T.J.; Kershaw, N.M.; Orr, A.J.; Wheelhouse, K.M. P.; Fishlock, L.P.; Lacy, A.R.; Bingham, M.; Procopiou, P.A. *Tetrahedron*, **2007**, 64(5), 809-820; h) Liu, C.-W.; Yeh, T.-C.; Chen, C.-H.; Yu, C.-C.; Chen, C.-S.; Hou, D.-R.; Guh, J.-H. *Tetrahedron*, **2013**, 69(14), 2971-2976.

Elle consiste en i) la double déshydratation du glycérol en acroléine ; ii) le couplage pinacolique de l'acroléine en DVG. Le point clé de la synthèse est le passage par l'acroléine. En raison de sa volatilité, de sa toxicité et de son instabilité chimique, l'acroléine est un intermédiaire redouté par l'industrie chimique. Nous avons donc souhaité développer un procédé en one-pot permettant de synthétiser le DVG à partir du glycérol sans stockage ou manipulation de l'acroléine. Pour cela, le défi principal consistait à compatibiliser les deux étapes de la synthèse afin de synchroniser la phase de production d'acroléine (*par déshydratation du glycérol*) avec sa transformation en DVG (*par couplage pinacolique*).

Grâce à un premier financement de la SAS PIVERT (Projet BIODVG 2012-2015), les travaux sur cette thématique ont pu être menés, avec les restrictions suivantes :

- Développement de procédés respectueux de l'environnement, robustes, simples et peu coûteux.
- Développement d'un procédé minimisant les risques associés à l'acroléine.

Compte tenu des défis que nous avons à relever, nous avons choisi de nous focaliser en premier lieu sur l'étape de couplage pinacolique. En effet, il était essentiel de maîtriser parfaitement sa cinétique afin de convertir l'acroléine dès sa formation, sans accumulation. L'essentiel des protocoles de déshydratation du glycérol étant réalisés en milieu acide, nous nous sommes restreints à ce type de milieu.

2. Mise au point de l'étape de double déshydratation

La déshydratation du glycérol est généralement réalisée en milieu acide (acide de Brønsted, hétéropolyacides) à haute température (supérieure à 250°C) et haute pression. Différents solvants et acides ont été utilisés avec succès, principalement en phase gaz. Peu de travaux ont été réalisés en phase liquide, notamment en raison de la difficulté de trouver un solvant pouvant atteindre les températures requises pour la réaction de double déshydratation.

Des données de la littérature ainsi que de nos expériences, il ressort que la sélectivité de la réaction de déshydratation du glycérol en acroléine est directement liée à la force de l'acide utilisé, sa disponibilité dans le milieu ainsi qu'à la température de travail. Une température trop faible ne permet pas une cinétique de double déshydratation suffisante et conduit à de nombreux sous-produits, issus principalement de la dégradation du glycérol. De même, si le glycérol n'est pas en contact rapidement avec l'acide du milieu, sa vitesse de dégradation l'emportera sur celle de déshydratation. De ce fait, nous avons choisi de développer 2 protocoles – l'un en milieu solvant l'autre sans - pour lesquels le glycérol est coulé sur un milieu acide chaud. Cette coulée est parfaitement compatible avec le développement d'un procédé en flux continu et évite la dégradation du glycérol telle qu'observée en batch.

a. Milieu solvant

Suite aux restrictions de température, notre choix s'est porté sur les huiles de paraffine en tant que solvant de réaction. Ses huiles de paraffine, composées de longues chaînes aliphatiques saturées, possèdent des plages de dégradation comprises entre 300 et 500°C, ce qui les rend aptes à supporter nos conditions réactionnelles. De plus, elles sont inertes vis-à-vis du glycérol, de l'acide et de l'acroléine. Ce solvant a également été privilégié en raison de différents travaux soulignant la possibilité de créer des huiles de paraffine biosourcées.

Différents acides ont été testés. Seuls les acides forts supportés se sont révélés compatibles et sélectifs, conduisant à des rendements en acroléine de l'ordre de 90%.

b. Milieu sans solvant

Afin de minimiser les coûts et optimiser la réactivité, un protocole sans solvant a été conçu. Dans ce dernier, le glycérol est coulé goutte à goutte sur un acide supporté porté à 320°C. Dès contact entre le glycérol et l'acide, les vapeurs d'acroléine sont distillées et condensées. Du fait du contact intime entre l'acide et le glycérol, la cinétique et la sélectivité de la réaction sont excellentes. La nature et la granulométrie du support, la force de l'acide et le ratio acide/support ont été évaluées, conduisant à un rendement en acroléine de 95%.

Ayant en main différentes conditions réactionnelles capables de générer l'acroléine, nous nous sommes alors focalisés sur l'étape de couplage pinacolique.

3. Résultats autour de la réaction de couplage pinacolique

Bien que la réaction de couplage pinacolique ait été publiée par Fittig en 1859, nous avons dû l'adapter afin de tenir compte des contraintes imposées par le procédé et les partenaires industriels :

- Lors de l'étape de double déshydratation, l'acroléine est produite goutte à goutte, accompagnée de molécules d'eau ;
- Afin d'éviter tout stockage de l'acroléine, sa transformation en DVG doit être réalisée de façon rapide et maîtrisée. Aucune accumulation ni effet retard n'est acceptable ;
- Le couplage doit se faire en milieu acide, afin d'être compatible avec l'étape de déshydratation ;
- Le milieu de transformation doit être le plus respectueux des principes de la chimie verte. Un solvant éco-compatible doit être utilisé et des efforts seront portés sur la recyclabilité du système ;
- Le procédé développé doit être le plus robuste et économe possible. De ce fait, nous avons travaillé sur les différentes techniques d'activation existantes afin de minimiser le temps de réaction ou la production des déchets.
- Le procédé doit permettre la production à grande échelle du DVG.

En tenant compte de ces différentes contraintes, nous avons alors menés des investigations complémentaires afin de concevoir un protocole universel de couplage pinacolique éco-compatible adapté à l'acroléine. La principale difficulté est la maîtrise de la réaction de couplage. En effet, de nombreux sous-produits et réactions parasites sont susceptibles de se produire (schéma 12).

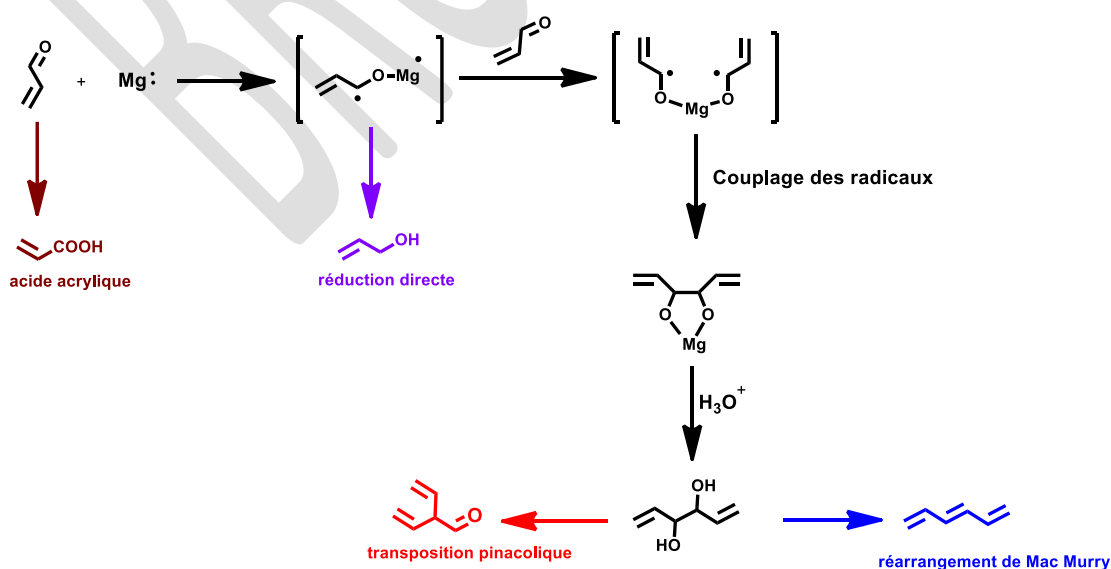


Schéma 12. Mécanisme de couplage pinacolique et sous-produits potentiels

Si la vitesse de réaction de l'acroléine n'est pas suffisante, elle peut s'oxyder facilement en acide acrylique (sous-produit 1). En présence d'un réducteur, généralement un métal de degré d'oxydation 0, l'acroléine se transforme en radical cétyle. Le DVG sera obtenu si, et seulement si, deux radicaux cétyles se rencontrent pour former une liaison C-C. Si cette rencontre n'a pas lieu, le radical peut évoluer vers l'alcool allylique par simple réduction de l'acroléine sans couplage (sous produit 2, le plus abondant). La rencontre des radicaux pouvant être induite par les sels présents dans le milieu, différents additifs salins pourront être utilisés afin de favoriser le couplage pinacolique par rapport à la réduction directe compétitive. Lorsque le DVG sera formé, différentes réactions secondaires peuvent entraîner sa dégradation, telles que les réarrangements ou les transpositions. De fait, les conditions les plus douces possibles de formation du DVG seront privilégiées afin d'éviter toute sur-réaction.

Dans ce cadre, nous avons développé 4 protocoles complémentaires de couplage pinacolique « éco-compatibles ». Chacun d'entre eux a ses propres objectifs, avantages et limitations, tels que nous allons le voir par la suite. Pour chacune de ces méthodes, nous répondrons aux questions suivantes :

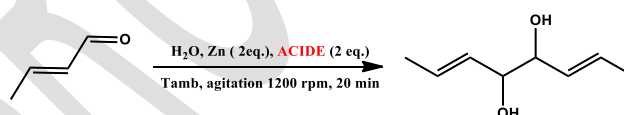
- La méthode est-elle efficace pour l'acroléine ?
- Le système est-il recyclable ?
- La méthode respecte-t-elle les principes de la chimie verte ?

a. Objectifs : Economies d'énergie

La première méthodologie que nous avons développée visait à minimiser la dépense énergétique. De ce fait, nous avons décidé de travailler à température ambiante, dans l'eau distillée, en présence de 2 équivalents de zinc, métal réducteur simple et peu coûteux, sous agitation classique. La transformation de l'acroléine devant être rapide, le temps de réaction a été fixé à 20 minutes.

La réaction devant être menée en milieu acide, nous avons réalisé un screening d'acides dans ces conditions prédéfinies (Tableau 4). Le crotonaldéhyde a été choisi en tant que modèle de l'acroléine.

Tableau 4. Screening acide



	Acide (2 eq.)	Rendement (%)	Conversion (%)
1	NH ₄ Cl	33	33
2	AcOH	99	100
3	Citrique	40	42
4	Tartrique	63	65
5	CH ₃ SO ₃ H	52	80
6	HCl	29	100
7	H ₂ SO ₄	30	100

De ces conditions, les acides forts conduisent à de nombreux sous-produits. Les acides faibles sont de bons candidats pour réaliser le couplage pinacolique du crotonaldéhyde. L'acide acétique, produit biosourcé, permet une conversion totale avec un rendement quasi quantitatif en pinacol. Il a donc été retenu pour poursuivre l'étude.

Nous avons vérifié que le zinc était le meilleur métal pour catalyser cette réaction. Lors du développement de la méthode aux autres réactifs, nous avons constaté une excellente réactivité et de bonnes sélectivités pour les aldéhydes α,β insaturés tels que l'acroléine et les dérivés de type acétophénone. Cependant, les aldéhydes aromatiques, bien qu'elles réagissent de façon rapide, forment une large proportion d'alcools benzyliques, sous-produits issus de la réduction directe des aldéhydes. Cette méthode est donc particulièrement efficace pour l'acroléine, mais reste limitée pour les aldéhydes aromatiques. De plus, le système n'est pas recyclable.

b. Objectifs : développer la recyclabilité

Dans cet objectif, nous avons choisi d'utiliser des catalyseurs acides supportés, qui pourront être simplement filtrés du milieu après réaction et réutilisés. La réaction de couplage ayant lieu dans un milieu solide/solide/liquide, nous avons augmenté la quantité de zinc à 3 équivalents afin d'assurer une cinétique correcte en maintenant une bonne probabilité de rencontre entre les réactifs.

Nous avons alors remarqué que les résines acides étaient capables de promouvoir la réaction de couplage pinacolique. Le recyclage des résines était possible, mais uniquement après régénération par une solution acide. Le système devient donc partiellement recyclable. Concernant la réactivité, les aldéhydes aromatiques et α,β insaturés sont de bons substrats dans ces conditions, mais les dérivés de l'acétophénone se révèlent beaucoup moins réactifs dans ce milieu, notamment à cause de leur insolubilité.

c. Objectifs : synthèse micellaire

Afin de minimiser les problèmes de solubilité et de rencontre des réactifs, nous avons imaginé développer la synthèse en émulsion. Afin de faciliter la mise en émulsion et la rencontre des réactifs, nous avons développé la synthèse assistée par une sonde à ultrasons. Dans ces conditions, la réaction est menée à 45°C en 90 minutes et permet un couplage efficace des aldéhydes aromatiques et α,β insaturés. Les dérivés de l'acétophénone restent toujours peu réactifs. Le surfactant choisi est l'IgepalCO520, surfactant neutre de la famille des polyéthylèneglycols. L'utilisation des ultrasons permet de diminuer la taille des gouttes et d'augmenter la cinétique et la sélectivité de la réaction (Figure 10).

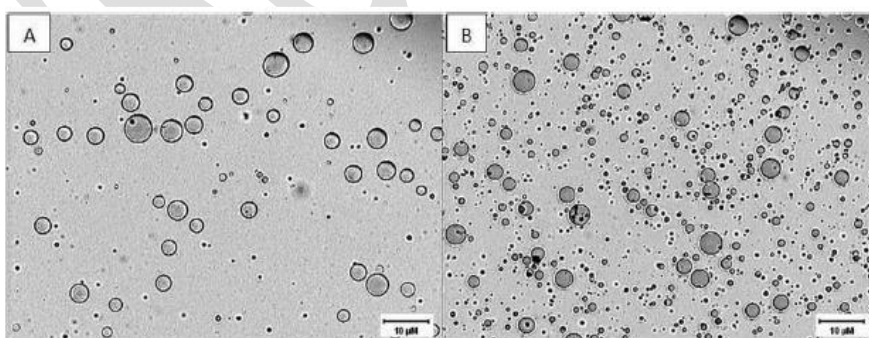


Figure 10. Effet de la sonication sur la taille des gouttes. (A) milieu après 10 minutes d'agitation classique à 1200 rpm; (B) milieu sous ultrasons (10 minutes à 100 Hz).

Différentes mesures ont montré que nous étions en présence d'une émulsion huile dans eau, les gouttelettes contenant les produits organiques. Ces gouttelettes servent de réservoir pour les produits

organiques et notre hypothèse est que la réaction a lieu à l'interface huile/eau afin de respecter les balances hydrophilie/lipophilie des différents intermédiaires (Schéma 13 ; Figure 11).

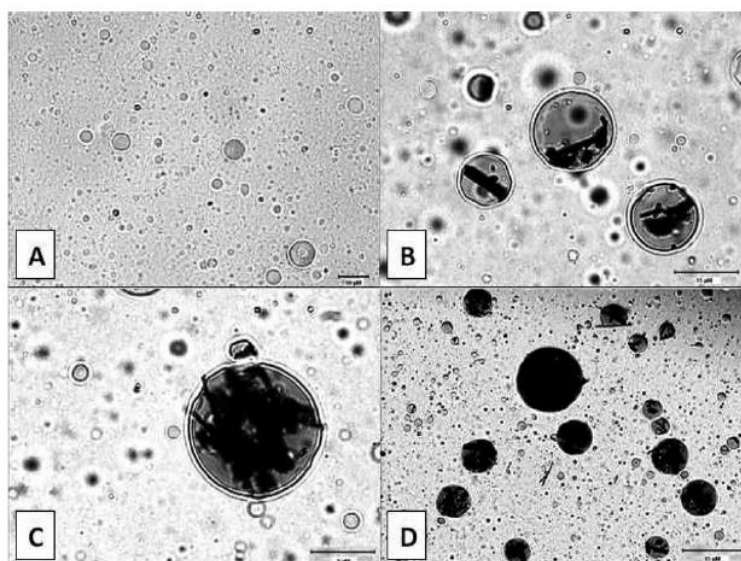


Figure 11. Observation microscopique de la dissolution d'un colorant lipophile (organoblue) dans les gouttes. (A) milieu initial sans colorant ; (B) commencement de l'absorption du colorant dans la phase « huile » ; (C) dissolution progressive de l'additif lipophile dans les gouttelettes ; (D) coloration quasi-totale de la phase huileuse. Barres : (A) 10 μM , (B) 15 μM , (C) 5 μM , (D) 15 μM .

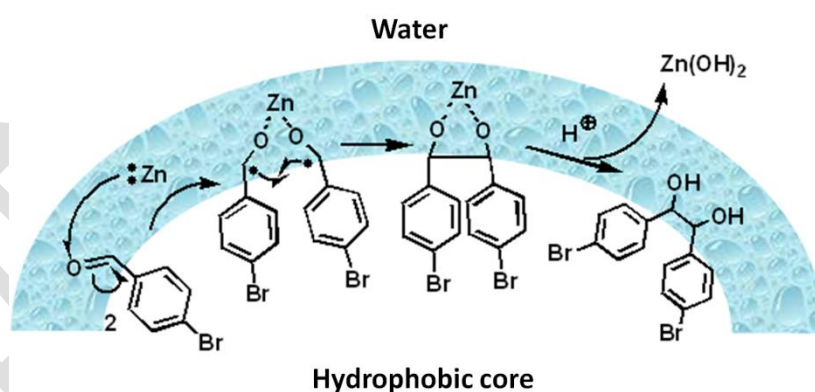


Schéma 13. Proposition de mécanisme à l'interface eau/milieu organique

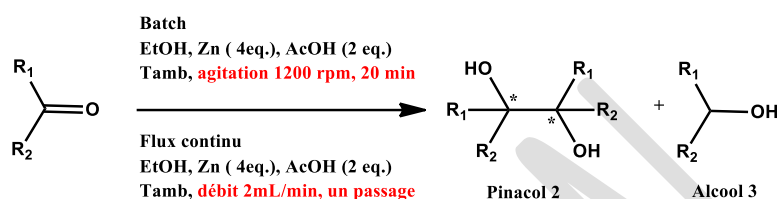
d. Développement en flux continu


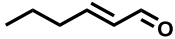
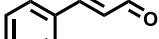
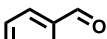
Afin d'assurer une bonne capacité de production de DVG, nous avons souhaité développer la réaction de couplage pinacolique de l'acoléine en flux continu. Dans ce cas, les réactifs solides sont compactés dans une cartouche entre deux frittés et la solution des réactifs homogènes est pompée et mise en contact avec ceux-ci. Différents paramètres peuvent être modulés, parmi lesquels les plus évidents sont le débit de passage sur la cartouche, le solvant de dissolution, la dilution du milieu et la quantité de catalyseur introduit dans la cartouche.

En se basant sur nos expériences préliminaires, nous avons choisi d'utiliser l'acide acétique comme promoteur de la réaction. Afin d'assurer l'homogénéité de la solution de substrat et une faible viscosité, nous avons choisi l'éthanol en tant que solvant.

Nous avons pu ainsi montrer que la réaction en flux continu était possible et même avantageuse par rapport au batch (Tableau 5). Ceci peut être dû, pour la réaction en flux, à une proximité forcée des intermédiaires cétyles favorisant leur rencontre et le couplage.

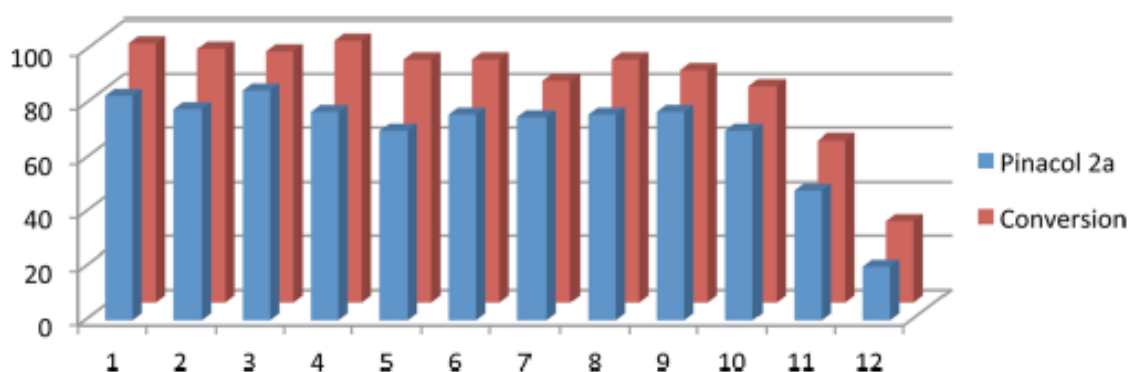
Tableau 5. Comparaison des réactions en batch et en flux continu de différents substrats.



Substrat	Flux continu			Batch		
	Conversion (%)	Rendement 2 (%)	Rendement 3 (%)	Conversion (%)	Rendement 2 (%)	Rendement 3 (%)
	96	81	5	100	99	1
	80	70	9	60	20	31
	95	85	6	90	42	42
	100	68	32	60	8	49



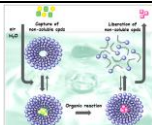

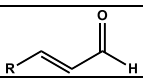
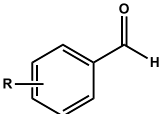
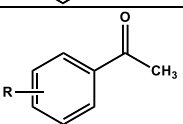
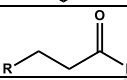
De façon particulièrement intéressante, nous avons montré que le ratio d'utilisation du zinc par rapport à la quantité d'acroléine transformée était de 1.05, ce qui est la quantité minimale possible pour réaliser la synthèse (Graph 1).

Graph 1. Cycles consécutifs réalisés sur une cartouche contenant 8 équivalents de zinc.



Nous avons donc mis en place 4 méthodologies de couplage pinacolique afin de respecter au mieux les contraintes imposées par le projet et les requêtes du partenaire industriel. Les avantages et limitations des méthodes développées sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6. Résumé

Résumé		 Méthode 1	 Méthode 2	 Méthode 3	 Méthode 4
Technologie associée		agitation magnétique	agitation magnétique	sonification	flux continu
Solvant		H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	EtOH
Zinc (nbre éq.)		2	3	2	1.05
Acide (2 éq.)		AcOH	Amberlyst®H15	NH ₄ Cl	AcOH
Additif		-----	-----	IgepalCO520	-----
Température (°C)		T _{amb}	70	45	T _{amb}
Temps de réaction (min)		20	120	90	2 mL/min
Recyclabilité		Non	Partielle	Partielle	Non
Rendement/Sélectivité		+++	++	++	+++
		-	+++	++	++
		+++	+	+	+
		-	-	-	-
Publication référence		P11	P12	P9	P17

4. Développement d'un protocole en one-pot-two steps [P16 ; B2]

Suite aux différentes connaissances acquises sur les 2 étapes, nous avons dû nous résoudre à l'évidence : un protocole de synthèse one-pot n'était pas possible pour transformer directement le glycérol en DVG. En effet, les acides forts nécessaires à la déshydratation conduisent à la réduction de l'acroléine avant son couplage en DVG. Ce phénomène est aggravé par la hausse de température, le DVG étant lui-même sensible au milieu acide à trop haute température (réarrangement pinacolique et déshydratation entre autres réactions parasites).

De ce fait, un protocole en réacteur double chambre a été conçu, permettant de s'affranchir du stockage de l'acroléine : dans une première chambre réactionnelle, le glycérol est coulé sur le milieu acide chaud (selon les méthodes A ou B) et les vapeurs d'acroléine sont condensées directement sur les milieux aqueux tels que définis par les études de couplage. Selon nos travaux, une dizaine de combinaisons sont possibles, conduisant au DVG avec des rendements variables. Le protocole optimisé utilise la déshydratation en solvant (méthode B) et le couplage en présence d'acide acétique en tant que promoteur. Le DVG est alors obtenu avec un rendement de 72%, sans stockage ni accumulation de l'acroléine, la cinétique de transformation étant directement relié à celle de la coulée en glycérol.

5. Travaux en cours/Perspectives

A ce jour, les travaux de montée en échelle se poursuivent. Afin de sécuriser le procédé et d'assurer une productivité en accord avec le potentiel du produit, il est envisagé de réaliser la réaction en microréacteurs.

6. Quelles utilisations pour le DVG ?

La seconde partie du travail a consisté à évaluer le potentiel du DVG en tant que molécule plateforme. Différents travaux ont été réalisés, dont certains sont encore en cours dans le cadre du projet DVG POLYM. Ceux-ci ne seront pas abordés dans ce manuscrit. Le schéma 14 résumé les travaux menés.

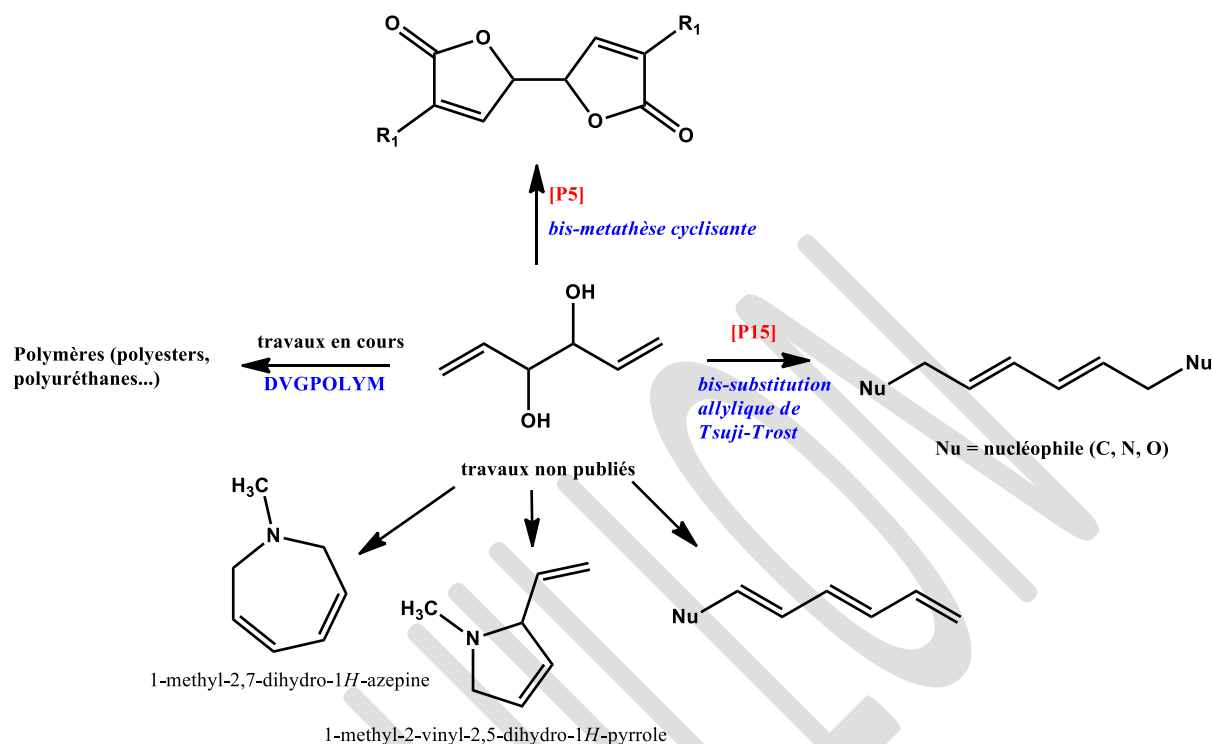
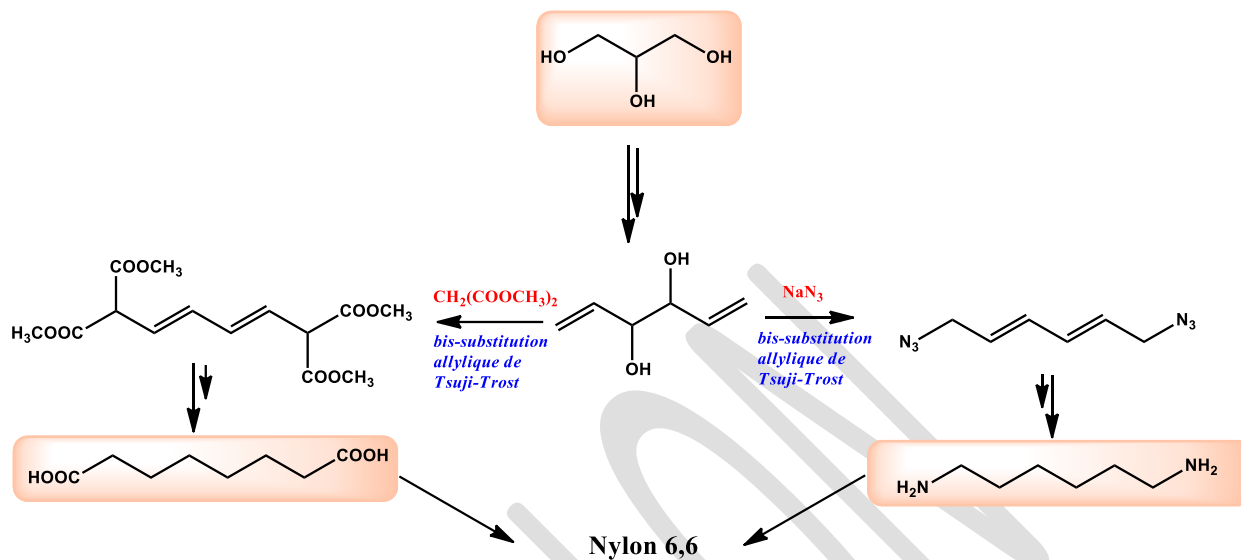


Schéma 14. Résumé des travaux menés et en cours autour du DVG en tant que molécule plateforme.

- ❖ Une double métathèse cyclisante peut être effectuée sur les dérivés bis-acrylates du DVG. La réaction est réalisée dans le dichlorométhane à reflux et permet l'obtention des bis-buténolides avec des rendements modérés à bons en présence de catalyseur de Hoveyda-Grubbs (5mol%). Dès que le substituant R devient trop encombré, la réaction de double métathèse cyclisante est freinée. Les dérivés monocyclisés ont été isolés comme sous-produits de la réaction.
- ❖ Lorsque le diol est activé sous la forme d'acétate de DVG, une réaction rapide et efficace de double substitution allylique de type Tsuji-Trost en présence de 1mol% de Pd(OAc)₂ a lieu sous irradiation microondes et conduit avec de bons rendements aux diènes symétriques. Des études par RMN et spectroscopie de masse (ESI-MS) ont mis en évidence le passage potentiel par des intermédiaires bis-palladés, dont les massifs isotopiques sont caractéristiques en spectroscopie de masse. Lorsque l'azoture de sodium est utilisé en tant que nucléophile, on peut obtenir l'hexaméthylènediamine ; lorsque le malonate de diméthyle est utilisé, cela peut conduire à l'acide oxalique. Ainsi, à partir du DVG biosourcé, on peut imaginer former les deux réactifs nécessaires à la synthèse du nylon 6,6 (schéma 15). Cela permettrait de proposer un polymère issu d'une ressource renouvelable.
- ❖ Nous avons également pu mettre en évidence la formation de dérivés triènes conjugués, de dihydroazépines N-substituées ainsi que de 2-vinyle-dihydropyrrole N-substitués. A ce jour, ces travaux n'ont pas été poursuivis ni publiés.
- ❖ Les travaux toujours en cours sont réalisés dans le cadre du projet PIVERT DVG POLYM. Dans ce contexte, différents dérivés du DVG, donc les diènes obtenus par double substitution

allylique de Tsuji-Trost, sont évalués en tant que monomères ou réticulants pour la synthèse de polymères biosourcés. Les résultats seront valorisés en temps voulu.

Schéma 15. Arbre de synthèse du nylon 6,6 à partir du glycérol.



Le DiVinylGlycol (DVG) est un synthon biosourcé polyfonctionalisé dont la synthèse, malgré les efforts réalisés et les améliorations apportées, reste à parfaire, notamment pour une synthèse à grande échelle. Son potentiel en synthèse organique de molécules à bas poids moléculaire comme de polymères a été largement documenté, soulignant l'intérêt de maîtriser son obtention.

III. Travaux réalisés et en cours depuis septembre 2016

Suite à ces différentes expériences professionnelles, j'ai rejoint en septembre 2016 l'Ecole des Hautes Etudes d'Ingénieur, un établissement d'Yncréa Hauts de France, en tant qu'Enseignant Chercheur rattaché au Laboratoire de Chimie Durable et Santé (ex-laboratoire de Pharmacochimie), dirigé par le Dr Alina Ghinet. Ce laboratoire est rattaché à l'UMR Inserm 995 (LIRIC), dont la thématique de recherche est centralisée sur l'inflammation et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Outre ces activités en collaboration avec les membres du LIRIC, l'équipe de recherche du Laboratoire de Chimie durable et Santé doit s'investir, en collaboration avec les autres équipes de recherche d'Yncréa Hauts de France, dans des thématiques de recherche transverses à HEI, à l'ISA et l'ISEN. Afin de respecter à la fois les envies et besoins de nos partenaires multiples, je me suis donc investie dans deux grandes thématiques de recherche depuis mon arrivée à HEI : i) le développement de composés antibactériens/antifongiques devant être formulés dans des peintures et vernis afin de les stabiliser ; ii) le développement de composés antifongiques visant spécifiquement les pathogènes végétaux.

1. Projet BIOANTIBIO : Peinture et vernis antibactériens/antifongiques

Il s'agit du projet de doctorat d'Anca-Elena Dascalu (début de doctorat 10.10.2016), dont je suis l'encadrante au laboratoire. Ce projet a été initié par le Laboratoire de Chimie Durable et Santé représenté par le Dr. Alina Ghinet (HDR) en partenariat avec le Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques de Lille, représenté par le Dr Emmanuelle Lipka (HDR), l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (ICPAL) et l'Institut Français des Matériaux AgroSourcés (IFMAS). Afin d'évaluer les activités biologiques des composés synthétisés, nous avons recours aux expertises des équipes de l'Institute for Molecular Bioscience (IMB), Université de Queensland, de l'ISA, équipe « Biotechnologie et Gestion des Agents Pathogènes en agriculture » (BioGAP) ainsi que l'équipe « Activités Microbiennes et Bioprocédés » de l'Université de Technologie de Compiègne.

L'objectif est de proposer de nouveaux composés biosourcés pour des applications en tant qu'antibactériens ou antifongiques dans des formulations liquides type peinture et vernis.

Ces composés sont obtenus par dérivation des bioressources et testés par nos différents partenaires sur les pathogènes (bactéries et champignons/levures) identifiés comme problématique dans une optique formulation peinture/vernis. La ressource naturelle principale retenue est l'acide pyroglutamique, dont la réactivité est largement étudiée au laboratoire depuis de nombreuses années.

Ce travail est pluridisciplinaire et, comme de nombreux travaux que j'ai pu mener précédemment, à la frontière entre différentes disciplines.

- ❖ Synthèse organique et relations structure-activités : avec Anca, nous synthétisons les différents composés dont nous espérons une bonne activité sur les cibles biologiques visées.
- ❖ Séparation des énantiomères : en collaboration avec le Dr Emmanuelle LIPKA, co-directrice de thèse, Anca réalise la séparation des énantiomères des différents composés retenus par chromatographie en phase supercritique (SFC).
- ❖ Les activités des composés sont ensuite évaluées sur différents pathogènes (à ce jour 16 souches sont testées par nos partenaires biologistes), couvrant environ 70% des besoins identifiés par notre partenaire IFMAS dans le cadre de la formulation des peintures et vernis.

- ❖ Anca réalise ensuite différents tests de stabilité et de dégradation des candidats les plus prometteurs afin de sélectionner ceux pouvant être intégrés dans les formules des peintures et vernis (ATG, DSC, DVS, suivi RMN dans D₂O durant plusieurs semaines).
- ❖ Lorsqu'un composé sera jugé suffisamment performant pour être formulé, Anca sera formée à l'IFMAS ou chez un partenaire afin de l'intégrer dans la formulation et d'évaluer ces propriétés globales.

Dans le cadre de ce projet, j'accompagne quotidiennement Anca dans ses synthèses et l'interprétation de ses résultats. J'ai moi-même réalisé différents essais de mise au point des protocoles et de synthèse de composés d'intérêt. En parallèle de ces synthèses, j'ai également mis au point un dosage par UV des activités « radical scavenger » des composés organiques, dans lequel j'ai évalué le potentiel des composés synthétisés par Anca. Au vu des résultats plus que prometteurs, j'ai alors pris l'initiative de contacter le docteur Samir Jawhara (LIRIC, équipe 2) afin d'envisager une application de ces composés en tant qu'antioxydants. Une dizaine de composés obtenus dans le cadre de la thèse sont actuellement en cours d'évaluation pour leurs activités sur la production des ROS.

J'ai également sollicité différents anciens collègues mycologues (UTC, équipe « Activités Microbiennes et Bioprocédés ») afin de réaliser le screening d'activités biologiques demandé par l'IFMAS. Nous avons également renforcé cette collaboration en permettant à Anca de partir quelques mois au sein de l'UTC pour réaliser elle-même les tests de ses produits, grâce à un financement complémentaire obtenu auprès des partenaires de la thèse.

A ce jour, les résultats nous ont permis de déposer une déclaration d'invention auprès de la SATT Nord.

2. Projet AMPHIBIOSTIM : amphiphiles biosourcés en tant que stimulateurs de défense des plantes.

Ce projet a émergé de la rencontre avec l'équipe BioGAP de l'ISA et a fait l'objet du travail de master recherche de Madame Audrey DAMIENS.

Le contexte actuel de protection des cultures est fortement marqué en France par l'empreinte du Grenelle de l'Environnement et de son volet Ecophyto II qui vise à réduire de 50 % l'utilisation des produits phytosanitaires, d'ici 2025 (<http://agriculture.gouv.fr/ecophyto>).

Dans ce contexte et dans un objectif d'agriculture durable, il est nécessaire de faire émerger des stratégies de lutte alternatives contre les maladies des plantes. La lutte génétique, la lutte biologique, mais aussi l'utilisation de produits dits « alternatifs » sont largement considérés dans cette approche qui vise à contrôler les maladies tout en permettant d'assurer une rentabilité optimale de la culture.

Les stimulateurs de défense des plantes sont des composés qui vont, sans action directe sur le pathogène, engendrer une réaction de défense de la plante lors d'une agression. Ils agissent comme une sorte de vaccin. Dans le cadre du projet AMPHIBIOSTIM, nous avons cherché à évaluer différentes familles de composés biosourcés en tant que stimulateurs de défense du blé contre le pathogène responsable de la septoriose.

Les premiers résultats prometteurs nous ont incités à poursuivre nos investigations, comme je vais vous le présenter par la suite.

IV. Analyse critique de mes activités de recherche :

Aujourd'hui, je suis capable de dresser la matrice suivante, concernant mes activités de recherche et mes compétences.

FORCES	FAIBLESSES
<ul style="list-style-type: none">• Motivation à poursuivre de nouveaux projets• Expériences professionnelles diversifiées, couvrant une large gamme de compétences• Expériences variées de l'encadrement• Capacité à déposer des projets• Facilité à nouer de nouvelles collaborations	<ul style="list-style-type: none">• Temps disponible au laboratoire et plus spécifiquement à la paillasse• Peu de partenaires à l'international à ce jour• Nécessité de concilier vie professionnelle et vie personnelle
OPPORTUNITES	MENACES
<ul style="list-style-type: none">• Reconnaissance croissante de nos activités au niveau académique et industriel• Soutien à la recherche apportée par HEI-Yncréa	<ul style="list-style-type: none">• Difficulté de financement des projets• Lourdeur administrative dans la conduite des projets• Augmentation croissante des responsabilités pédagogiques

L'une des caractéristiques de mon parcours est sa richesse en expériences, tant industrielles qu'académiques, qui font que je dispose d'une large gamme de compétences. Je suis également capable de déposer des projets de recherche, comme l'attestent les financements que j'ai pu obtenir. D'un caractère enjoué et ouvert, il m'est relativement facile de nouer de nouvelles connaissances et collaborations, portée par une motivation toujours intacte pour faire progresser mes projets de recherche.

Cependant, je peux noter quelques limitations, dont la principale est, malgré l'envie, un manque de temps disponible à la paillasse. Ce temps résulte en partie de mon organisation, qui fait que je ne néglige pas mes engagements pédagogiques ou d'encadrement et impacte sur mon propre temps à la paillasse. Il est également notable qu'à ce jour, les collaborateurs avec lesquels je suis en contact sont principalement français. Ceci pourrait être amélioré par la participation à un plus grand nombre de congrès internationaux. Pour finir, ayant une famille et des enfants en bas âge, il est parfois difficile de concilier les besoins de la recherche avec ceux de ma famille.

D'un point de vue extérieur, je pense que nous avons, au laboratoire, de plus en plus de reconnaissance de nos activités. Nos contacts avec le monde industriel et académique s'intensifient, ce qui, à terme, devrait nous servir. De plus, nous disposons d'un soutien réel au niveau de HEI-Yncréa pour le financement de master recherche, ce qui facilite l'avancée de nos travaux. Je les en remercie vivement,

d'autant plus que la principale menace extérieure me semble être la difficulté croissante à décrocher un financement, allée à une lourdeur administrative croissante lors de la gestion des projets, qui phagocyte le temps alloué à la recherche. De plus, et cela m'est personnel, différentes responsabilités pédagogiques croissantes alourdissent également mon emploi du temps.

Malgré tout, je dispose d'un temps de recherche appréciable et d'une motivation intacte à mener différents projets, dans le domaine des antibactériens et antifongiques. Dans ce cadre, je souhaite développer, pour les années à venir, **deux projets majeurs**, qui concernent à la fois la santé humaine et végétale et répondent à des enjeux sociétaux profonds.

- 1) **Servir la plante sans desservir l'homme : développement de fongicides biosourcés sans impact sur l'environnement (projet BIFUN)**
- 2) **Développement de composés mixtes antibactériens/antifongiques**

Ces projets reposent sur un socle commun, qui est l'apparition de **souches résistantes** aux composés que l'on utilise pour les éradiquer. Que ce soit en santé végétale ou humaine, le même phénomène préoccupant est en progression constante. Il est nécessaire d'agir de concert, dans une approche globale.

ACTIVITES DE **R**ECHERCHE 2016-FUTUR

« LUTTE CONTRE LES PATHOGENES MULTIRESISTANTS :

DEVELOPPEMENT DE COMPOSES ANTIBACTERIENS et/ou ANTIFONGIQUES »

BROUILLON

I. Projet de recherche BIFUN - Servir la plante sans desservir l'homme : développement de fongicides biosourcés sans impact sur l'environnement

Problématique

Les santés végétale, animale et humaine sont plus liées qu'il n'y paraît au premier abord. En effet, de plus en plus de revues documentent le fait que tout intrant dans l'agriculture ou l'élevage peut avoir un impact à plus ou moins long terme sur la santé du consommateur et sur l'environnement.¹⁴ A titre d'exemple, depuis de nombreuses années, les cultures sont traitées par des composés fongicides dont les structures rappellent cruellement celles des fongicides humains (Figure 12).

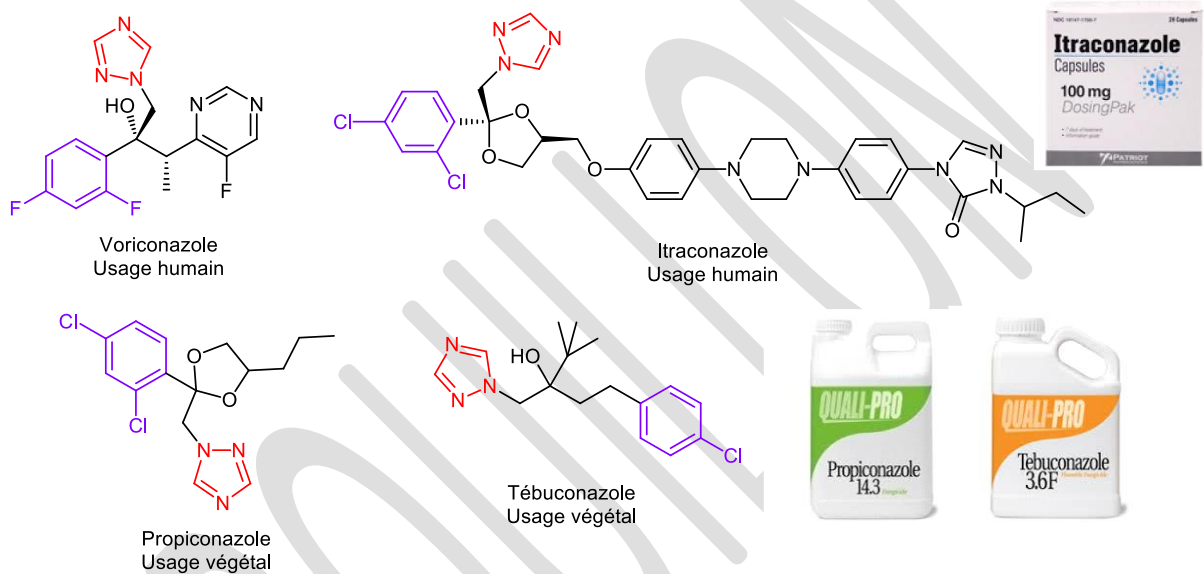


Figure 12. Similitudes structurales entre fongicides végétaux et humains – Famille des triazolés.

Les tonnages sont tels que les résidus dispersés dans l'environnement entraînent l'apparition de souches fongiques résistantes, qui, par croisement avec les pathogènes humains, finissent par impacter l'Homme (Schéma 16).

Nous sommes donc actuellement victimes collatérales des traitements que nous avons dispensés avec générosité depuis plus de 20 ans. Comme l'a parfaitement identifié l'OMS, seule une approche « One World, One Health » permettra de maîtriser les risques et de préserver notre capital santé et notre environnement. Prenant en compte les préoccupations actuelles de préservation de la santé du consommateur et de son environnement, nous avons constitué une large équipe projet interdisciplinaire, comportant des chimistes, des analystes, des microbiologistes, des physiopathologistes ainsi que des cliniciens (Figure 13). La complémentarité des expertises mobilisées nous permettra, dès la conception des principes actifs – stimulateurs de défense des plantes et biofongicides biosourcés – de prendre en compte à la fois l'activité des composés (but initial) mais anticipera leur devenir dans les sols (métabolisme) ainsi que leur cytotoxicité pour l'environnement et

¹⁴ a) Verweij, P.E.; Snelders, E.; Kema, G.H.; Mellado, E.; Melchers, W.J. *Lancet Infect. Dis.* **2009**, *9*, 789-795; b) Snelders, E.; Huis In 't Veld, R.A.; Rijs, A.J.; Kema, G.H.; Melchers, W.J.; Verweij, P.E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*(12), 4053-4057; c) Enserin, M. *Science* **2009**, *326*, 1173.

le consommateur. En réalisant différentes sélections en amont du développement des produits, nous gagnerons un temps précieux et proposerons uniquement des produits dénués de toute toxicité.

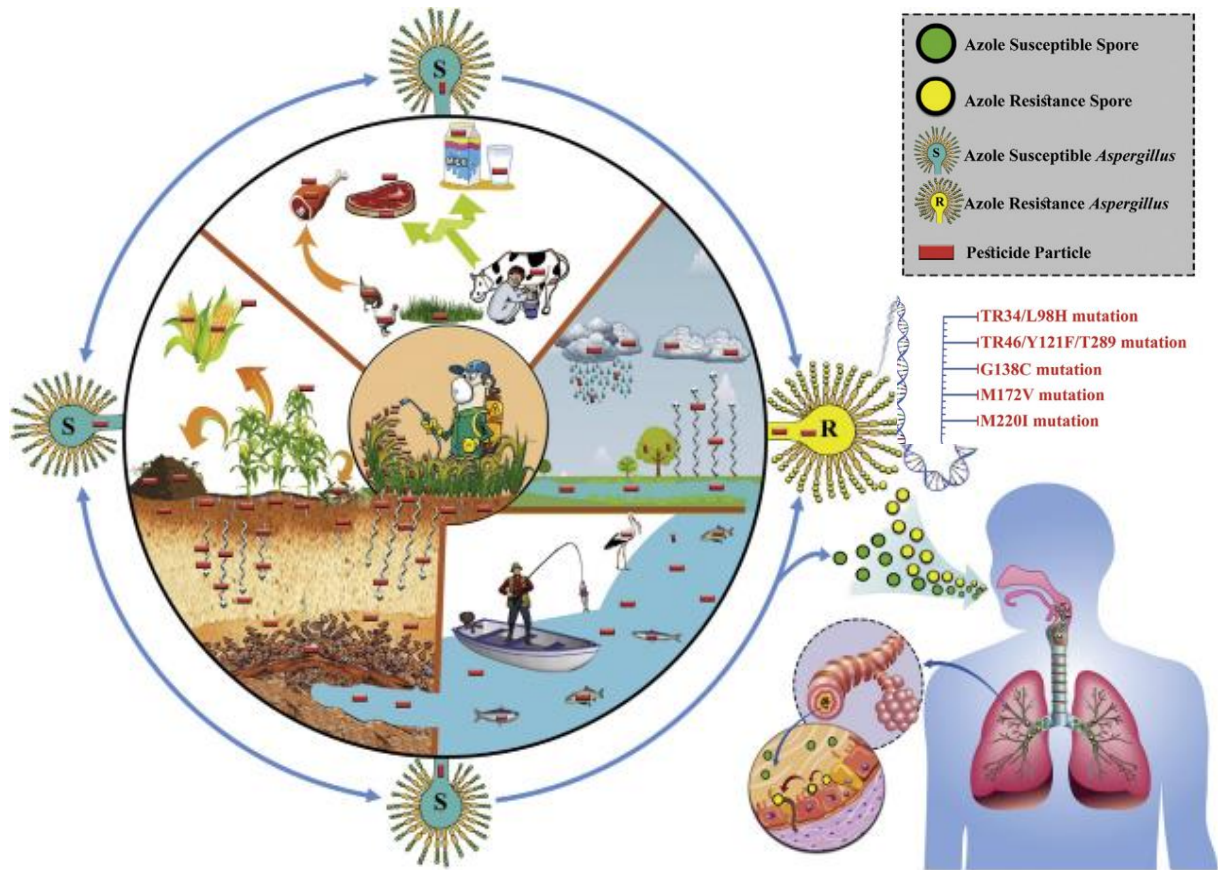


Schéma 16. The relationship between pesticide residue and development of azole resistance *Aspergillus fumigatus* adapté de Vaezi et al.¹⁵

Collaborateur 1 M. Billamboz A. Ghinet	Entreprise P. Ravier	Collaborateur 2 E. Léonard A. Fayeulle	Collaborateur 3 Charles Violante A. Siah	Collaborateur 1 LIRIC Lille Information Research International Center Team 7 C. Furman E. Lipka	Collaborateur 4 LIRIC Lille Information Research International Center Team 2 B. Sendid S. Jawhara	Collaborateur 5 LIRIC Lille Information Research International Center Team 6 E. Boulanger C. Fradin
Management	Don des biosources Conseil en formulation Partenaires pour essais en champ	Tests <i>in vitro</i> and <i>in planta</i> sur pathogènes (colza, tournesol, vigne) Biodégradation Montée en échelle	Tests <i>in vitro</i> and <i>in planta</i> sur pathogènes du blé	Cytotoxicité sur cellules Séparation des énantiomères Métabolisme Relations structures-stabilité	Evaluation biologique sur <i>Candida albicans</i> and souris Impact des composés sur l'inflammation	Evaluation biologique sur <i>Caenorhabditis elegans</i>
Chimie Durable et Santé	Chimie durable Formulation des fongicides	Technologies alternatives Mycologue	Physiopathologiste	Analyste Bioanalyste	Biologistes experts de <i>C. albicans</i> et des études <i>in vivo</i>	Cliniciens and biologistes experts de <i>C. elegans</i>

¹⁵ Vaezi, A. ; Fakhim, H.; Javidnia, J.; Khodavaisy, S.; Abtahian, Z.; Vojoodi, M.; Nourbakhsh, F.; Badali, H. J. *Mycol. Méd.* **2018**, *28*, 59-64.

Figure 13. Membres du projet BIFUN

Les partenaires du projet étant profondément ancrés en région Hauts-de-France, les maladies ciblées concernent principalement les grandes cultures régionales : céréales et oléagineux auxquelles s'ajoutera la vigne, symbole français par excellence. Nous développerons des principes actifs contre différents pathogènes du blé, du colza, du tournesol et de la vigne (ie *Zymoseptoria tritici*, *Botrytis cineria*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phoma lingam*, *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, *Guignardia bidwellii*, *Phomopsis viticola*, *Eutypa lata*). Ces pathogènes ont été sélectionnés en raison de leur impact sur les cultures, couplé à l'apparition de résistances aux pesticides conventionnels. A titre d'exemple, la récolte de blé tendre en 2016 en France a subi un recul de 30% par rapport à celle de 2015. Cette perte est largement attribuée à une forte présence de septoriose et de fusariose, contre lesquelles les pesticides conventionnels perdent en efficacité. On note en effet de nombreuses résistances aux triazolés, aux inhibiteurs de déméthylation et même à certains dérivés azolés. Le phoma du colza provoque une perte de rendement sur les cultures non protégées de 0,5 à 0,7 t/ha, couplé à une lutte chimique peu efficace. La sclérotinia, quant à elle, cause 30 à 50% de pertes sur les plants touchés. En 2009, le carbendazime, fongicide le plus utilisé contre sclérotinia, a été interdit suite à l'apparition de résistances. Des solutions alternatives doivent être développées ; en effet, peu de fongicides sont autorisés (carboxamides, triazolés, strobilurines) afin de lutter contre sclérotinia. Un agent de biocontrôle existe (Contans®WG) mais montre une activité restreinte. Il existe donc un clair besoin de solutions alternatives. La situation pour la vigne n'est guère meilleure. Une contrainte s'ajoute dans le cas de la vigne : en effet, chaque intrant utilisé au vignoble impacte les qualités du vin, produit final. La sensibilité à l'oïdium, au mildiou et à la pourriture grise (*Botrytis*) dépend grandement du cépage. En plus de la perte de productivité, la quantité de sarments malades influe directement sur les qualités organoleptiques du vin. Il est donc nécessaire de contrôler parfaitement la qualité et la quantité des intrants au vignoble.

Prenant en compte la prévalence des différents pathogènes sur les cultures et l'impact économique engendré, il existe un besoin évident de solutions innovantes pour protéger le blé, le colza, le tournesol et la vigne et garantir aux consommateurs à la fois la quantité et la qualité des produits alimentaires résultant de ces cultures.

Dans ce cadre, de façon transdisciplinaire, nous proposons de développer des fongicides biosourcés ou des stimulateurs de défense des plantes visant spécifiquement les pathogènes végétaux mais n'ayant aucun impact résiduel sur l'environnement ou la santé humaine.

Notre approche

Nous avons donc mis en place un réseau de collaborateurs afin de 1) synthétiser différents composés à partir de bioressources en minimisant les étapes de synthèse et en privilégiant des groupements facilement clivables dans les sols ; ii) tester les différents composés sur les pathogènes de 3 grandes cultures (blé, colza, vigne) ; iii) évaluer l'activité biologique éventuelle sur différents modèles (cellules humaines des différents organes, *C. albicans*, *C. elegans* et souris) ; iv) évaluer la dégradation dans les sols après l'action sur la plante. Ce programme regroupe 5 équipes de chercheurs, allant des chimistes aux biologistes et cliniciens et a l'appui d'un partenaire industriel. Les expertises complémentaires devraient permettre une approche originale sur cette thématique de recherche dont les applications pourraient bénéficier à l'ensemble de la société.

Le projet BIFUN sera divisé en trois principales tâches. La première concernera la conception de composés biosourcés potentiellement fongicides et/ou stimulateurs de défense des plantes. La seconde évaluera l'activité biologique des produits issus de la tâche 1 sur les différents pathogènes. La troisième sera consacrée à l'évaluation de la toxicité des composés (*in vitro* et *in vivo*) ainsi qu'à leur métabolisme.

AXE 1 : CONCEPTION DES AGENTS ANTIFONGIQUES/STIMULATEURS

Alors que nous proposons de promouvoir une agriculture durable, il semble évident pour les équipes de chimistes de valoriser les bioressources disponibles et de les modifier *via* des technologies en accord avec les principes de chimie verte. En se basant sur le rapport émis par le Pôle Industries Agro-Ressources (IAR), différents réactifs biosourcés émergents ont été sélectionnés, prenant en compte leur prix ainsi que leur disponibilité. A ce titre, les acides itaconique, pyroglutamique, kojique, levulinique et γ -aminobutyrique, ainsi que la lysine et l'hydroxyméthylfurfural ont été privilégiés. Notre partenaire industriel met également à notre disposition son catalogue de produits à base oléagineuse, parmi lequel le glycérol, le monopropylène glycol et les acides gras (C6-C12) ont été choisis (Figure 14).

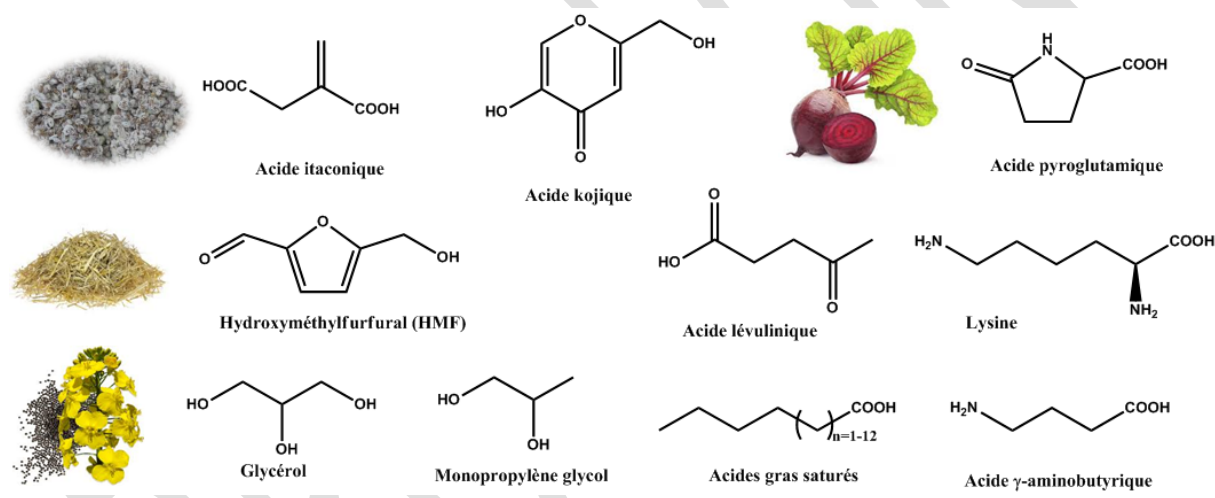


Figure 14. Composés retenus pour hémisynthèse des candidats éliciteurs/fongicides

Les concepts de la chimie pharmaceutique seront appliqués à ce projet afin de concevoir de la façon la plus rationnelle possible les composés à synthétiser, en se basant notamment sur leur taille, leur HLB (balance lipophilie/hydrophilie), leur mouillabilité ou leur ionisation, ainsi que leur toxicité potentielle et leur métabolisme. A partir de ces réactifs et en utilisant des technologies d'activation alternatives (microondes, sonication acoustique ou hydrodynamique, flux continu) couplant efficacité et économie d'énergie, différents dérivés seront synthétisés. Ces technologies seront appliquées afin d'obtenir les produits en maximisant l'économie d'atomes tout en limitant la dépense énergétique et la production de déchets. Afin de maintenir un prix de revient acceptable (<10€/ha) pour le secteur visé, nous nous limiterons à 1 à 3 étapes de synthèse. De plus, afin de préserver la biodégradabilité des composés les liaisons de type ester ou carbonate seront privilégiées et les dérivés halogénés seront évités. Selon ces directives, une librairie de composés biosourcés sera proposée pour évaluation dans les tâches 2 & 3 (lien avec Axe 2 & Axe 3).

AXE 2 : EVALUATION BIOLOGIQUE CONTRE PATHOGENES VEGETAUX

Dans un premier temps (Axe 2-1), l'activité directe des composés sur les pathogènes représentatifs du blé, du colza, du tournesol et de la vigne (*ie Zymoseptoria tritici, Botrytis cineria, Fusarium solani, Sclerotinia sclerotiorum, Phoma lingam, Plasmopara viticola, Erysiphe necator, Guignardia bidwellii, Phomopsis viticola, Eutypa lata*) sera mesurée *in vitro*. Un premier screening à 50 mg/L, en plaque 96 puits, sera réalisé, permettant de distinguer 3 groupes de produits : 1) composés inhibant >90% de la croissance du pathogène (produits biofongicides) ; 2) produits sans activité directe (inhibition < 10%) ; 3) produits d'activité modérée.

- Famille 1. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des composés fortement antifongiques sera mesurée par dilutions successives en suivant des méthodes normées (NF-EN-1275 ou ISO 16256). Le profil d'inhibition sera évalué par mesure cinétique de l'activité (effet fongicide ou fongistatique) et confirmé en boîte de Pétri. Nous pourrons ainsi mesurer si les composés sont spécifiques de certains pathogènes ou au contraire à large spectre. Ces activités seront confirmées *in planta* en serre.
- Famille 3. Les composés obtenus seront utilisés pour l'établissement des RSA et pourront être publiés.
- Famille 2. Les produits dénués d'action directe sur les pathogènes pourront être évalués pour leur action de stimulation de défense des plantes (Axe 2-2).

Dans un second temps (Axe 2-2), l'activité indirecte des composés sur feuilles coupées (stimulation *in vitro*) ou sur plants (*in planta*) sera mesurée. Cette approche permettra de distinguer les composés stimulateurs de défense des plantes. Lors de cette étude, la concentration de travail ainsi que la formulation seront à étudier afin d'optimiser l'application et le potentiel transfert au champ. Pour les aspects formulations, l'expertise du partenaire industriel sera essentielle.

AXE 3 : EVALUATION DE LA TOXICITE ET DU DEVENIR DES PRODUITS

L'axe 3 vise à évaluer de façon précoce la toxicité humaine, animale et environnementale des composés ainsi que leur devenir (métabolisme et biodégradabilité).

- Toxicité humaine : la toxicité vis-à-vis de la santé humaine sera évaluée en mesurant l'activité des composés sur différentes lignées cellulaires représentatives des différents organes (cellules HEK293 pour le rein, MRC-5 pour les poumons, Caco2 pour l'intestin, THLE-3 pour le foie, BJ pour les cellules de la peau). De plus, l'impact de ces produits sur le système immunitaire et l'inflammation sera évalué par mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que l'interleukine IL-1 β .
- Toxicité sur modèle murin : les composés sélectionnés seront donnés par gavage aux souris à différentes concentrations afin de déterminer leur éventuelle toxicité. Le poids des souris, ainsi que leur score clinique d'inflammation ont mesurés quotidiennement durant la durée du protocole. Les

paramètres inflammatoires, en particulier la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et IL-6) seront quantifiés dans des prélèvements de sérum et des biopsies de côlon.

- Toxicité pour l'environnement : *C. elegans*, nématode vivant dans les sols tempérés, sera utilisé pour évaluer la toxicité environnementale. Son comportement et sa survie aux contacts des produits seront évalués par le collaborateur 5.
- Devenir : la biodégradabilité dans les sols sera mesurée par des dosages de la production de CO₂ en suivant la norme NFX 31-222, couplée aux études des métabolites par HPLC et GC-MS. Le même type de mesure sera réalisé hors sols par le collaborateur 1 (analystes).

Pour résumer, en combinant ces différents aspects, nous aurons une vision relativement claire du potentiel des différents composés biosourcés synthétisés sur une large gamme de pathogènes. En prenant en compte la toxicité très en amont du projet, nous éviterons de porter nos efforts sur des composés n'ayant pas le profil requis pour homologation ultérieure. En profitant de la vision de l'industriel sur ce projet, nous pourrions rapidement mesurer l'intérêt de nos composés et profiter de son expertise en formulation. Globalement, ce projet permettra de fédérer la recherche en région Hauts de France et de faire le lien entre les secteurs santé humaine et santé végétale.

Ce projet a été déposé en octobre 2017 dans le cadre d'une ANR JCJC dont je suis la porteuse ainsi que pour financement aux allocations doctorales de la Région Hauts-de France. Il bénéficie du soutien de HEI-Yncréa, qui s'est engagé à financer la moitié de la thèse en cas de sélection.

En parallèle de ce projet transverse à la santé végétale et humaine, je souhaiterais développer l'axe antifongique à la santé humaine, en proposant le projet de recherche suivant : « **développement de composés mixtes antibactériens/antifongiques** ».

II. Projet de recherche – Développement de composés mixtes antibactériens/antifongiques

Problématique

« A moins que les nombreux acteurs concernés n’agissent d’urgence, de manière coordonnée, le monde s’achemine vers une ère post-antibiotiques, où des infections courantes et des blessures mineures qui ont été soignées depuis des décennies pourraient à nouveau tuer »

Dr Keiji Fukuda

Sous-directeur général de l’OMS, 30 avril 2014

1. Constat d’urgence :

Aujourd’hui, la résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème de santé publique mondiale grave et préoccupant. Malgré la mobilisation de l’Organisation Mondiale de Santé (OMS), le nombre de victimes (mortalité, morbidité) ne cesse d’augmenter, avec des prévisions de plus en plus pessimistes.¹⁶ En France, chaque année, plus de 150 000 patients sont victimes d’une infection par une bactérie multi-résistante, et plus de 12 500 personnes en meurent.¹⁷ Le constat au niveau mondial n’est pas meilleur. Cette situation, en dehors de l’aspect humain, a un impact économique non négligeable. En effet, les pertes de productivité engendrées par la résistance bactérienne sont conséquentes et s’élèveraient, d’après plusieurs études, à plus de 1,5 milliards d’euros en Europe et plus de 55 milliards de dollars aux Etats-Unis.¹⁸ Si rien n’est engagé pour lutter contre les bactéries résistantes, le coût cumulé de l’antibiorésistance dépasserait 100 000 milliards de dollars d’ici à 2050.¹⁹

Face à l’urgence, il est possible d’agir à différents niveaux :

- Préserver les antibiotiques existants : de nombreuses initiatives visent actuellement à sensibiliser les populations au bon usage des antibiotiques (par exemple : campagne publicitaire « les antibiotiques, c’est pas automatique » ; World Antibiotic Awareness Week 13-19 novembre 2017). Cependant, la lutte contre la résistance bactérienne ne peut se limiter à l’évolution vertueuse des prescriptions des professionnels de santé.
- Limiter la progression des résistances dans l’environnement : suite à la surconsommation d’antibiotiques, notamment en santé animale dans les élevages intensifs, les résidus d’antibiotiques se dispersent dans l’environnement. Effluents domestiques, activités hospitalières,²⁰ élevages ou épandages à proximité des cours d’eau, toutes ces actions peu normées exposent l’environnement dans son ensemble aux antibiotiques. L’effet réel sur l’Homme des traces d’antibiotiques retrouvées dans l’environnement est encore mal connu,

¹⁶ Propositions du groupe de travail special pour la preservation des antibiotiques ; “Tous ensemble, sauvons les antibiotiques”, Rapporteurs ; Dr Jean Carlet et Pierre Le Coz, Juin **2015**

¹⁷ Donnée issues de l’étude Burden menée en France par l’Institut de Veille Sanitaire (InVS)

¹⁸ Centers for Diseases Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States **2013** (<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>), consulté le 25/11/2017

¹⁹ <http://domino.home/html/home?target=www.rand.org/randeurope/research/projects/antimicrobial-resistance-costs.html>, consulté le 25/11/2017

²⁰ Bréchet, C.; Plantin, J. ; Sauget, M. ; Thouverez, M. ; Talon, D. ; Cholley, P. ; Guyeux, C. ; Hocquet, D. ; Bertrand, X. *Clin Infect Dis.* **2014**, *58*, 1658-1665.

mais favorise très probablement la sélection des résistances dans les milieux concernés. Il est donc important de ne pas restreindre les réflexions sur l'antibiorésistance uniquement à l'utilisation des antibiotiques chez l'homme. Le plan Ecoantibio, mis en place en 2012 en France, a déjà commencé à porter ses fruits, limitant de 12,5% l'exposition des animaux aux antibiotiques en deux ans.²¹

- Encourager les industriels à innover dans le secteur des antibiotiques : en effet, les entreprises du médicament font face à une situation paradoxale ; les antibiotiques sont des produits de haute technologie mais leur prix est peu élevé et leur utilisation doit être limitée. A ce jour, investir dans l'innovation antibactérienne n'est plus rentable. Afin d'encourager le développement de nouveaux produits innovants, il serait nécessaire de trouver un nouveau modèle médico-économique incitatif, permettant un retour sur investissement suffisant.
- Trouver de nouvelles thérapies : alors que l'antibiorésistance progresse de manière inquiétante, il est factuel qu'aucun antibiotique avec un nouveau mécanisme d'action n'a été développé depuis 20 ans.²² Compte tenu de la situation, il est donc essentiel de développer de nouvelles classes d'antibiotiques. La question restant en suspens est : quelle bactérie doit-on prioritairement viser ?

2. Quelles bactéries ?

Le 27 février 2017, l'OMS a rendu public le premier catalogue référençant les 12 familles de bactéries présentant la plus grande menace jamais évoquée pour l'humanité.²³ L'objectif majeur de ce rapport vise à harmoniser les besoins des populations et la menace représentée par l'émergence de bactéries résistantes pour lesquelles les alternatives médicamenteuses deviennent critiques, sans tenir compte de critères purement industriels tels que la pression des investisseurs, les retours sur investissement ou les parts de marché visées.

Un groupe d'experts internationaux s'est réuni et a analysé, pour chaque type de bactérie, 10 critères parmi lesquels le taux de mortalité, la prévalence de résistance, la transmissibilité, les mesures de prévention hospitalière et communautaire possibles, les traitements existants et ceux en cours de développement. A la suite de l'analyse des différentes données, 3 groupes ont été identifiés, pour lesquelles le besoin d'antibiotiques innovants est quantifié par l'OMS comme 1) critique ; 2) élevé ; 3) médian. Le [tableau 7](#) regroupe le résultat de cette analyse.

3. Décisions et avancées :

Face à cette menace planétaire, plusieurs agences nationales et internationales ont inscrits l'antibiorésistance parmi leurs priorités. Ainsi, le 26 mai 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé a adopté un Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens.²⁴ De même, les gouvernements se mobilisent à l'échelle mondiale. Pour la première fois, une stratégie de lutte sur cinq ans (2016-2020) a été débloquée aux Etats Unis en augmentant significativement les financements fédéraux. Le Royaume Uni a annoncé la création du Fond Fleming – 195 millions de livres - visant à créer un réseau mondial de surveillance des épidémies et des moyens d'y répondre dans les pays à revenus faibles à modérés.

²¹ Plan Ecoantibio : <http://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2017>, consulté le 26/11/2017

²² Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1057-1098.

²³ WHO, « Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics », published on-line 02.27.2017, consulté le 15/11/2017.

²⁴ http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_R7-fr.pdf, consulté le 15/11/2017.

Au-delà des mesures adoptées par chaque état, seule l'adoption d'une stratégie mondiale et d'actions concrètes communes dans le cadre de conférences internationales, tels que le G7 ou le G20, permettra de lutter contre l'antibiorésistance, au moyen d'une approche globale incluant les Hommes, les animaux et l'environnement. En effet, seule une démarche « One Health » permettra de lutter efficacement contre la résistance bactérienne. Compte tenu de la dynamique de l'antibiorésistance, négliger le moindre réservoir de vie reviendrait à agir en vain à long terme.

Tableau 7. Classement priorisé des bactéries.

CRITIQUE	<p><i>Acinetobacter baumannii</i>, carbapenem-resistant</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i>, carbapenem-resistant</p> <p><i>Enterobacteriaceae</i>, carbapenem-resistant, 3rd generation cephalosporin-resistant ie <i>Klebsiella pneumonia</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Proteus spp.</i> And <i>Providencia spp.</i>, <i>Morganella spp.</i></p>
ELEVE	<p><i>Enterococcus faecium</i>, vancomycin-resistant</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>, methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant</p> <p><i>Helicobacter pylori</i>, clarithromycin-resistant</p> <p><i>Campylobacter</i>, fluoroquinolone-resistant</p> <p><i>Salmonella spp.</i>, fluoroquinolone-resistant</p> <p><i>Neisseria gonorrhoeae</i>, 3rd generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant</p>
MEDIAN	<p><i>Streptococcus pneumonia</i>, penicillin-non-susceptible</p> <p><i>Haemophilus influenzae</i>, ampicillin-resistant</p> <p><i>Shigella spp.</i>, fluoroquinolone-resistant</p>

4. Mais ces bactéries sont-elles notre seul souci ?

Conséquences directes de cette résistance, les infections nosocomiales touchent un patient sur 20 hospitalisés en France. Nous nous sommes alors intéressés à l'incidence des bactéries jugées critiques par l'OMS et nous avons étudié les pathogènes responsables de la majorité des infections nosocomiales en France et dans le monde. Nous avons alors découvert que le 4^{ème} agent responsable d'infections nosocomiales n'était pas une bactérie, mais une levure, bien connue du grand public : *Candida albicans*. Les microorganismes de type *Candida* sont les plus communs des champignons coexistants au sein de notre organisme avec les bactéries. Jusqu'à 70% des personnes sont porteuses saines d'un champignon de type *Candida*, principalement niché au sein des muqueuses buccales, vaginales et sur la peau.²⁵ Parmi les 150 espèces de *Candida* répertoriées, *Candida albicans* est le pathogène responsable des principales infections chez l'homme, notamment immunodéprimé. Les infections opportunistes locales ou systémiques par *Candida albicans* se sont rapidement répandues et représentent entre 8 et 10% des infections sanguines hospitalières.²⁶ Cette levure, relativement

²⁵ Abu-Elteen, K.; Hamad, M. *Jordan J Biol Sci* **2012**, *5*, 215-230.

²⁶ Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 133-163.

atypique, provoque des candidémies avec une mortalité proche de 40%. Il est notable que la virulence de *Candida* s'acquière *via* différents mécanismes, parmi lesquels la composition du microbiote du patient ainsi que son immunité joue un rôle important. *Candida albicans* est également fréquemment identifiée conjointement avec certaines bactéries pathogènes, notamment *S. aureus* et *E. coli*, chez les patients atteints d'infections nosocomiales. Le rôle des bactéries dans l'acquisition de la virulence des levures est encore mal connu.

En effet, les microorganismes de type *Candida* sont capables d'exister en tant que biofilm sur les surfaces biotiques et abiotiques. Des données récentes montrent que certaines bactéries peuvent évoluer de façon à créer des relations additives voire synergiques avec *Candida* afin de faciliter la cohabitation sur les surfaces épithéliales et les blessures profondes. Certaines, à contrario, établissent un mode antagoniste et entrent en compétition avec *Candida* pour la possession de la surface. Ainsi, les bactéries peuvent atténuer ou au contraire augmenter l'invasion par le champignon ainsi que sa virulence. De façon réciproque, *Candida* est également capable d'accroître la virulence de certaines bactéries.²⁷ La cohabitation des microorganismes au sein des mêmes biofilms crée des environnements polymicrobiens généralement délétères pour le patient.

Suite à ces différents constats, il semble évident qu'antibactériens comme antifongiques sont des produits essentiels à la survie de l'être humain, pour lesquels de nouvelles familles médicamenteuses sont particulièrement recherchées. En raison des interactions existantes entre *Candida albicans* et certaines bactéries, il semble judicieux de proposer des composés capables d'inhiber à la fois la croissance bactérienne et fongique. Dans le cas d'une action synergique, cela permettra d'éradiquer les deux pathogènes incriminés avec un seul composé, diminuant ainsi le risque de résistance croisée liée à une polythérapie ainsi que le délai de traitement généralement observé dans les candidémies. Dans le cas d'une action antagoniste, il est également utile d'ajouter un antifongique à l'antibactérien. En effet, lors de la disparition de la bactérie sous l'effet du traitement, le champignon serait libre de proliférer sans contrainte, transformant potentiellement une bactériémie en candidémie, dont le pronostic vital pour un sujet immunodéprimé n'est pas meilleur. En conséquence, notre projet repose sur le développement d'inhibiteurs mixtes antibactériens/antifongiques.

Naturellement, cette approche ne s'adressera qu'aux populations identifiées comme particulièrement à risques, pour lesquelles des traitements prophylactiques antifongiques et antibactériens sont communément prescrits (réanimation, services de chirurgie lourde, notamment digestive, grands brûlés...)

Afin d'enrichir notre réflexion, nous avons également étudié :

- Les différences/similarités entre bactéries et champignons/levures
- Les antifongiques et antibactériens existants et leurs limitations
- *Candida albicans* et *Acinetobacter baumannii* spécifiquement, leur prévalence, pathogénicité et traitements associés

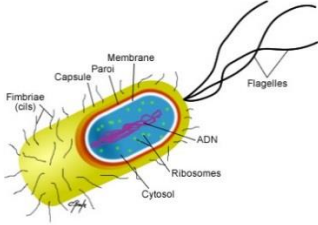
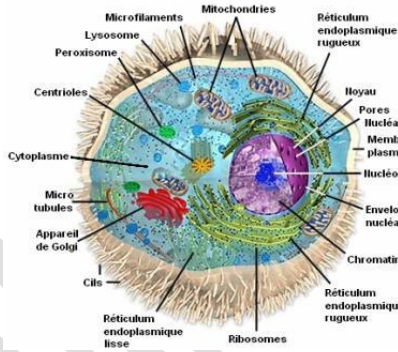
Ces différentes études mèneront à la présentation de notre approche pour le développement de composés mixtes antifongiques/antibactériens ainsi qu'aux premiers résultats et perspectives de travail pour les années à venir.

²⁷ Allison, D.; Willems, H.; Jayatilake, J.; Bruno, V.; Peters, B.; Shirliff, M. *Microbiol. Spectrum* **2016**, 4(3), 11-26.

Bactéries versus Champignons

Les bactéries sont des **procaryotes** alors que les champignons sont des **eucaryotes**. De ce fait, de nombreuses différences dans leur structure existent (Tableau 8).

Tableau 8.

	Procaryotes	Eucaryotes
		
Représentants	bactéries	champignons
Taille	0,3-2,5 µm	2-20 µm
Type de noyau	nucléotide ou plasmide	Véritable noyau avec une enveloppe
ADN	Généralement 1 seul chromosome de forme circulaire	Plusieurs chromosomes de forme linéaire
Localisation de l'ADN	Peu organisé (pas de noyau)	Associé aux histones (chromatine) dans le noyau
ARN/synthèse des protéines	Transcription de l'ADN et traduction simultanées et au même endroit	Synthèse d'ARN dans le noyau Synthèse des protéines dans le cytoplasme
Structure cytoplasmique	Très peu de structures	Très structuré par des membranes intracellulaires et un cytosquelette
Mouvement de la cellule	Flagelle fait de flagelline	Flagelle et cils fait de tubuline
Division de la cellule	Division simple	Recours à la mitose (division complexe)
Présence d'organites intracellulaires	aucune	Oui, mitochondries, appareil de Golgi, réticulum...
Membranes contenant des stérols	aucune	Souvent présentes

Les cellules eucaryotes possèdent un noyau qui est l'organe le plus volumineux et qui est délimité par une double membrane appelée enveloppe nucléaire. Dans le noyau se réalise la réplication et la transcription de l'ADN ; la traduction se fait dans le cytoplasme de la cellule. Ils ont des cloisonnements cytoplasmiques permettant la formation des organites (noyau réticulum endoplasmique, appareil de golgi, lysosomes, peroxysomes et vésicules), ces organites nagent dans le cytosol qui chez les eucaryotes est fluide avec présence de flux grâce au cytosquelette. Les membranes plasmiques ne sont pas doublées d'une paroi pour les animaux, mais doublées pour les végétaux (paroi pecto-cellulosique) et pour les champignons (paroi polysaccharidique) ; dans tous les cas il y a absence de peptidoglycane mais présence de stérols.

Les Antibactériens existants

Différentes familles d'antibactériens existent, identifiées selon leur mode d'action. Pour compléter son action, un antibiotique doit atteindre et reconnaître sa cible ainsi qu'y persister à une concentration suffisante. On dénombre six cibles clairement identifiées : la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, le ribosome, l'ARN Polymérase, l'ADN et la synthèse de l'acide folique. Dans un souci de simplification, les différentes familles d'antibiotiques seront présentées selon la cible associée. Le schéma suivant résume les différentes familles de molécules et leur cible bactérienne.

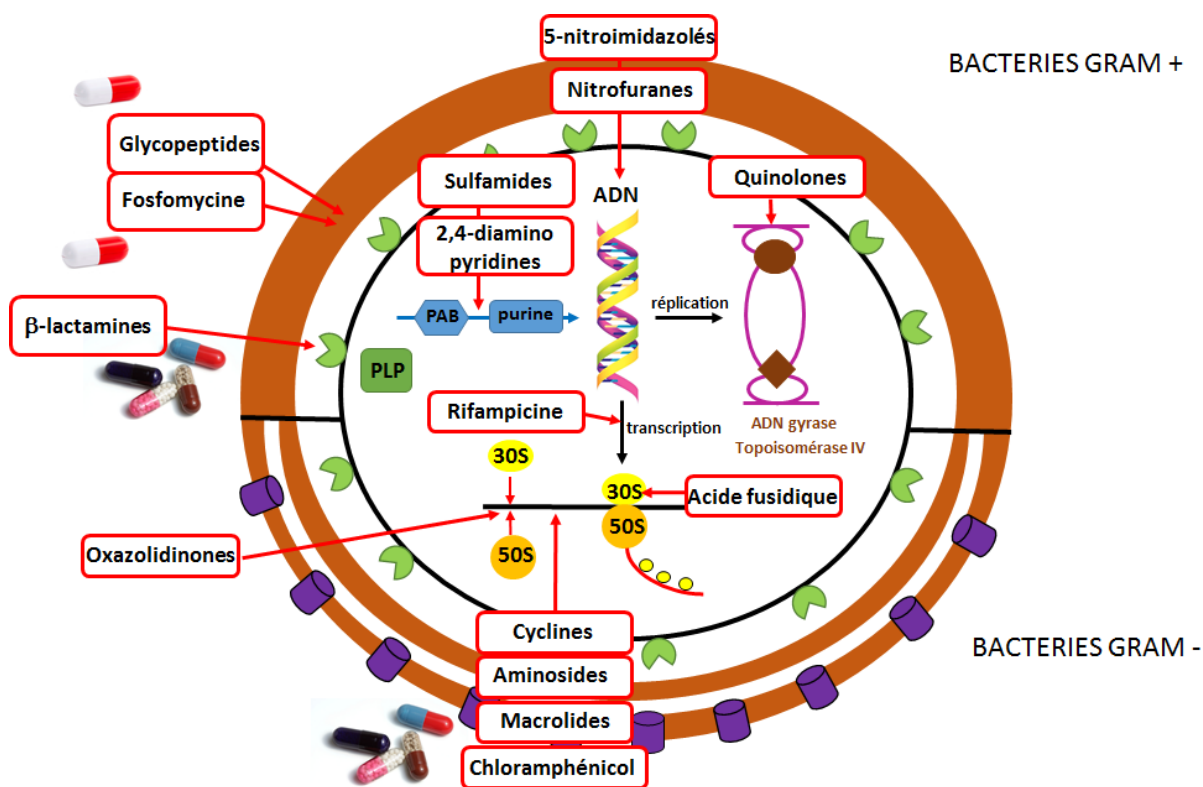


Schéma 17. Résumé des différentes familles d'antibactériens.

1. Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

a. Les β -lactamines:

Cette famille est composée des pénicillines, des céphalosporines et des carbapénèmes. Tous les composés comportent un noyau β -lactame (voir Figure 15). Les β -lactames bloquent la synthèse du peptidoglycane de la paroi. Ce peptidoglycane forme un maillage qui entoure la bactérie et lui confère sa forme et sa rigidité. Il occupe une position différente selon que la bactérie est une bactérie à gram (+) ou une bactérie à gram (-). Mais dans tous les cas, ce peptidoglycane est étroitement lié aux processus de croissance et de division cellulaire de la bactérie.

Dans un premier temps, les lactames doivent traverser la paroi bactérienne, pour ensuite aller se fixer sur des protéines cibles de la membrane plasmique appelées PLP pour Protéines liant les Pénicillines. Ces PLP sont en fait des enzymes, transpeptidases, transglycosylases et carboxypeptidases, impliquées dans la synthèse du peptidoglycane.

Les lactames se fixent très facilement sur ces PLP parce qu'elles possèdent une analogie structurale avec un constituant du peptidoglycane en formation qui est un substrat naturel de ces enzymes. Il s'agit du dipeptide D-alanyl-D-alanine : D-Ala-D-Ala.

Les lactames vont donc se fixer sur ces protéines enzymatiques, vont subir une ouverture de cycle et bloquer le fonctionnement de ces enzymes. Elles agissent donc en substrat « suicide ». Ce mécanisme va permettre de bloquer la synthèse du peptidoglycane. Dans un second temps, le peptidoglycane est alors dégradé sous l'action d'autolyses, ce qui finalement entraîne la lyse bactérienne et donc un effet bactéricide.

Lorsque la cible est atteinte, c'est-à-dire les PLP, la fixation des β -lactames se fait sur 3 sites principaux:

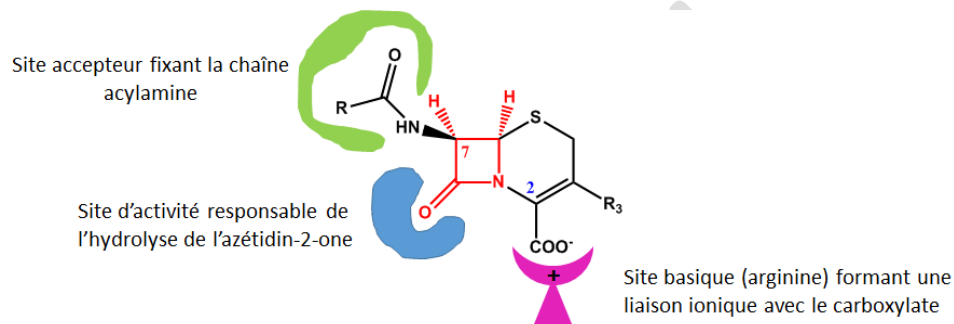


Figure 15. Sites de fixation des β -lactamines

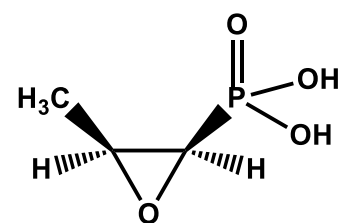
b. Glycopeptides

Les glycopeptides agissent par inhibition de la synthèse du peptidoglycane par fixation sur le résidu D-Ala-D-Ala empêchant l'action des PLP par encombrement stérique. Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres. Les glycopeptides sont au même titre que les β -lactames des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Leur action est toutefois différente : ils se fixent au niveau des extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques lorsqu'ils émergent de la membrane cytoplasmique, durant leur transport à travers celle-ci, et inhibent ainsi les étapes de transglycosylation et de transpeptidation, nécessaire à la bonne synthèse du peptidoglycane. Les principaux glycopeptides comprennent la vancomycine, la téicoplanine et la ristocétine.

Les glycopeptides sont lentement bactéricides, essentiellement sur les bactéries Gram (+) (les staphylocoques, y compris les souches résistantes à la méthicilline (MRSA), les streptocoques, y compris les entérocoques, *Clostridium difficile* ...). Ils présentent, *in vitro*, une synergie avec les aminoglycosides.

c. Fosfomycine

La fosfomycine est un antibiotique de type acide phosphonique à large spectre produit par certaines espèces de *Streptomyces*. La fosfomycine agit par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. En effet, la fosfomycine se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe l'enzyme pyruvyl-transférase, ce qui a pour conséquence de bloquer la formation d'acide N-acétylmuraminique, l'un des constituant essentiels du peptidoglycane de la paroi bactérienne.



Fosfomycine

Le mode d'action de la fosfomycine nécessite sa pénétration intracytoplasmique qui se fait par un transport actif (système de transport de l' α -glycérophosphate et des hexoses monophosphates). L'absence ou l'inactivation (par mutation chromosomique) de ce système de transport actif provoque une résistance à la fosfomycine. La fosfomycine étant assez mal absorbée au niveau digestif elle est le plus souvent administrée par voie parentérale.

En revanche, cet antibiotique, de par son faible poids moléculaire (138 Da) présente une bonne diffusion tissulaire (ce qui la rend indiquée dans le traitement des infections de localisation cérébro-méningée ou ostéo-articulaire), se lie peu aux protéines plasmatiques (10 % seulement) et n'est pas métabolisé. Ainsi, il est éliminé à plus de 80 % en 12 heures par voie urinaire et constitue donc un antibiotique de choix dans le traitement d'infections urinaire (cystite aiguë) à bactéries Gram (+) (staphylocoque doré) ou Gram (-) (*Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*...).

2. Interaction avec l'ADN

a. Sulfamides et 2,4-diaminopyridines

Les sulfamides sont des molécules bactériostatiques de synthèse. Aujourd'hui, ils sont souvent combinés aux 2,4-diaminopyridines, autres molécules bactériostatiques, afin d'augmenter leur activité et réduire le risque d'émergence de souches résistantes. Il est à noter que l'association sulfamide-diaminopyridine est bactéricide.

Les sulfamides sont des dérivés de l'acide para-aminobenzène sulfonique, dont plusieurs familles de dérivés sont disponibles.

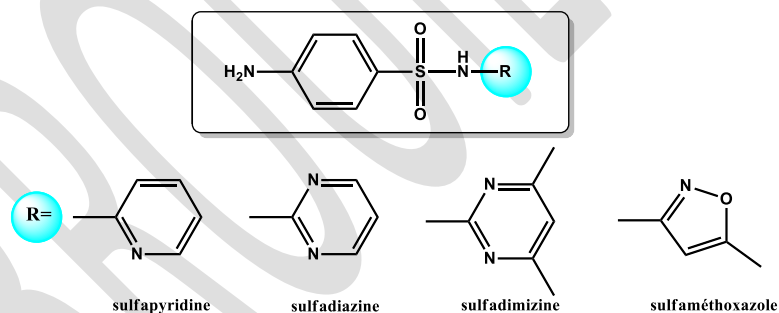


Figure 16.

Les 2,4-diaminopyridines sont à l'origine des composés antiparasitaires, dont les substituants du cycle diaminopyridine ont été modifiés. En raison de leur structure proche de celle de l'acide folique, les sulfamides et les diaminopyridines inhibent la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, cofacteur de la synthèse ultérieure des bases puriques et pyrimidiques, selon le schéma suivant :

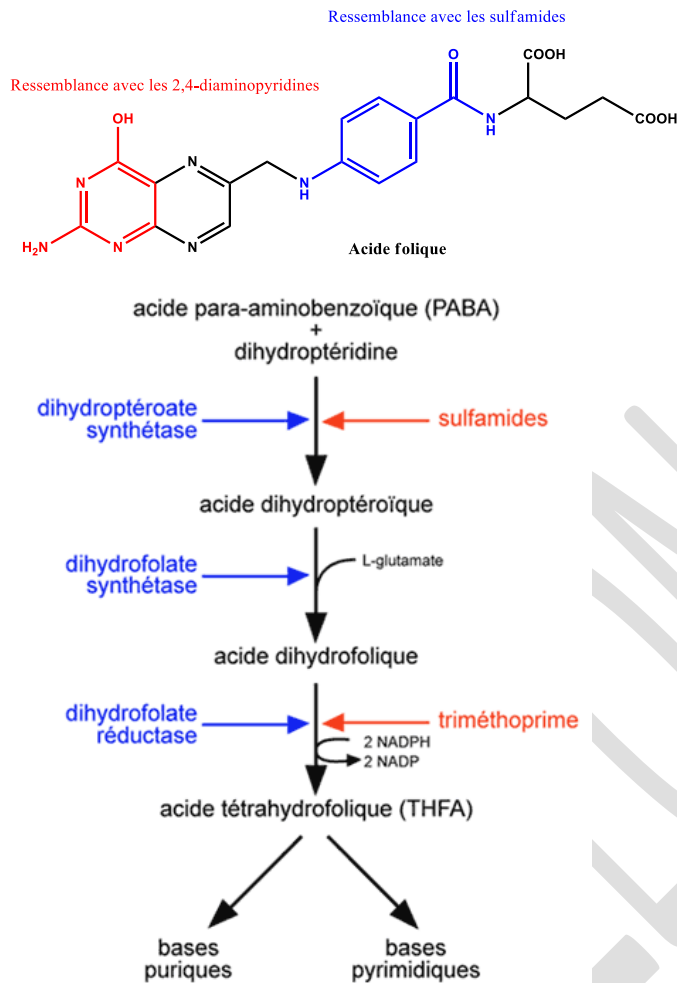


Schéma 18.

Les sulfamides et les diaminopyridines agissent successivement au niveau de la synthèse de l'acide folique. Les 2,4-diaminopyridines, en tant qu'analogues de l'acide dihydrofolique, inhibent spécifiquement la dihydrofolate réductase bactérienne. La sélectivité d'action des sulfamides provient du fait que les bactéries doivent synthétiser leur acide folique par cette voie métabolique, alors que les eucaryotes assimilent directement l'acide folique apporté par l'alimentation.

b. Nitrofuranes

Les nitrofuranes ne présentent une concentration thérapeutique que dans le rein et l'urine, ce qui limite leur usage aux infections localisées à ces niveaux. Les nitrofuranes possèdent en commun un noyau furane substitué en position 5 par une fonction -nitro indispensable à l'activité antibiotique. Les nitrofuranes acquièrent leur activité antibactérienne après la réduction enzymatique de leur fonction -nitro, catalysée par des réductases bactériennes, ce qui assure leur spécificité d'action. Une fois activés métaboliquement, ces antibiotiques inhibent des enzymes impliqués dans la dégradation du glucose et du pyruvate. De plus, certaines de leurs formes réduites possèdent un pouvoir alkylant et pourraient causer des dommages à l'ADN et aux protéines. Les nitrofuranes présentent un antagonisme avec les fluoroquinolones et une synergie avec les tétracyclines vis-à-vis des coques à Gram (+).

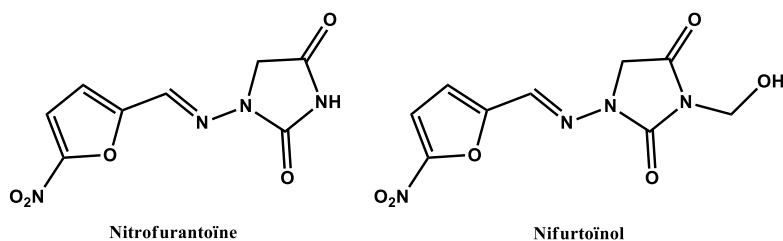


Figure 17.

c. 5-nitroimidazolés

Les 5-nitro-imidazoles sont des dérivés semi-synthétiques provenant de la modification du 2-nitro-imidazole, l'azomycine, produite par *Streptomyces*. Leur action antibactérienne a été découverte fortuitement, car les dérivés de l'imidazole étaient avant tout utilisés comme des composés antiparasitaires. En effet, le métronidazole, premier composé de la famille des 5-nitro-imidazoles commercialisé en 1959 pour le traitement des infections à *Trichomonas vaginalis* s'est avéré être actif envers les bactéries anaérobies. Par rapport aux dérivés imidazolés qui possèdent uniquement une activité antifongique ou antiparasitaire, c'est l'addition d'un substituant nitro en position 5 qui confère à ces molécules l'activité antibactérienne ciblée spécifiquement sur les bactéries anaérobies. Après pénétration dans la bactérie par simple diffusion, l'antibiotique est activé par réduction de son groupement -nitro en position 5. Cette réduction n'a lieu que chez les bactéries anaérobies qui sont à même d'opérer des réactions d'oxydo-réduction en absence d'oxygène et à un potentiel rédox adéquat permettant la réduction du groupement -nitro. L'enzyme bactérienne pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase est indispensable à cette réduction, qui se fait au dépend de celle d'autres composants de la chaîne de transfert d'électrons (NAD et NADP). Les nitro-imidazoles jouent en fait le rôle d'un piège à électrons.

Toutes les bactéries anaérobies sensibles aux 5-nitro-imidazoles expriment cette enzyme, alors que les anaérobies résistantes naturellement en sont dépourvues. La production subséquente d'ions de type anion superoxyde et anion radical -nitro, est susceptible d'endommager l'ADN bactérien.

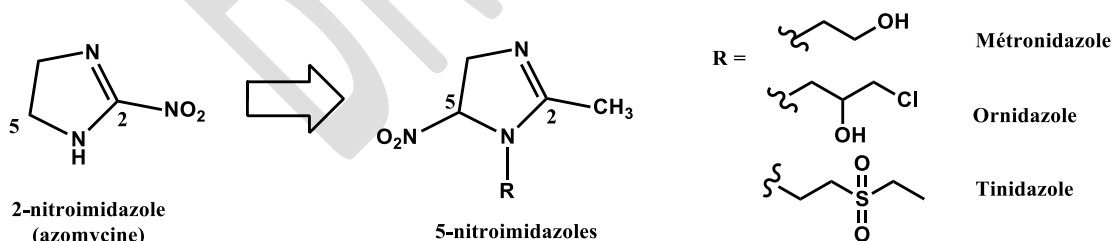


Schéma 19.

d. Quinolones

En 1958, les chercheurs identifièrent l'activité bactéricide d'un produit secondaire obtenu lors de la synthèse de la chloroquine : la 7-chloroquinoléine. En 1962, la première quinolone directement dérivée de la 7-chloroquinoléine vit le jour : l'acide nalidixique, indiqué pour le traitement des infections du tractus urinaire par certains bacilles Gram (-). Rapidement,

d'autres dérivés furent synthétisés à partir du noyau naphtyridine de l'acide nalidixique : ainsi, une substitution en position 7 par la pipérazine aboutit à des composés, tel l'acide pipémidique (Pipram®), montrant une demi-vie augmentée, et actifs notamment contre *Pseudomonas aeruginosa*. Ce n'est que dans les années 80 qu'apparurent les fluoroquinolones, après incorporation d'un atome de fluor en position 6 et un retour au noyau de type quinoléine. Ces composés ont montré une activité accrue envers les germes Gram (+) (schéma 20).

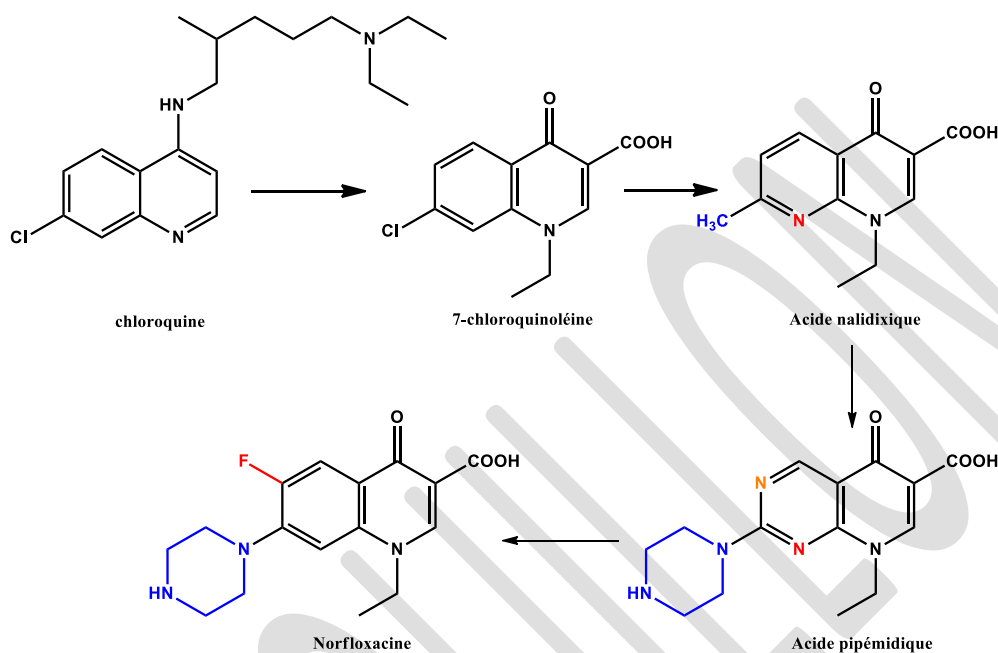
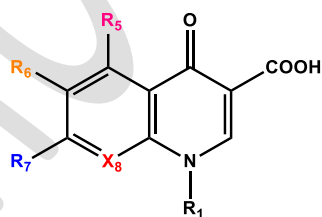


Schéma 20.

Les fluoroquinolones se sont diversifiées tout en conservant une structure de base qui est la suivante :



La présence d'une fonction acide carboxylique en position 3, ainsi que d'un atome d'oxygène exocyclique en position 4 sont nécessaires à l'activité de l'antibiotique et ces groupements ne sont jamais modifiés.

Position 1 : la nature de la chaîne latérale en position 1 affecte grandement l'efficacité antibiotique. Ainsi, un groupement cyclopropyle confère une bonne activité envers les germes Gram (-). Un cycle reliant les positions 1 et 8 est observé dans la levofloxacine et l'ofloxacine.

Position 5 : La plupart des fluoroquinolones ne présente qu'un atome d'hydrogène à cette position. En effet, un substituant de grande taille en position 5 entraîne souvent une

diminution d'activité. Certains substituants (-CH₃, -NH₂) confèrent une bonne activité envers les germes Gram (+)

Position 6 : L'addition d'un fluor en 6 accroît très significativement l'activité par rapport aux dérivés originaux (acide nalidixique).

Position 7 : La nature de la chaîne latérale en position 7 affecte grandement l'efficacité antibiotique. Des hétérocycles de type piperazine et amino-pyrrolidine, provoquent une augmentation d'activité. Des noyaux bicycliques (second noyau fusionné à un noyau pyrrolidine par exemple) en position 7, confèrent une bonne activité envers les germes Gram (+)

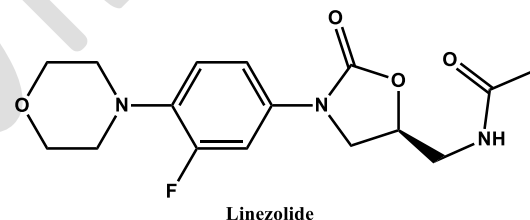
Position 8 : De nombreuses fluoroquinolones ne présentent qu'un atome d'hydrogène à cette position. Un substituant de type méthoxy confère une bonne activité envers les germes anaérobies.

Les quinolones actuelles dérivent d'acides carboxyliques hétérocycliques que l'on peut classer en 4 grands groupes : les dérivés de la quinoléine ; les dérivés de la naphthyridine, les dérivés de la cinnoline et les dérivés de la pyrido-2-3-pyrimidine. Les quinolones ont pour cible la topoisomérase IV ainsi que l'ADN-gyrase bactérienne (enzyme de la classe des topoisomérases de type II).²⁸

3. L'ARN et la synthèse protéique

a. Oxazolidinones

En 1987, les premiers composés de la classe des oxazolidinones apparaissent, développés par la firme DuPont de Nemours afin d'être actifs envers les germes Gram (+). Ils agissent en inhibant la synthèse protéique en empêchant la formation du complexe d'initiation 70 S de la traduction (formé de la sous-unité 50 S, de la sous-unité 30 S et de l'ARNm, et enfin de l'ARN de transfert). Le Linezolid est le seul représentant de cette classe utilisé en clinique.²⁹



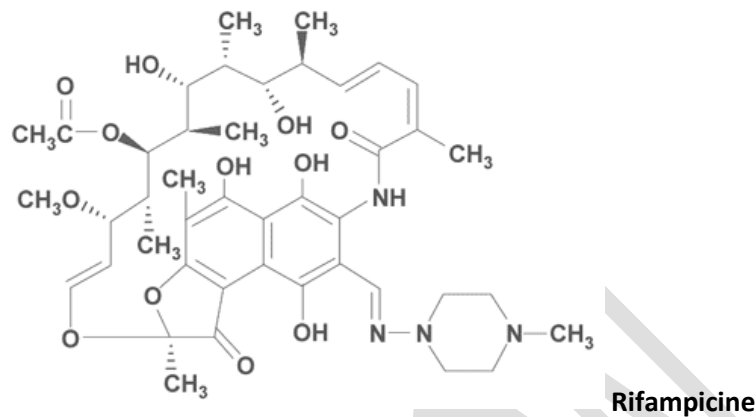
b. Rifampicine

Les ansamycines de type naphthalène constituent une famille de composés chimiques douée d'activité antibactérienne ou antivirale, parmi lesquelles on retrouve les rifamycines, isolées à partir de 1957 de la bactérie *Nocardia mediterranei*. Parmi les composés isolés, la rifamycine B s'avéra active envers les germes Gram (+), *Mycobacterium tuberculosis* ainsi que quelques germes Gram (-).

²⁸ Lescher, G.Y.; Froelich, E.D.; Gruet, M.D.; Bailey, J.H.; Brundage, R.P. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *5*, 1063-1068.

²⁹ a) Slee, A.M.; Wuonola, M.A.; McRipley, R.J.; Zajac, I.; Zawada, M.J.; Bartholomew, P.T.; Gregory, W.A.; Forbes, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 1791-1797; b) Norrby, R. *Exp. Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 1-10.

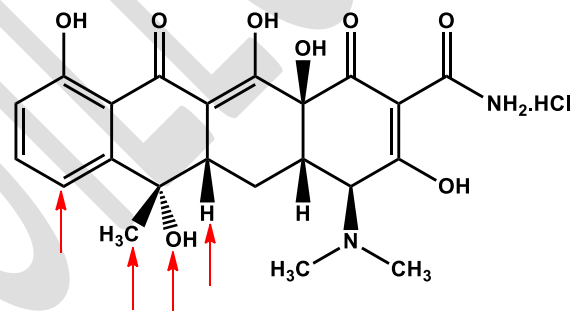
La rifampicine (ou N-amino-N'-méthylpipérazine-hydrazone), qui est un composé semi-synthétique issu de la rifamycine B, montra l'activité la plus élevée, ainsi que la plus faible toxicité. Il est aujourd'hui l'un des médicaments de choix des infections à mycobactéries.



c. Cyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques isolés de souches de *Streptomyces*, aujourd'hui obtenus par hémisynthèse. Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'aminocyl-ARNt à la sous unité 30 S du ribosome bactérien. Ce sont des composés bactériostatiques à très large spectre. Néanmoins, leur usage est aujourd'hui limité par l'émergence de résistances.

Les tétracyclines doivent leur nom à leur structure tétracyclique commune (noyau naphtacène-carboxamide), sur laquelle viennent se greffer des substituants au niveau des positions identifiées. La HLB des tétracyclines est modulée par les substituants intégrés. L'hydrophobicité résultante, propre à chaque molécule, va régir la pharmacocinétique du composé et surtout sa distribution tissulaire.



Tétracyclines et sites de modification

En fonction de leur temps de demi-vie, on peut distinguer les tétracyclines :

- de première génération : chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline, déméclocycline
- de deuxième génération : doxycycline, minocycline.

d. Aminosides

Les premiers aminosides découverts l'ont été en tant que molécules naturelles, produites par des souches de *Streptomyces* (streptomycine, néomycine, kanamycine, tobramycine) ou d'*Actinomyces* (gentamicine, sisomicine).

Ces composés naturels ont servi de base pour l'élaboration de produits semi-synthétiques (amikacine, isépamicine, nétilmicine), développés afin d'obtenir des molécules insensibles à l'inactivation par les bactéries devenues résistantes aux aminoglycosides naturels. Ces composés se sont aussi avérés moins toxiques que les composés de base. Les aminoglycosides sont des molécules polaires et polycationiques. Leur structure de base commune comporte un aminocyclitol, auquel se lient par des ponts glycosidiques, 2 (ou exceptionnellement 3) oses. Ces cycles peuvent porter des substituants dont les plus importants sont les groupes hydroxyles et les groupes basiques. Les aminoglycosides sont des

antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique, suite à leur fixation sur la sous-unité 30 S du ribosome bactérien.

e. Macrolides³⁰

Les macrolides sont constitués par un macrocycle porteur d'une fonction lactone, sur laquelle viennent se greffer deux ou plusieurs sucres dont l'un est aminé. En raison de la présence d'une et parfois de deux amines, les macrolides sont des molécules basiques. Ils agissent par fixation sur la sous-unité 50 S du ribosome et blocage de l'élongation. Les macrolides sont classés en fonction de la taille de leur macrocycle: 14 atomes (érythromycine, oléandomycine, troléandomycine, roxithromycine, clarithromycine), 15 atomes (azithromycine) ou 16 atomes (spiramycine, carbomycine, miocamycine).

Certains composés sont naturels (tel que l'érythromycine, isolé aux Philippines de *Streptomyces erythreus*) alors que d'autres sont semi-synthétiques.

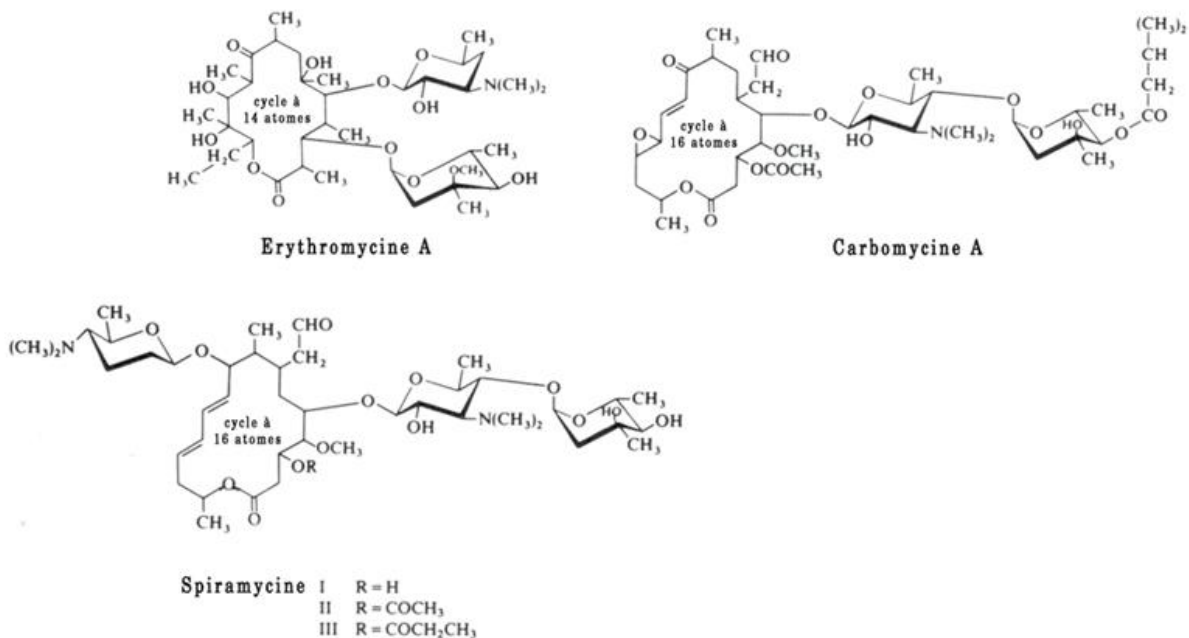


Figure 18. Structure de quelques macrolides.

f. Phénicolés

Les phénicolés sont des antibiotiques potentiellement utiles en raison de leur large spectre et de leur bonne pénétration dans le système nerveux central, mais dont l'usage est actuellement limité par leur toxicité médullaire. Ce sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs d'un groupement phényle substitué. Deux molécules seulement sont utilisées en clinique : le chloramphénicol, réservé à l'usage topique en raison de sa toxicité, et le thiamphénicol.

³⁰ a) Blondeau, J.M.; DeCarolis, E.; Metzler, K.L.; Hansen, G.T. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11*, 189-215; b) Zhanel, G.G.; Walters, M.; Noreddin, A.; Vercaigne, L.M.; Wierzbowski, A.; Embil, J.M.; Gin, A.S.; Douthwaite, S.; Hoban, D.J. *Drugs* **2002**, *62*, 1771-1804; c) Zhong, P.; Shortridge, V. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2001**, *1*, 125-131.

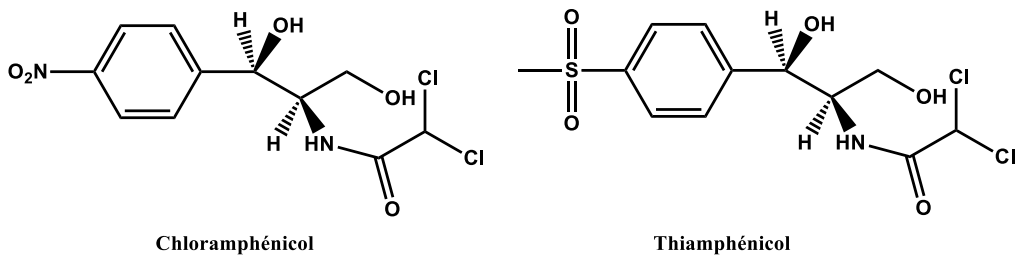


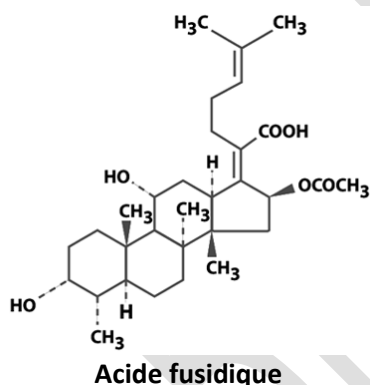
Figure 19.

Comme les macrolides et les lincosamides, les phénicolés se fixent à la sous-unité 50 S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation, et donc la réaction de transpeptidation.

L'action du chloramphénicol n'est pas tout à fait spécifique, dans la mesure où elle peut également s'exercer dans les cellules de mammifères, et plus particulièrement, les cellules souches hématopoïétiques.

g. Acide fusidique

Dans les années 1960-1970, un composé issu de la fermentation du champignon *Fusidium coccineum* s'avéra actif envers les staphylocoques, et fut appelé acide fusidique. La structure générale de l'acide fusidique est très voisine de celle des hormones stéroïdes. Toutefois, cet antibiotique est complètement dépourvu d'effet hormonal.



L'acide fusidique s'avère bactériostatique à faibles doses et bactéricide à des doses plus élevées. Cet antibiotique agit en inhibant la synthèse protéique, en se fixant au facteur EF-G d'élongation de la traduction, ce qui empêche la fixation des amino-acyl-ARNt. La sélection de souches résistantes en cours de traitement est presque toujours observée, ce qui empêche l'usage de ce médicament en monothérapie. Son spectre d'activité ne couvre que les Gram (+), en particulier *Staphylococcus aureus*, et ses seules indications, en association avec un aminoside ou une β -lactamine, relèvent du traitement des infections à staphylocoques multirésistants.

h. Polymyxines B et colistine

Les polymyxines A, B, C, D, E, F, K, M, P, S et T sont des antibiotiques peptidiques cycliques qui ont été isolés de *Bacillus polymyxa*, à partir de 1947. De nos jours, seules la polymyxine B et la polymyxine E (ou colistine) sont utilisées en thérapeutique, contre de nombreuses bactéries Gram (-) (*Bordetella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*). Les polymyxines agissent comme des détergents cationiques : grâce à leur caractère amphotère, elles pénètrent dans la cellule bactérienne et s'insèrent parmi les phospholipides de la paroi, perturbant ainsi la perméabilité membranaire. Etant donné leur faible absorption, les possibles complications d'ordre neurologique et leur néphrotoxicité, ces antibiotiques sont réservés à des cas extrêmes (lorsque les bactéries sont résistantes à tous les autres antibiotiques) et à l'usage topique (traitement local des infections de la peau, des muqueuses, des yeux et des oreilles).

4. La résistance aux antibiotiques

Pour échapper à l'action létale des antibiotiques, les bactéries ont développé de très nombreux mécanismes biochimiques de résistance, associés à une grande ingéniosité génétique pour les acquérir et les diffuser. L'évolution vers la résistance des bactéries aux antibiotiques caractérise la fin du XX^{ème} siècle, avec la description de BMR (bactéries multirésistantes, totorésistantes), mais cette évolution est très inégale si l'on considère les différentes espèces bactériennes et les différents antibiotiques. L'étude de la résistance bactérienne a permis de faire de grandes découvertes concernant l'organisation de l'information génétique des bactéries, le contrôle de son expression ; pour le thérapeute elle est aujourd'hui indispensable à connaître pour une meilleure utilisation des antibiotiques.

La résistance est soit naturelle, soit acquise. Quatre grands mécanismes existent : les bactéries peuvent devenir moins sensibles aux antibiotiques par : i) action d'enzymes dégradant les antibiotiques (β -lactamases, pénicillinases...); ii) diminution de la perméabilité de la bactérie aux médicaments (modification du nombre de porines...); iii) modification de la cible de l'antibactérien ; iv) augmentation de phénomènes d'efflux tel que le résume le schéma suivant (schéma 21).

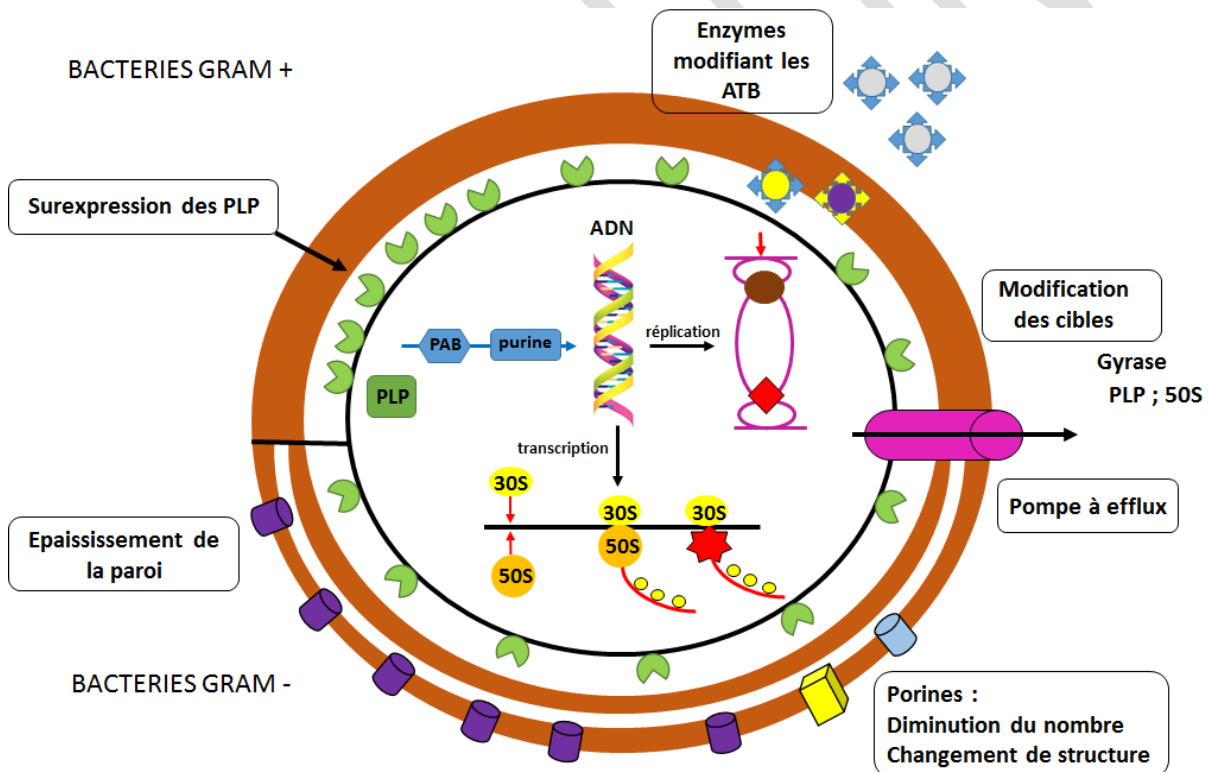


Schéma 21. Mécanismes de résistances

Comme cela a été souligné par l'OMS, la résistance bactérienne et fongique est un problème de société majeur pour lesquels les différents acteurs du secteur pharmaceutique, dont les chimistes, doivent être conscients.

Les Antifongiques existants

Les champignons sont, comme les Hommes, des eucaryotes. Leur structure repose sur trois parties essentielles : la paroi fongique, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme.

La paroi fongique est la zone de contact entre le champignon et le monde extérieur. Cette paroi fongique n'existe pas chez les eucaryotes supérieurs, ni chez les plantes ou les bactéries ; c'est donc une cible de choix pour éliminer sélectivement un champignon.

C'est une structure multicouche comprenant 80% de polysaccharides (principalement chitine et glucanes), des protéines et quelques lipides. La chitine, polymère d'unités N-acétylglucosamine reliées en β 1-4 est spécifique des champignons et des levures et produite par la chitine synthétase. Via l'existence de nombreuses liaisons hydrogène, les macromolécules de chitine s'organisent sous forme de microfibrilles et assurent ainsi la cohésion de la paroi. Elle est la couche la plus interne de la paroi. Dans la couche intermédiaire, on trouve des glucanes et des protéines. Les glucanes sont des polymères amorphes de glucose reliés par des liaisons β 1-3 et β 1-6 et forment un gel. Ils sont produits par la glucane synthétase. Les protéines, associées au mannose, sont donc des glycoprotéines.

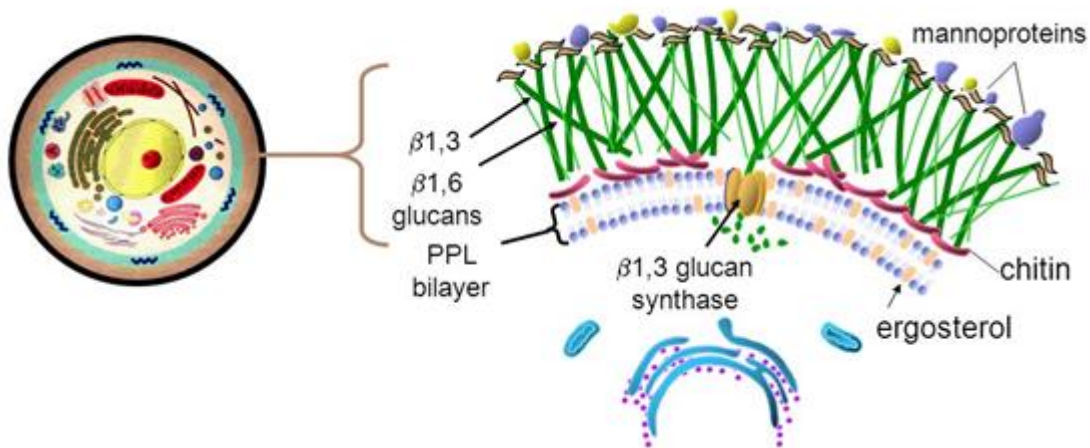


Figure 20.

La membrane plasmique est constituée de protéines, de phospholipides et de stérols, dont l'ergostérol est le principal. Certains antifongiques auront pour cible cette membrane (polyènes) ou bien ses constituants (azolés, allylamines).³¹ L'ergostérol est important pour la fluidité et l'intégrité membranaire mais aussi pour les fonctions d'enzyme liées à la membrane, jouant un rôle dans la croissance et la division cellulaire. La chitine synthétase et la glucane synthétase font partie de ces enzymes.³²

Il existe actuellement plusieurs antifongiques systémiques appartenant à cinq classes pharmacologiques, chaque famille possédant un mode d'action particulier.

³¹ Granier, F. *La presse médicale*, **2000**, 29, 2051.

³² Granier, F. *Antibiotiques* **2003**, 5, 39-48.

1. La famille des azolés :

Découverts dans les années 1950, les dérivés azolés sont de loin les antifongiques les plus utilisés en clinique. On distingue deux catégories d'antifongiques azolés : les imidazolés (Kétoconazole, Nizoral® ; Fluconazole, Triflucan®) et les triazolés (Itraconazole, Sporanox® ; Voriconazole, Vfend® ; Posaconazole, Noxafil®).

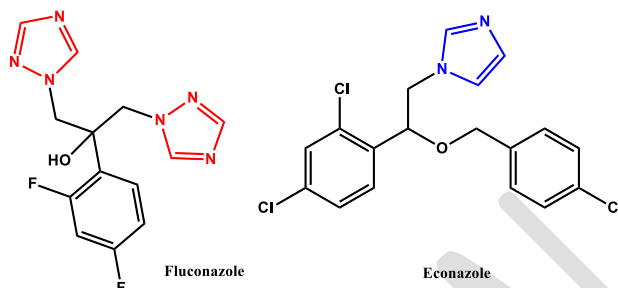


Figure 21.

Tous les antifongiques azolés sont des inhibiteurs enzymatiques qui agissent en bloquant le site actif de l'enzyme connue sous le nom de lanostérol 14 α déméthylase. Cette enzyme, appelée CYP51 appartient aux isoenzymes des cytochromes P450 des mitochondries des cellules fongiques. Elle permet chez le champignon la transformation du lanostérol en ergostérol, principal stérol de la membrane fongique.^{35,33} La 14 α déméthylase est codée par le gène ERG11.³⁶ L'étape de déméthylation nécessaire pour transformer les 14 α méthyl stérols en ergostérol est dépendante de l'activation du cytochrome P450. Sur le plan moléculaire, un des atomes d'azote (le N-3 chez les imidazolés et le N-4 chez les triazolés) se lie à l'atome de fer de l'hème situé dans le site actif de l'enzyme³⁴ du cytochrome P450, inhibant ainsi l'activation de ce cytochrome et par conséquent le fonctionnement enzymatique. Les azolés sont donc actifs sur les enzymes dépendantes du cytochrome P450.³⁵ L'inhibition conduit à une accumulation de précurseurs dans la chaîne de synthèse : lanostérol et divers 14-méthylstérols³⁶ ce qui aboutit à l'inhibition de la croissance du champignon. On observe également un épuisement d'ergostérol, stérol primordial dans la composition de la membrane de la cellule fongique, ce qui compromet l'intégrité de la membrane cellulaire.³⁷

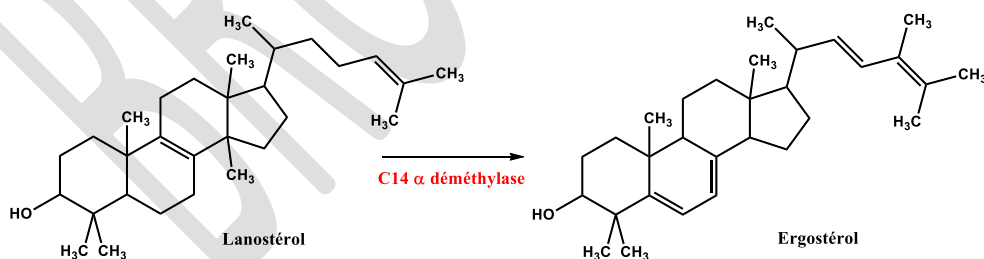


Schéma 22.

La résistance aux azolés est largement documentée, et de nombreuses voies de résistance sont connues.

³³ Vandeputte, P. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida Glabrata* - 168p. Thèse de Biologie des organismes, Angers : 2008 ; 930.

³⁴ Yu, S.; Chai, X.; Hu, H.; Yan, Y.; Guan, Z.; Zou, Y.; Sun, Q.; Wu, Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4435-4445.

³⁵ Delaunay, P.; Fissore, C. *J. Med. Mycology*, **2006**, *16*, 152-158.

³⁶ Lortholary, O.; Tod, M.; Dupont, B. *Maladies infectieuses*, **1999**, 1-21.

³⁷ Gubbins, P.O. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **2011**, *7*(11), 1411-1429.

2. La famille des polyènes :

Les polyènes sont des molécules cycliques. Leur nom provient du groupe chromophore qui les caractérise et qui est formé de plusieurs doubles liaisons conjuguées.⁴⁰ Ces polyènes (ou macrolides) possèdent un caractère amphotère. Les deux principaux représentants sont l'amphotéricine B ou AmpB (Fungizone®) et la nystatine (Mycostatine®). La résistance aux polyènes reste un évènement plutôt rare.³⁷

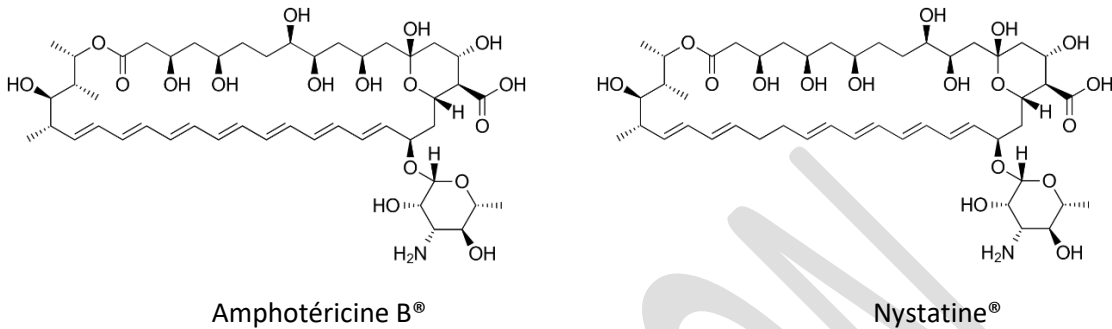


Figure 22.

Le macrolide agit en se glissant dans la membrane fongique, plus précisément en se liant irréversiblement à l'ergostérol.³⁷ Son caractère amphotère lui permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores et des canaux, ce qui permet d'augmenter la perméabilité transmembranaire aux cations monovalents tels que le sodium et le potassium. La déplétion intracellulaire de ce dernier entraîne secondairement la mort de la cellule.^{38,39} L'AmpB a donc une activité fongicide.³⁶

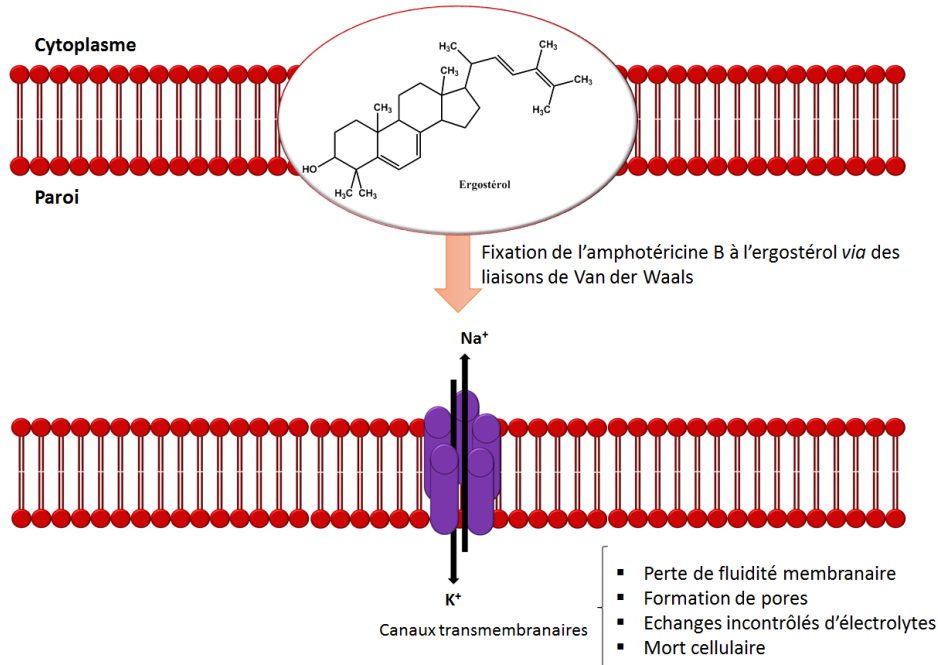


Schéma 23.

³⁸ Bretagne, S. *Antibiotiques*, 2005, 7, 5-15.

³⁹ Hochart, S. ; Barrier, F. ; Durand-Joly, I. ; Horrent, S. ; Decaudin, B. ; Odou, P. *Le Pharmacien Hospitalier*, 2008, 43, 103-109.

Une controverse existe quant à une éventuelle action au niveau intracellulaire. Des travaux ont en effet suggéré que les polyènes seraient capables d'induire un stress oxydatif, notamment chez *C. albicans*.³⁷

3. La famille des échinocandines

Ce sont des dérivés synthétiques de lipopeptides sécrétés par certains champignons (*Aspergillus*, *Zalerion*).³⁴ La caspofungine, commercialisée sous le nom de Cancidas® est un lipopeptide issu de la fermentation d'un champignon : *Glarea lozoyensis*.

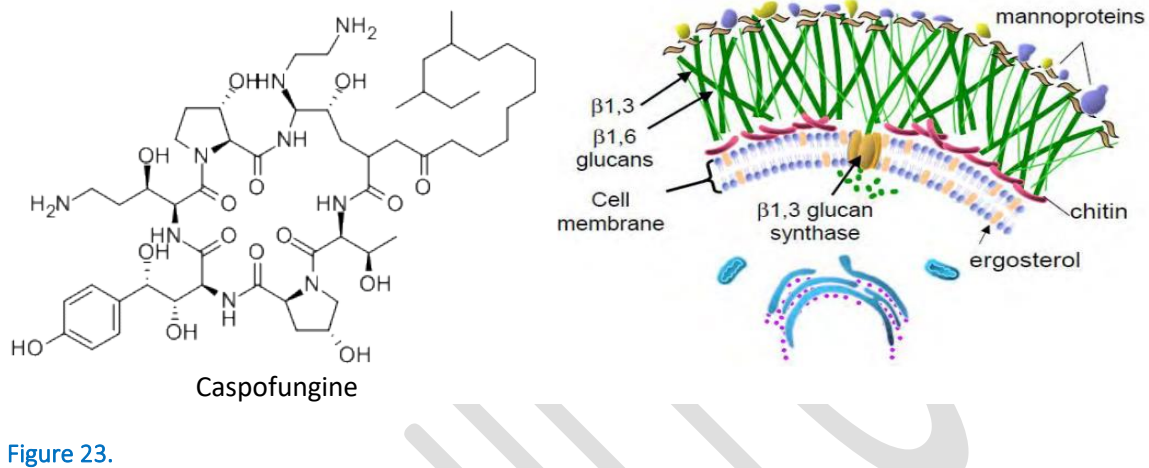


Figure 23.

La caspofungine agit par un mécanisme distinct des autres antifongiques : elle inhibe la (1,3)- β -D glucane synthase. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse de certains composants de la paroi cellulaire fongique.³³ Cette paroi fongique est formée de composants qui n'ont pas d'équivalents chez l'Homme. Le (1,3)- β -D glucane fait partie de ces composants et est essentiel à l'intégrité de la paroi. C'est lui qui est la cible indirecte de la caspofungine. L'intégrité de la paroi est indispensable à la survie du microorganisme puisqu'elle joue un rôle de protection physique vis-à-vis des cellules immunitaires ou des autres microorganismes. Elle est également le siège de nombreuses réactions enzymatiques et a un rôle important dans la communication intercellulaire.³⁵ Les (1,3)- β -glucanes sont donc spécifiques de la paroi fongique contrairement à la membrane qui contient, elle, des stérols communs aux mammifères et aux champignons.

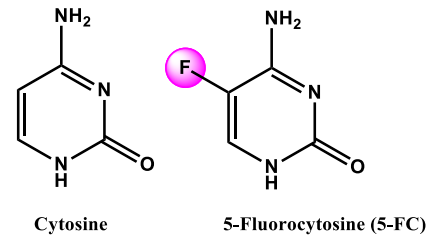
La caspofungine a une activité fongicide sur *Candida* : en perdant son intégralité, une instabilité osmotique apparaît,³⁴ la paroi est alors plus fragile et sensible⁴⁰ ; on assistera par la suite à la lyse donc à la mort de la cellule fongique.^{33,35}

La micafungine (Mycamine®) et l'anidulafungine (Ecalta®, Eraxis®) font également partie de cette famille et agissent de la même manière que leur prédécesseur. La résistance aux échinocandines est un événement relativement rare, ce qui explique pourquoi la caspofungine est considérée comme antifongique de référence.³⁵

⁴⁰ Herbrecht, R. ; Nivoix, Y. ; Fohrer, C.; Natarajan-Amé, S. ; Letscher-Bru, V. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, i39-i48.

4. La famille des pyrimidines

Les fluoropyrimidines sont également surnommées «inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques» ou «analogues de la pyrimidine». Ce sont des antimétabolites qui sont des analogues structuraux d'un nucléotide : la cytosine.^{37,44} La 5-FC agit *via* 2 mécanismes : 1) elle perturbe la synthèse protéique par substitution de l'uracile par le 5-FU dans l'Acide Ribonucléique (ARN) fongique ; 2) elle altère la biosynthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) fongique par inhibition de la thymidylate synthétase (TS).



Afin que la 5-FC puisse exercer son action antifongique, elle doit d'abord pénétrer dans la cellule fongique, en compétition avec la cytosine. Pour cela, elle utilise des transporteurs plus ou moins spécifiques, tels que la cytosine perméase ou des transporteurs des pyrimidines. Elle doit ensuite être transformée en 5-FU grâce à la cytosine désaminase.⁴⁴ La 5-FU est ensuite convertie en 5-fluorouridine monophosphate (FURMP) par l'uridine phosphoribosyl-transférase ou UPRT. A terme, ce mécanisme permet d'aboutir au blocage de la multiplication cellulaire.³⁷ Les cellules des mammifères étant quasiment dépourvues de cette enzyme, il y aura peu voire pas de conversion de la 5-FC en 5-FU, également toxique pour la cellule humaine.

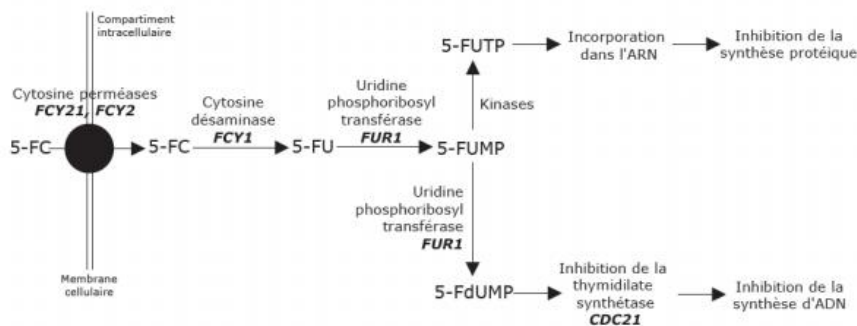


Schéma 24. Mécanisme de résistance à la 5-FC - Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *C. glabrata*.³⁵

Une résistance primaire est documentée pour les espèces de *Candida* non albicans et les espèces d'*Aspergillus*.³⁶ En raison de la complexité du mode d'action de la 5-FC, de nombreux événements peuvent expliquer la résistance à cet antifongique.

5. La famille des allylamines :

Les allylamines sont des molécules synthétiques. Leur représentant, la terbinafine (Lamisil®) agit au niveau des premières étapes de la synthèse de l'ergostérol en inhibant la squalène époxydase.⁴⁰ Elle inhibe ainsi la biosynthèse de l'ergostérol et conduit à la mort cellulaire.³³

Il existe, pour cette classe, deux actions : 1) fongistatique : le déficit en ergostérol provoque l'arrêt de la croissance fongique ; 2) fongicide : l'accumulation de squalène dans la cellule sous formes de vésicules lipidiques entraîne une rupture des membranes cellulaires.³⁴

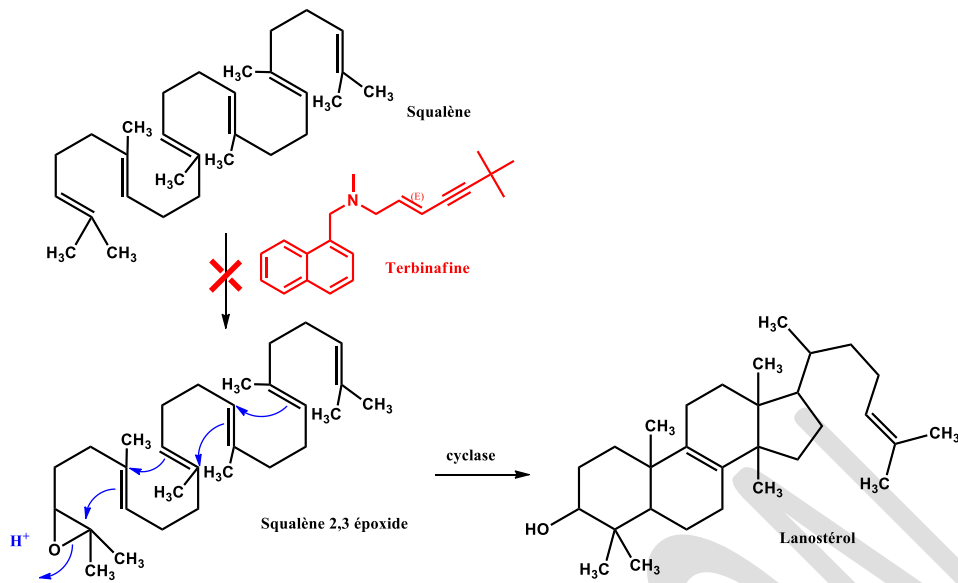


Schéma 25. Mécanisme d'action de la Terbinafine, inhibiteur de la squalène époxydase.

En résumé, les différents antifongiques agissent sur les différents organites et constituants de la cellule fongique.

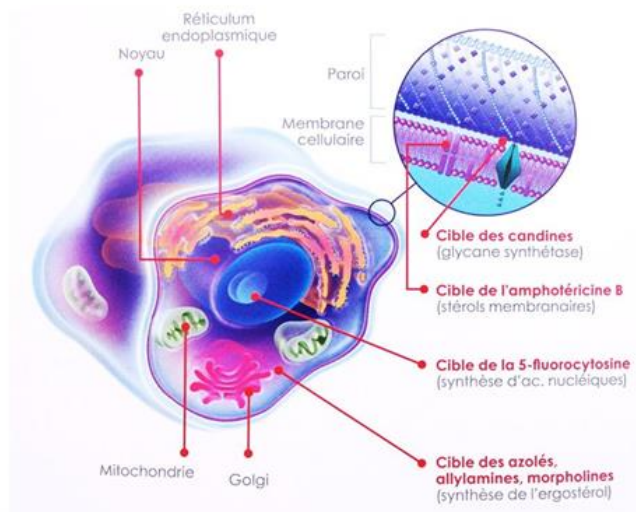


Schéma 26. Résumé du mode d'action des différents antifongiques.

Acinetobacter *B*baumannii

1. Fiche d'identité

Les bactéries pathogènes sont connues depuis toujours alors que d'autres émergent avec les temps modernes et arrivent même parfois jusqu'en pleine lumière à la une des médias. C'est le cas d'*Acinetobacter*, parfait inconnu des années 60 et aujourd'hui star redoutée des services de réanimation.⁴¹

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont retrouvées dans de nombreux milieux naturels (le sol, les eaux, les végétaux...) et font partie de la flore cutanée normale de l'homme et des animaux. Elles sont également isolées des flores buccale, rhino-pharyngée ou fécale, et peuvent être présentes dans les aliments. *Acinetobacter baumannii* (AB) est un coccobacille à Gram (-), commensal de la peau et notamment de ses régions humides et du tube digestif. Comme les *Pseudomonas*, les *Acinetobacter* sont principalement responsables d'infections nosocomiales, surtout chez les patients affaiblis. Les pathologies sont des septicémies, des pneumopathies, des méningites, des endocardites, des abcès, des surinfections des plaies, des infections urinaires... L'espèce majoritairement en cause est *Acinetobacter baumannii*. *Acinetobacter* est aérobic strict, oxydase négative et catalase positive. L'utilisation du glucose par voie oxydative est fréquente, mais peut être absente.

2. Pathogénicité

Acinetobacter baumannii apparaît comme l'un des pathogènes les plus problématiques au sein des établissements de soins. Il est impliqué à hauteur de 2% à 4% des infections nosocomiales dans l'UE et aux USA (Sources : ECDC, CDC). Sa capacité à survivre de façon prolongée en milieu hospitalier associée à l'émergence de résistances potentialisent sa capacité de propagation nosocomiale. Les patients les plus fragiles sont généralement les cibles de ce pathogène. La pneumopathie nosocomiale est l'infection la plus fréquente. Cependant, récemment, les bactériémies, les infections touchant la peau et les tissus mous, les voies urinaires ou le système nerveux central sont apparues comme très problématiques pour certains établissements.

L'existence de souches résistantes à tous les antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine place *Acinetobacter baumannii* parmi les organismes qui menacent l'arsenal thérapeutique actuel. Compte tenu du nombre et de la diversité des déterminants de résistance identifiés chez cette bactérie, le choix des molécules lors du traitement empirique est un vrai défi. Les carbapénèmes ont été longtemps considérés comme le traitement de choix des infections à *Acinetobacter*. Aujourd'hui l'utilité clinique de cette classe est menacée par l'émergence de résistances, favorisée par son utilisation de plus en plus importante en lien avec l'émergence des entérobactéries multirésistantes. Actuellement, les associations de molécules et/ou l'utilisation d'antibiotiques anciens comme la colistine sont souvent les seules possibilités. Les principaux antibiotiques employés pour le traiter sont les carbapénèmes, l'ampicilline en association avec le sulbactame, la tigecycline, les aminoglycosides et la colistine. Aux USA, 61% des souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes aux carbapénèmes et 65% présentent des résistances combinées à au moins 3 classes parmi les carbapénèmes, l'ampicilline/sulbactame, les aminoglycosides, les céphalosporines, les fluoroquinolones et la piperacilline (Source : CDC). Le taux de mortalité des infections nosocomiales à *Acinetobacter*

⁴¹ Joly-Guillou, M.L. *Revue Francophone des Laboratoires*, **2012**, 441, 34-72.

baumannii multirésistant est de 25%, alors que le taux de mortalité global des infections nosocomiales est de 0.9% (Sources : CDC, ECDC/EMA).

3. Problématique de la résistance

Un des maîtres mots qui caractérise cette bactérie est « adaptation »; il s'applique particulièrement à l'espèce *baumannii*. L'évolution de la sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* est un modèle du genre. Cette bactérie s'est tellement bien adaptée au milieu hospitalier qu'il est souvent décrit que son habitat est l'hôpital lui-même. Il s'agit bien sûr plus précisément de son habitat secondaire. Ses capacités à adhérer aux surfaces, à persister dans l'environnement en font un très bon candidat aux épidémies hospitalières.

En ce qui concerne *Acinetobacter Baumannii*, la diversité des mécanismes de résistance développés est impressionnante : enzymes d'inactivation, pompes à efflux, imperméabilité, modifications des cibles. Il en est de même pour les supports génétiques (mutations, acquisition de transposons, plasmides, intégrons, séquence d'insertion promotrices ...). A l'origine de ces processus existe une capacité à intégrer du matériel génétique issu d'espèces génétiquement plus ou moins proches.

a. Résistance naturelle

Dans les années 1970, date des premiers travaux s'intéressant à *A. baumannii*, celui-ci était décrit comme sensible à tous les antibiotiques alors commercialisés à l'exception de la **pénicilline**.

Cependant, par analyse de son génome, il s'avère que *A. baumannii* possède un **gène codant** pour la production d'une **β -lactamase de type céphalosporinase**. Plusieurs types de céphalosporinases ont été alors progressivement identifiées chez *A. baumannii* et sont aujourd'hui regroupées sous le terme de ADC (Acinetobacter-derived-cephalosporinase). Ces ADC sont à l'origine de la résistance aux aminopénicillines, à la céfalotine et la céfotaxime.

De plus, *A. baumannii* possède un **gène codant** pour une enzyme de classe D : l'**oxacillinase** chromosomique naturelle OXA-51, identifiée comme ubiquitaire chez l'espèce *baumannii*.

De plus, comme *P. aeruginosa*, *A. baumannii* possède un nombre de porines largement plus faible que celui de *E. coli* et, de ce fait, présente une **imperméabilité** naturelle.⁴² Cette imperméabilité est couplée à une **pompe à efflux** appartenant au système RND, naturellement active vis-à-vis d'un large spectre d'antibiotiques incluant notamment le chloramphénicol et le triméthoprime mais excluant les aminoglycosides.⁴³

A. baumannii est également naturellement résistant à l'ertapénème, à la fosfomycine, au triméthoprime, à l'acide pipémidique, à la norfloxacin (mais pas à l'acide nalidixique), aux furanes et, est peu sensible à l'aztréonam.

b. Résistance acquise

i. Résistance acquises aux β -lactamines

A. baumannii a su s'adapter au cours du temps pour devenir une bactérie redoutable par ses capacités de persistance en milieu difficile, ses caractéristiques épidémiogènes et sa multi-résistance aux antibiotiques. En matière de résistance, elle a su utiliser une variété de mécanismes associant

⁴² Sato, K.; Nakae, T. *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**, *28*, 35-45.

⁴³ Damier-Piolle, L. ; Magnet, S. ; Brémont, S. ; Adel, J.K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 557-62.

mutations, acquisition de séquences d'insertion jouant le rôle de promoteur de gènes silencieux ou acquisition de gènes de résistance à partir d'espèces plus ou moins proches sous la forme de plasmides, transposons ou cassettes d'intégrons.

La résistance aux β -lactamines est dominée par la production de β -lactamases à la fois chromosomiques ou acquises. Le tableau 9 indique l'importante variété d'enzymes que cette bactérie peut produire.

D'autres mécanismes de résistance aux β -lactamines existent, tels que la diminution du nombre de porines ou l'efflux actif (surexpression des pompes) des antibiotiques ; des gènes d'efflux actifs ont été mis en évidence.

Tableau 9. β -lactamases décrites chez *Acinetobacter baumannii*

Classification de Ambler	Type d'enzyme	Spectre d'activité
CLASSE A (Sérine β -lactamase)	TEM-1,62 ; CARB-5 ; SCO-1	R pénicillines + C1G
	CTX-M-2, -15 ; TEM-92 ; VEB-1, PER-1 ; SHV-12	R toutes β -lactamines sauf céphamycines et carbapénèmes
	GES-11 ; -14	R carbapénèmes et CG3
	KPC-2,-3,-4, -10	R toutes les β -lactamines
CLASSE B (métallo- β -lactamase)	IMP-1, -2, -4,-5,-6, -11 VIM-2,-4 ; SIM-1 ; NDM-2	R toutes les β -lactamines sauf aztréonam
CLASSE C (Sérine β -lactamase)	AmpC + <i>ISAbal</i>	Pas d'expression, non inductible Expression amplifiée de niveau variable R ampicilline, C1G, C2G R C3G, piperacilline/ticarcilline
CLASSE D (Sérine β -lactamase)		
Groupe I	OXA-21 ; OXA-23, -27, -49	R-ampi-ticar-piperacilline R toutes les β -lactamines carbapénèmes incluses
Groupe II	OXA-51, -66, -69	Pas d'activité apparente
Groupe III	OXA-24, -25, -26, -37, -40, -72	R toutes les β -lactamines carbapénèmes incluses
Groupe IV	OXA-58, -143	R toutes les β -lactamines carbapénèmes incluses R pénicillines + carbapénèmes

ii. Résistance acquise aux aminosides

Comme chez les autres bactéries Gram (-), la résistance aux aminosides est principalement liée à la production d'enzymes inactivatrices. Les gènes codant pour ces enzymes sont présents sur des plasmides, des transposons ou des cassettes au sein d'intégrons, facilitant leur rapide dissémination.⁴⁴ Parmi ces enzymes ont été identifiées des acétylases, des adénylases et des phosphotransférases. La

⁴⁴ Seward, R.J.; Lambert, T.; Towner, K.J. *J. Med. Microbiol.* **1998**, *47*, 455-462.

résistance aux aminosides a également été décrite comme liée à des mécanismes d'efflux impliquant la pompe AdeABC et la pompe AbeM.

iii. Résistance acquise aux fluoroquinolones

Apparue dans les années 1990, la résistance est croisée à l'ensemble des molécules et principalement imputable à des mutations au niveau des gènes *gyrA* et *parC*, gènes à l'origine de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, enzymes permettant le maintien de l'intégrité de l'hélice pendant le processus de réplication de l'ADN. Plusieurs mutations concomitantes sont nécessaires pour obtenir un niveau de résistance élevée. Les pompes à efflux jouent également un rôle important dans la résistance aux fluoroquinolones.

iv. Résistance acquise aux autres antibiotiques

Les tétracyclines peuvent constituer une alternative thérapeutique dans le cas d'infection à *A. baumannii*. La résistance à cette famille s'est développée moins vite que chez d'autres bactéries Gram (-). Malgré cela, un gène, probablement issu d'un transfert de *S. aureus*, code pour une protéine protectrice entraînant l'efflux actif des tétracyclines. La tigécycline, molécule dérivée des tétracyclines, reste active sur *A. baumannii*, malgré la description de souches mutantes peu sensibles. Son activité doit donc être évaluée au cas par cas.

La rifampicine peut être envisagée, mais un gène de résistance a été identifié et cette molécule est sensible au système d'efflux.

La colistine, antibiotique de la famille des polymyxines, reste parfois le seul recours disponible en cas d'infections par des souches *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes ; la résistance aux polymyxines est rare mais pas impossible. En effet, un mécanisme de résistance impliquant un système de régulation à 2 composants PmrAB a été décrit récemment.⁴⁵

4. Que tester dans ce cas ?

L'antibiogramme d'une infection à *A. baumannii* doit être large et complet, afin de choisir la meilleure approche thérapeutique.

En résumé, le genre *Acinetobacter* représente aujourd'hui un modèle d'adaptation particulièrement efficace en termes d'antibiorésistance. Sa capacité à disséminer dans l'environnement hospitalier, à acquérir rapidement des mécanismes de résistance conduisant parfois à des impasses thérapeutiques font d'*A. baumannii* une bactérie parfois médiatisée et souvent redoutée des services de soins intensifs. La diversité des mécanismes de résistance développés par cette espèce est impressionnante : enzymes d'inactivation, pompes à efflux, imperméabilité, modification de cibles. Il en est de même pour les supports génétiques (mutations, acquisition de transposons, plasmides, intégrons, séquences d'insertion promotrices....). À l'origine de ces processus, existe une capacité à intégrer du matériel génétique issu d'espèces génétiquement plus ou moins proches. L'un des exemples les plus marquants est la diversité des enzymes conférant la résistance aux carbapénèmes. Ces résistances sont particulièrement préoccupantes puisque depuis les années 90, date de l'émergence des souches hyperproductrices de céphalosporinases, les carbapénèmes représentent les antibiotiques de référence des infections à *Acinetobacter*. L'apparition concomitante de la résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides a donné à cette bactérie le statut de bactérie multi-résistante (BMR). Il est donc urgent de chercher de nouvelles alternatives dans la lutte contre cette bactérie.

⁴⁵ Adams, M.D.; Nickel, G.C.; Bajaksouzian, S.; Lavender, H.; Murthy, A.R.; Jacobs, M.R.; Bonomo, R.A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3628-3634.

Candida Albicans

1. Infections fongiques invasives

Selon une enquête épidémiologique menée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), en France, les infections fongiques invasives (IFI) ont été responsables de 9.889 décès entre 2001 et 2010. Elles seraient responsables de 10% des infections nosocomiales. Sur la même période, le nombre de candidémies a doublé. En France, en service de réanimation, l'incidence des IFI est d'environ 2,2/10000. Malheureusement, malgré les différents outils utilisés pour maîtriser ce phénomène, la progression de ces infections en milieu hospitalier continue et apparaît particulièrement préoccupante. Compte tenu des risques encourus par de nombreux patients, la prescription d'antifongiques (à visée prophylactique, préemptive ou curative) est de plus en plus importante et leur coût dépasse maintenant celui des antibactériens dans de nombreux hôpitaux universitaires, à titre d'exemple il atteint 5 M€ au CHRU de Lille.

La létalité de l'ensemble de ces infections est proche de 30%. Ce sont majoritairement (43,3%) des candidoses invasives (causées par un champignon du genre *Candida*), des pneumocystoses (26,1%) et des aspergilloses invasives (23,9%).

Les candidoses invasives sont des infections provoquées par des levures du genre *Candida*. Après s'être développée sur la peau ou à l'intérieur de la bouche, de l'appareil urogénital ou dans le tube digestif, la candidose essaime par voie sanguine. L'infection peut alors toucher le cerveau (méningite, abcès du cerveau), l'œil (rétinite septique), le cœur (endocardite), les poumons, le foie, la rate, les reins et les voies urinaires hautes.

Les personnes immunodéprimées sont les plus touchées par ces infections. On note une augmentation du risque de IFI en présence de maladies telles que les cancers, le diabète ou lors d'une transplantation d'organe. Prenant en considération l'augmentation du nombre personnes à risque au sein de la population, du fait du vieillissement ou de la croissance tendancielle des cas de diabète, le nombre et l'incidence des IFI risquent de s'accroître dans les années à venir.

2. Mycobiote

Bien que les premières études sur les champignons microscopiques datent de plus de 150 ans, c'est seulement au cours des trois dernières décennies que le terme mycobiote, nouveau concept microbiologique, a retenu l'attention des microbiologistes. Le mycobiote se réfère à la composante fongique du microbiote vivant au sein d'un environnement donné. Le mycobiote humain fait donc partie du microbiote humain, au même titre que les bactéries. Il n'existe aucune estimation précise de la charge fongique réelle dans l'organisme puisque le nombre de cellules fongiques est bien inférieur à celui des cellules procaryotes, dont la masse principale – située dans le tractus digestif – est estimée à 10^{14} cellules. De ce fait, le mycobiote appartient à la « biosphère rare » ou encore la part la moins abondante (< 0,1 %) du microbiote humain. Malgré son importance, il reste peu étudié. Les quelques études déjà publiées dans la littérature montrent que les différentes parties du corps humain abritent des populations fongiques spécifiques et que certains profils de mycobiome⁴⁶ sont associés à différentes pathologies. En effet, les champignons et certains profils de « mycobiome » apparaissent désormais impliqués comme « cofacteurs » potentiels dans la physiopathologie de plusieurs maladies,

⁴⁶ Mycobiome = ensemble des génomes des microorganismes colonisant les écosystèmes de l'homme.

telles que l'hépatite B,⁴⁷ la mucoviscidose⁴⁸ et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).⁴⁹ Actuellement, un enjeu majeur des études portant sur le mycobiome est de découvrir le rôle que jouent les populations fongiques au sein du microbiote humain, les interactions qu'elles peuvent entretenir entre elles, avec le microbiote bactérien ou leur hôte, ainsi que leur implication potentielle dans la genèse ou l'évolution de pathologies spécifiques.

Tout d'abord, il a été découvert que des interactions potentielles existent entre les différentes composantes du mycobiote humain. Noverr *et coll.* montrent ainsi dans un modèle murin qu'une multiplication de *C. albicans* dans le microbiote intestinal après antibiothérapie modifierait le microbiote respiratoire et augmenterait le risque de développer des maladies allergiques respiratoires induites par *Aspergillus fumigatus*.⁵⁰ Des interactions entre le mycobiome et certaines bactéries du microbiote ont également été décrites, et pourraient jouer un rôle dans certaines pathologies. Ainsi, certains microorganismes bactériens et fongiques peuvent avoir un effet synergique les uns sur les autres, comme cela a été rapporté pour *Mycobacterium* et *Aspergillus* dans le tractus respiratoire.⁵¹ Dans d'autres cas, il s'agit plutôt d'une « concurrence » entre bactéries et champignons, comme par exemple pour *Pseudomonas aeruginosa*, dont la présence inhibe la croissance fongique de *C. albicans* chez les patients atteints de mucoviscidose.⁵² Les interactions entre l'hôte et son microbiome, dont fait partie le mycobiome, sont soigneusement équilibrées et conduisent, selon les cas, à la colonisation, l'infection asymptomatique ou la maladie. Si la pathogénicité de nombreuses espèces de champignons est bien étudiée, la corrélation entre la diversité du mycobiome et son impact sur la progression de certaines maladies est moins clairement définie.

Envisager des thérapeutiques qui modifieraient ou modèleraient le mycobiote afin d'améliorer la prise en charge de certaines pathologies est une voie d'avenir à plus ou moins long terme.⁵³

3. Candida albicans

La levure *Candida albicans*, longtemps négligée par les communautés microbiologiques et médicales, s'est imposée durant les deux dernières décades comme un problème majeur de Santé publique. *Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes,⁵⁴ se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore),⁵⁵ formant ainsi des colonies blanches crémeuses. Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, et est

⁴⁷ Chen, Y.; Chen, Z.; Guo, R.; Chen, N.; Lu, H.; Huang, S.; Wang, J.; Li, L. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* **2011**, *70*, 492-498.

⁴⁸ Harrison, M.J.; Twomey, K.B.; McCarthy, Y.; O'Connell, O.J.; Alston, M.; Febrer, M.; Murphy, D.M.; Ryan, R.P.; Plant, B.J. *Ir. J. Med. Sci.* **2012**, *181*, S369-437.

⁴⁹ a) Kuehbacher, T.; Ott, S.J.; Helwig, U.; Mimura, T.; Rizzello, F.; Kleessen, B.; Gionchetti, P.; Blaut, M.; Campieri, M.; Fölsch, U.R.; Kamm, M.A.; Schreiber, S. *Gut* **2006**, *55*, 833-841; b) Ott, S.J.; Kuhbacher, T.; Musfeldt, M.; Rosenstiel, P.; Hellmig, S.; Rehman, A.; Drews, O.; Weichert, W.; Timmis, K.N.; Schreiber, S. *Scand. J. Gastroenterol.* **2008**, *43*, 831-841.

⁵⁰ Noverr MC, Falkowski NR, McDonald RA, et al. Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase : role of host genetics, antigen, and interleukin-13. *Infect Immun* 2005 ;73:30-8.

⁵¹ Darling, W.M. *Lancet*, **1976**, *2*, 740.

⁵² Kerr, J.J. *Infect.* **1994**, *28*, 305-310.

⁵³ Van der Velden, W.J.; Netea, M.G.; de Haan, A.F.; Huls, G.A.; Donnelly, J.P.; Blijlevens, N.M. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2013**, *19*, 329-332.

⁵⁴ Chu, W. S., Magee, B. B.; Magee, P. T. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 6637-6651.

⁵⁵ Graser, Y.; Volovsek, M.; Arrington, J.; Schonian, G.; Presber, W.; Mitchell, T. G.; Vilgalys, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 12473-12477.

caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans*.

Candida albicans est considéré chez l'Homme comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne. Au niveau des muqueuses digestives et vaginales, la levure se présente sous forme de blastospores, considérées comme la forme saprophyte qui vit en symbiose avec l'organisme hôte. En revanche, lorsque le délicat équilibre entre la forme commensale et les défenses immunitaires est rompu, cette étroite symbiose se transforme en parasitisme, résultant en une maladie infectieuse appelée candidose. Au niveau des tissus infectés, *Candida albicans* est retrouvée simultanément sous les formes de blastospores et de mycéliums. Alors que la forme blastospore reste non-invasive, la forme mycélienne est capable de pénétrer les muqueuses. La contamination est essentiellement inter humaine, soit par transmission fécale, soit par contact direct (salive, sécrétions, mains).

La paroi de *C. albicans* est une structure en perpétuelle évolution d'environ un cinquième de micron d'épaisseur protégeant la cellule, lui conférant sa forme et par laquelle passe la majorité des régulations avec l'hôte,⁵⁶ mais aussi les levures et les bactéries environnantes. Elle est élaborée à partir d'enzymes enchâssées dans la membrane plasmique ou à partir de molécules synthétisées dans le cytoplasme et déversées dans l'espace périplasmique pour transiter par la paroi ou y être attachées. Ses couches les plus internes sont formées d'un réseau très dense de polysaccharides comprenant environ 5 % de la chitine, des β -1,3 glucanes (40 %) associés à des β -1,6 glucanes (20 %). Le reste est composé de protéines généralement fortement mannosylées, que l'on retrouve principalement sur les couches externes, la surface étant recouverte d'une couche fibrillaire dont l'épaisseur varie selon le milieu où les cellules se développent.

4. Les facteurs de risque

Les facteurs de risque (FR) des candidoses invasives sont multiples et bien connus. Certains sont associés à certaines populations de patients, parmi lesquelles les patients de réanimation, les grands prématurés, les patients d'hémo-oncologie, les transplantés, les grands brûlés, les patients ayant subi une chirurgie lourde, en particulier digestive ou urologique.⁵⁷ Selon les données de l'Observation des Levures (ODL), en Ile-de-France, 40 % des cas surviennent chez des patients hospitalisés en réanimation et 18 % chez des patients ayant une hémopathie. Outre ces FR liés à des populations de patients, il faut ajouter ceux liés aux conduites thérapeutiques, qu'il s'agisse de traitements médicamenteux ou de la mise en place de matériel étranger. L'un des facteurs majeurs favorisant les candidoses est la prise d'antibiotiques antibactériens qui induit une augmentation de la colonisation et sans doute des phénomènes de quorum sensing modifiant le comportement des levures. Cette prolifération des levures a été longtemps imputée uniquement à une déplétion de la niche écologique en espèces compétitrices. Il faut y ajouter que la déplétion bactérienne post-antibiotiques induit une

⁵⁶ Gow, N.A.; Hube, B. *Cur. Opin. Microbiol.* **2012**, *15*, 406-412.

⁵⁷ a) Eggimann, P.; Garbino, J.; Pittet, D. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 685-702; b) Richards, M.J.; Edwards, J.R.; Culver, D.H.; Gaynes, R.P. *Crit. Care Med.* 1999, *27*, 887-892; c) Vincent, J.L.; Rello, J.; Marshall, J.; Silva, E.; Anzueto, A.; Martin, C.D.; Moreno, R.; Lipman, J.; Gomersall, C.; Sakr, Y.; Reinhart, K. *JAMA* **2009**, *302*, 2323-2329; d) Leroy, O.; Gangneux, J.P.; Montravers, P.; Mira, J.P.; Gouin, F.; Sollet, J.P. *et al Crit. Care Med.* **2009**, *37*, 1612-1618; e) Holley, A.; Dulhunty, J.; Blot, S.; Lipman, J.; Lobo, S.; Dancer, C.; Rello, J.; Dimopoulos, G. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 554-557; f) Tortorano, A.M.; Caspani, L.; Rigoni, A.L. *J. Hosp. Infect.* **2004**, *57*, 8-13.

baisse de stimulation et, par suite, une moindre efficacité de l'immunité innée qui bénéficie à la transition saprophyte pathogène de *C. albicans*. Une fois qu'une infection bactérienne est établie, la circulation du peptidoglycane dans le sérum favoriserait la filamentation associée à la virulence de *C. albicans*.

5. Traitement et résistances

Il existe actuellement plusieurs antifongiques systémiques appartenant à quatre classes pharmacologiques, chaque famille possédant un mode d'action particulier. L'amphotéricine B agit en se fixant sur l'ergostérol, ce qui conduit à la formation de pores dans la membrane. La 5-fluorocytosine inhibe la synthèse d'ADN et la synthèse protéique. Les azolés inhibent la synthèse de l'ergostérol et les échinocandines inhibent la synthèse des 1-3- β -glucanes de la paroi.

Avec les *Aspergillus* spp., les *Candida* spp. sont les champignons les plus fréquemment en cause dans les infections fongiques invasives et l'augmentation de l'utilisation des traitements antifongiques est responsable d'une augmentation du nombre de résistance.⁵⁸

La résistance à l'amphotéricine B reste exceptionnelle et peut être liée à une disparition de l'ergostérol membranaire. Cette disparition peut être la conséquence d'un blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol par mutation d'un gène qui doit s'accompagner de la mise en place d'une voie métabolique accessoire permettant la synthèse d'autres stérols membranaires indispensables à la survie de la cellule fongique. Ainsi, il a été montré que des mutations de la $\Delta-5,6$ - désaturase (codée par le gène *erg3*) étaient à l'origine d'une résistance à l'amphotéricine B chez des souches de *C. albicans* d'origine clinique.⁵⁹

La résistance à la 5-fluorocytosine peut apparaître rapidement et peut être due à un défaut de pénétration intracellulaire ou à un défaut de transformation en 5-fluorouracile qui est la molécule active.

La résistance aux azolés peut être liée à des mécanismes variés qui peuvent s'associer chez une souche donnée. On en distingue quatre grands groupes qui incluent (i) des modifications de la cible (la 14- α -déméthylase) par mutation du gène codant pour l'enzyme, (ii) une surproduction de la cible, (iii) des phénomènes d'efflux, par surproduction de transporteurs, (iv) des altérations d'autres étapes de la voie de synthèse de l'ergostérol.

La résistance aux échinocandines est liée à une modification de la cible par mutations des gènes *fks* qui codent pour la β -1-3-D-glucane synthase.

Comme évoqué précédemment, des interactions entre *Candida albicans* et les bactéries ont été rapportées depuis une dizaine d'années. Des effets synergiques évidents ont été mis en évidence *in vitro* et *in vivo*.²⁵

a. Effets synergiques :

i. *Candida* et *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus, bactérie Gram (+), colonise fréquemment la peau ainsi que les muqueuses buccales, niches appréciées de *Candida*. Les deux pathogènes ont été fréquemment identifiés

⁵⁸ Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 133-163.

⁵⁹ Nolte, F.S.; Parkinson, T. ; Falconer, D.J. ; Dix, S.; Williams, J.; Gilmore, C.; Geller, R.; Wingard, J.R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 196-199.

conjointement chez les patients atteints de candidémie. De nombreuses études animales rapportent une augmentation significative de la virulence de chacun des pathogènes lorsqu'une coinfection existe. On parle alors de synergie infectieuse. Certaines études ont montré que *S. aureus* présentait un taux de résistance augmenté en présence de *C. albicans*, soulignant le rôle délétère de *C. albicans* sur l'apparition des souches multirésistantes des espèces *Staphylococcus*, dont l'adaptation est déjà naturellement élevée.⁶⁰

Tableau 10. Résumé des résistances observées chez *Candida* spp

Molécule	Cible modifiée ou processus atteint	Mécanisme cellulaire	Mécanisme moléculaire
Amphotéricine B	Ergostérol	Diminution ou disparition de l'ergostérol	Mutations de la $\Delta - 5,6$ - désaturase (codée par le gène <i>erg3</i>)
5-Fluorocytosine	Cytosine perméase	Défaut de pénétration intracellulaire	Mutation de la cytosine perméase (codée par le gène <i>FCY2</i>)
	Cytosine déaminase	Défaut de transformation en 5FU	Mutation de la cytosine déaminase (codée par le gène <i>FCY1</i>)
	Uridine phosphorybosyl transférase	Défaut de phospho-rylation du 5FU	Mutations de l'uridine phosphorybosyl transférase (codée par le gène <i>FUR1</i>)
	Thymidilate synthase	Effet de compensation	Augmentation de l'expression de la thymidilate synthase
Echinocandines	β -1,3-D-glucane synthase	Diminution de l'affinité de l'enzyme	Mutation de β -1,3-D-glucane synthase (codée par le gène <i>fks</i>)
Azolés	14-alpha-déméthylase	Diminution de l'affinité de l'enzyme	Mutation de la 14- α -déméthylase (codée par le gène <i>erg11</i>)
	14-alpha-déméthylase	Surproduction de l'enzyme	Augmentation de l'expression (mutation du facteur de régulation <i>UPC2</i>) Augmentation du nombre de copie du gène <i>erg11</i>
	Pompes à efflux	Augmentation du nombre de transporteurs Cdr1 et Cdr2 (type ABC)	Augmentation de l'expression (mutation du facteur de régulation <i>TAC1</i>)
	Pompes à efflux	Augmentation du nombre de transporteurs MDR1 (type MF)	Augmentation de l'expression (mutation du facteur de régulation <i>Mrr1</i>)
	Voie de synthèse de l'ergostérol	Défaut de synthèse	Mutations de la $\Delta - 5,6$ - désaturase (codée par le gène <i>erg3</i>)

⁶⁰ a) Harriott, M.M.; Noverr, M.C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53(9), 3914–3922 ; b) Schlecht, L.M.; Peters, B.M.; Krom, B.P.; Freiberg, J.A.; Hänsch, G.M.; Filler, S.G.; Jabra-Rizk, M.-A. ; Shirliff, M.E. *Microbiology.* **2015**, 161, 168–181 ; c) Lin, Y.J.; Alsad, L.; Vogel, F.; Koppar, S.; Nevarez, L.; Auguste, F.; Seymour, J.; Syed, A.; Christoph, K.; Loomis, J.S. *BIOS* **2013**, 84(1), 30-39.

ii. *Candida albicans* et *Escherichia coli* ⁶¹

E. coli est l'un des microorganismes les plus observés au sein du tractus gastro-intestinal ; différents types virologiques d'*E. coli* existent, dont la pathogénicité varie. *E. coli* et *C. albicans* sont fréquemment identifiés conjointement dans les fluides biologiques et les tissus humains. Le taux de mortalité des infections polymicrobiennes intra-abdominales impliquant *C. albicans* est significativement plus élevé que lorsque l'infection est uniquement bactérienne (jusqu'à 75% pour le premier cas comparé à un maximum de 30% dans le second cas). Les différentes études rapportées suggèrent que l'interaction *C. albicans*-*E. coli* est synergique.

Pour ces deux bactéries, puisqu'elles sont couramment isolées des mêmes sites d'infection que *C. albicans* et semblent augmenter la mortalité et la résistance aux agents antibactériens, ces associations peuvent causer de sévères complications aux patients atteints. Certains auteurs proposent une thérapie couplée antifongiques/antibactériens afin de garantir la survie des patients.

b. Effets antagonistes

i. *Candida albicans* et *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii, bactérie Gram (-), a gagné son appellation de superbactérie, en raison de l'apparition de souches multirésistantes et de sa capacité à former des biofilms persistants sur les surfaces biotiques et abiotiques.⁶² Puisque ces deux pathogènes peuvent coexister dans les cavités buccales des patients immunodéprimés, certaines études ont tenté d'identifier leur rôle mutuel en cas de coinfections. D'après les quelques données disponibles, il semblerait que *A. baumannii* soit capable d'induire la mort cellulaire de *C. albicans*, via l'interaction d'une protéine membranaire de la bactérie (Omp A) avec la protéine Als3 du champignon. Ces données sont en faveur d'effets antagonistes d'une co-infection mais d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces premières données.

ii. *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie gram négatif pathogène opportuniste, particulièrement redoutée pour les patients immunodéprimés. De nombreuses études ont tentés de rationaliser l'interaction *P. aeruginosa*/*C. albicans*. A ce jour, les données sont plutôt en faveur d'effets antagonistes, bien que de nombreuses contradictions subsistent. En effet, alors que certains auteurs ont quantifié une augmentation de la dissémination et de l'infection fongique en présence de bactéries *P. aeruginosa*⁶³ d'autres ont mis en évidence la mort cellulaire de *C. albicans* en présence des mêmes bactéries.⁶⁴

⁶¹ a) Klaerner, H.G.; Uknis, M.E.; Acton, R.D.; Dahlberg, P.S.; Carlone-Jambor, C.; Dunn, D.L. *J. Surg. Res.* **1997**, *70*(2), 161-165; b) Diebel, L.N.; Liberati, D.M.; Diglio, C.A.; Dulchavsky, S.A.; Brown, W.J. *J. Trauma.* **1999**, *47*(6), 1045-1050; c) Sawyer, R.G.; Adams, R.B.; May, A.K.; Rosenlof, L.K.; Pruett, T.L. *J. Med. Vet. Mycol.* **1995**, *33*(1), 49-52; d) Liu, P.; Wu, X.; Liao, C.; Liu, X.; Du, J.; Shi, H.; Wang, X.; Bai, X.; Peng, P.; Yu, L.; Wang, F.; Zhao, Y.; Liu, M. *PLoS ONE* **2014**, *9*(2): e90042 ; e) Hermann, C.; Hermann, J.; Munzel, U.; Ruchel, R. *Mycoses*, **1999**, *42*, 619-627.

⁶² Richards, A.M.; Abu, K.Y.; Lamont, R.J. *Mol. Oral Microbiol.*, **2015**, *30*, 2–15.

⁶³ Neely, A.N.; Law, E.J.; Holder, I.A. *Infect Immun.*, **1986**, *52*, 200–204.

⁶⁴ a) Kerr, J.R. *J. Clin. Microbiol.*, **1994**, *32*, 525–527 ; b) Kerr, J.R.; Taylor, G.W.; Rutman, A.; Hoiby, N.; Cole, P.J.; Wilson, R. *J. Clin. Pathol.* **1999**, *52*, 385–387; c) Kaleli, I.; Cevahir, N.; Demir, M.; Yildirim, U.; Sahin, R. *Mycoses*, **2007**, *50*, 74–78.

Au vu des différentes données collectées, certaines similitudes entre bactéries et champignons suggèrent la possibilité de développement de composés mixtes. De même, parmi les principes actifs décrits, il est notable que des structures relativement proches soient capables de combattre l'ensemble des pathogènes (ex. des azolés). Dans cette optique, nous proposons l'approche suivante afin de développer des composés mixtes antifongiques/antibactériens visant les infections conjointes *C. albicans*/*Acinetobacter baumannii*.

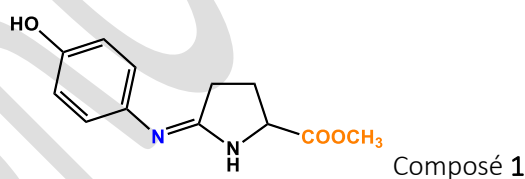
Notre Approche

Sur la base de ces données, nous avons envisagé le développement de composés mixtes antifongiques et antibactériens. Depuis septembre 2016, j'ai ainsi mis en place les premières étapes de ce projet. Comme cela sera détaillé par la suite, les premiers résultats sont encourageants et nous incitent à poursuivre nos investigations.

➤ Dans un premier temps, en utilisant la force de frappe de la chimie organique, une large librairie de composés innovants a été proposée en screening d'activités biologiques sur certains microorganismes sélectionnés pour leur pathogénicité et la prévalence de multirésistances (programme ESKAPE). Le partenaire identifié dans ce cadre est l'université de Queensland, qui propose un screening gratuit dans le cadre du programme CO-ADD- Community for Open Antimicrobial Drug Discovery.⁶⁵ L'activité des composés issus de la bibliothèque a donc été évaluée à 32 mg/L sur 5 lignées bactériennes (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*). Ce premier screening nous a permis d'identifier une cinquantaine de composés actifs appartenant à une dizaine de familles chimiques différentes.

➤ Dans un second temps, nous nous sommes rapprochés de nos collègues mycologues (Equipe du professeur B. Sendid, LIRIC, Inserm UMR995) afin d'évaluer l'activité biologique de ces composés sur *Candida albicans*.

Suite aux différents résultats, le **composé 1** a été retenu en tant que HIT. Il appartient à la famille des iminopyrolidines. Il se distingue par une bonne activité sur *A. baumannii*, couplée avec une bonne activité sur *C. albicans*. Il s'agit donc, comme souhaité, d'un antibactérien/antifongique mixte.

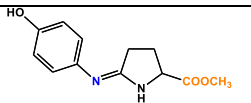
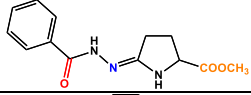
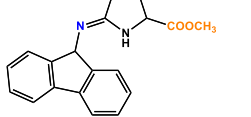
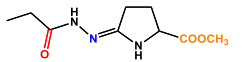
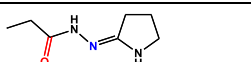
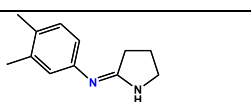
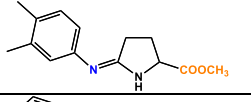
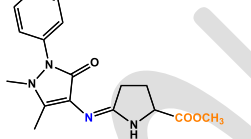
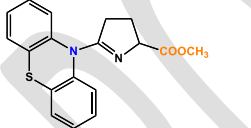
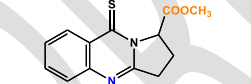
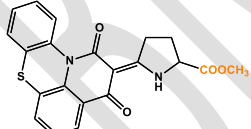
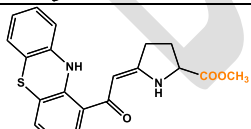


%Inhibition @32mg/L					@10 ⁻³ M
<i>S. aureus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i>
26	10	12	NA	72	68

L'élongation de la chaîne en position 2 par un groupement benzoylhydrazono entraîne une perte totale de l'activité sur *A. baumannii*, indiquant une possible restriction stérique dans cette position (Tableau 11, composé 2). De façon convaincante, l'addition d'un groupement aromatique très encombré en position 2 entraîne une perte totale d'activité antibactérienne (Tableau 11, composé 3).

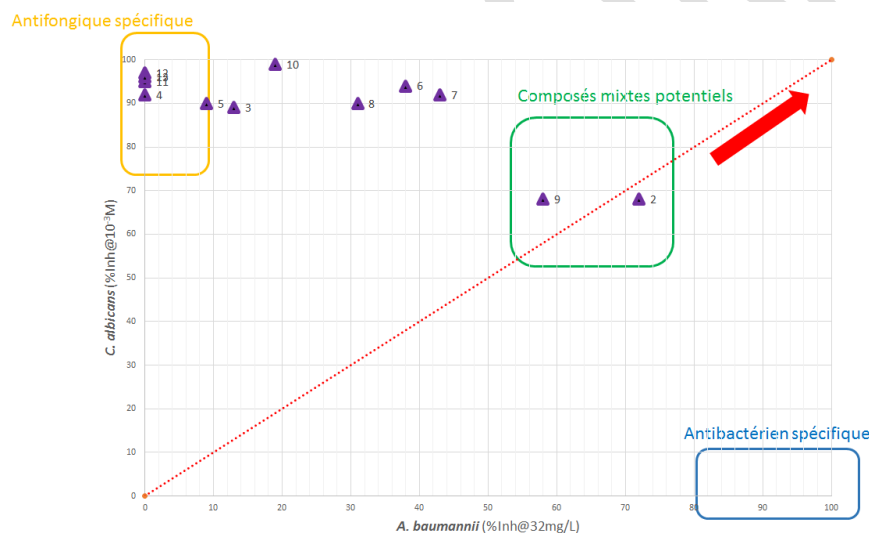
⁶⁵ <http://www.co-add.org/>, consulté le 31/12/2017

Tableau 11. Screening de la chimiothèque – Résultats préliminaires

Composé	Structure	%Inhibition @32mg/L					@10 ⁻³ M
		<i>S. aureus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i>
1		26	10	12	NA	72	68
2		24	NA	NA	NA	13	89
3		NA	NA	NA	NA	NA	92
4		26	NA	9	NA	9	90
5		15	NA	16	NA	38	94
6		15	NA	8	NA	43	92
7		19	NA	14	NA	31	90
8		21	NA	15	NA	58	68
9		24	9	17	6	19	99
10		26	7	NA	7	NA	95
11		NA	NA	NA	NA	NA	97
12		NA	NA	NA	NA	NA	96

	NA : non actif
	20 < %inhibition < 40
	40 < %inhibition < 60
	60 < %inhibition < 80
	80 < %inhibition < 100

La présence d'une chaîne propionylhydrazono en position 2 ne permet pas de rétablir l'activité *A. baumannii* (Tableau 11, composé 4). Cette constatation nous laisse envisager 2 hypothèses : i) le groupement aromatique est important ; ii) le groupement carbonyle est particulièrement délétère pour l'activité. Il est particulièrement intéressant de noter que la délétion du groupement carboxylate en position 5 permet d'augmenter les activités sur *A. baumannii* tout en atteignant de très bonnes activités sur *C. albicans* (Tableau 11, comparaison composés 4-5 et 6-7). Cela laisse donc penser qu'une modulation en position 5 est envisageable pour moduler les activités. En série iminopyrrolidine, l'addition d'un groupement 2-phénylpyrazol-3-one encombré permet de maintenir une activité correcte vis-à-vis de *A. baumannii* (Tableau 11, composé 8). Lorsqu'un groupement phénothiazine est substitué en position 5 du pyrrole (Tableau 11, composé 10), l'activité bactérienne est diminuée alors que l'activité fongique est excellente (99% d'inhibition). L'addition d'une structure polycyclique de type pyrroloquinazoline-9-thione (Tableau 11, composé 10), induit la perte d'activité vis-à-vis de *A. baumannii* alors que l'activité antifongique reste excellente. La même conclusion s'impose lorsque le groupement phénothiazine est inclus dans des structures plus complexe, cyclique ou non (Tableau 11, composés 11 et 12).



Graph 2.

Suite à ce premier screening, nous avons identifié deux composés mixtes antifongique/antibactérien. Quelques composés spécifiquement antifongiques ont également été identifiés. En revanche, aucun composé spécifiquement antibactérien n'a été obtenu.

De ces différents résultats, nous avons choisi de concentrer nos efforts sur les motifs suivants, afin de développer des antibactériens/antifongiques mixtes *A. baumannii*/*C. albicans* :

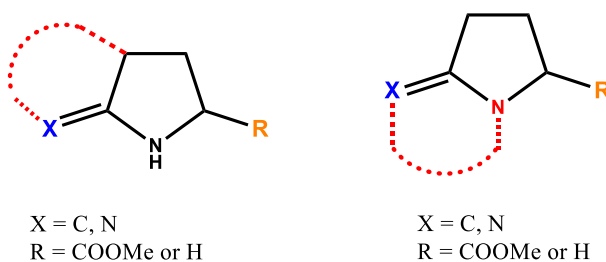


Figure 24.

Nous avons identifié différents axes de travail et partenaires pour développer ce projet.

❖ **Axe 1 : modulation chimique des motifs.**

Ce travail sera réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Durable et Santé de HEI. En privilégiant les méthodes de chimie verte, différentes séries de dérivés du composé HIT seront réalisées, permettant de définir les relations structures activités nécessaires au développement de composés mixtes probants.

❖ **Axe 2 : évaluation des activités antifongiques.**

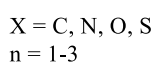
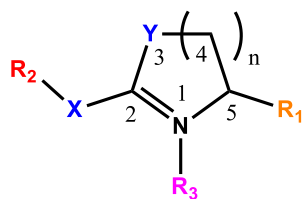
Ce travail sera réalisé au sein de l'équipe du professeur B. Sendid, LIRIC UMR 995. Différents axes d'étude seront privilégiés, afin de mesurer l'activité, mais également de déterminer les modes d'action de ces composés. Il est également envisagé, pour les plus actifs, de conduire des études de toxicité/efficacité sur modèles murins.

❖ **Axe 3 : évaluation des activités antibactériennes.**

Dans un premier temps, les composés synthétisés seront envoyés pour screening à l'université de Queensland. Nous aurons alors accès aux activités mesurées à 32 mg/L.

Pour les composés les plus actifs, nous nous sommes rapprochés de l'équipe "Biologie chimique des antibiotiques" du CIIL, dirigée par le Dr Ruben Hartkoorn, appartenant à l'Institut Pasteur de Lille. A ce jour, il est envisagé de confirmer les activités et la sélectivité des composés vis-à-vis d'*A. baumannii*. Des expériences complémentaires seront réalisées en cas d'activité probante de cette famille chimique (mutagène dirigée, séquençage...).

AXE 1 : MODULATION CHIMIQUE – ETABLISSEMENT DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE



L'objectif de cet axe est de proposer différentes modulations synthétiques autour des noyaux hydrazonepyrrolidines et iminopyrrolidines. Dans un premier temps, une modulation de la position 2 par différents nucléophiles sera réalisée, en conservant le groupement ester méthylique en position 5. (Axe 1.1). Ensuite, en conservant le groupement permettant les meilleures activités en position 2, nous modulerons la position 1 (introduction du groupement R_3 , Axe 1.2) puis la position 5 (modification du groupement R_1 , Axe 1.3). Une dernière série sera obtenue en combinant les modulations en position 1, 2 et 5 de façon conjointe (Axe 1.4).

Les relations structures activités seront également enrichies *via* l'introduction d'hétéroatomes en position 3 (modulation Y, Axe 1.5), ainsi que par modification du cycle pyro (variation de n, Axe 1.6). Une dernière famille sera proposée, permettant de rigidifier le système, en cyclisant entre les positions 1 et 2 (Axe 1.7).

Ces quelques familles chimiques devraient nous permettre de dresser des relations structure-activités utiles pour le futur développement de composés antifongiques/antibactériens mixtes.

1. Axe 1.1. Modulation de la position 2

Dans un premier temps, nous allons modifier la position 2 du pyroglutamate de méthyle **1** afin d'évaluer l'activité. La voie de synthèse retenue consiste en une substitution nucléophile sur l'iminoéther **2** (schéma X).

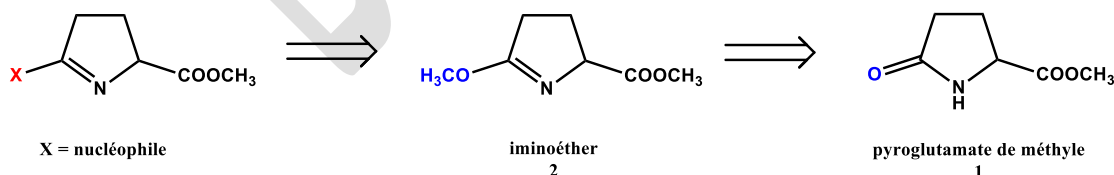


Schéma 27. Rétrosynthèse des modulations en position 2

Différents protocoles de synthèse de l'iminoéther **2** sont décrits, notamment par les membres du laboratoire.⁶⁶ Le pyroglutamate de méthyle **1** est chauffé en présence de 1,1 équivalent de sulfate de

⁶⁶ a) Homerin, G.; Baudalet, D.; Dufrénoy, P.; Rigo, B.; Ghinet, A. *Tet. Lett.* **2016**, 57(10), 1165-1170 ; b) Bourry, A. ; Akué-Gédu, R. ; Rigo, B. ; Hénichart, J.-P. ; Sanz, G. ; Couturier, D. *J. Het. Chem.* **2003**, 40(6), 989-993; c)

diméthyle à 60°C durant 12 heures sous atmosphère d'azote. Après refroidissement, la solution est versée dans un mélange refroidi à 5°C d'un excès de triéthylamine dans l'éther diéthylique. L'agitation est réalisée *via* un polytron permettant une extraction efficace de l'iminoéther dans la phase organique étherée. Cette procédure peut être réalisée sur des quantités de 200g, fournissant un large stock d'iminoéther **2**.

L'iminoéther peut être ensuite mis en réaction avec différents nucléophiles pour conduire aux composés souhaités (schéma 27). Seule la réaction en présence des hydrazides⁶⁷ et des nucléophiles carbonés^{68,63c} ont été décrites à ce jour.

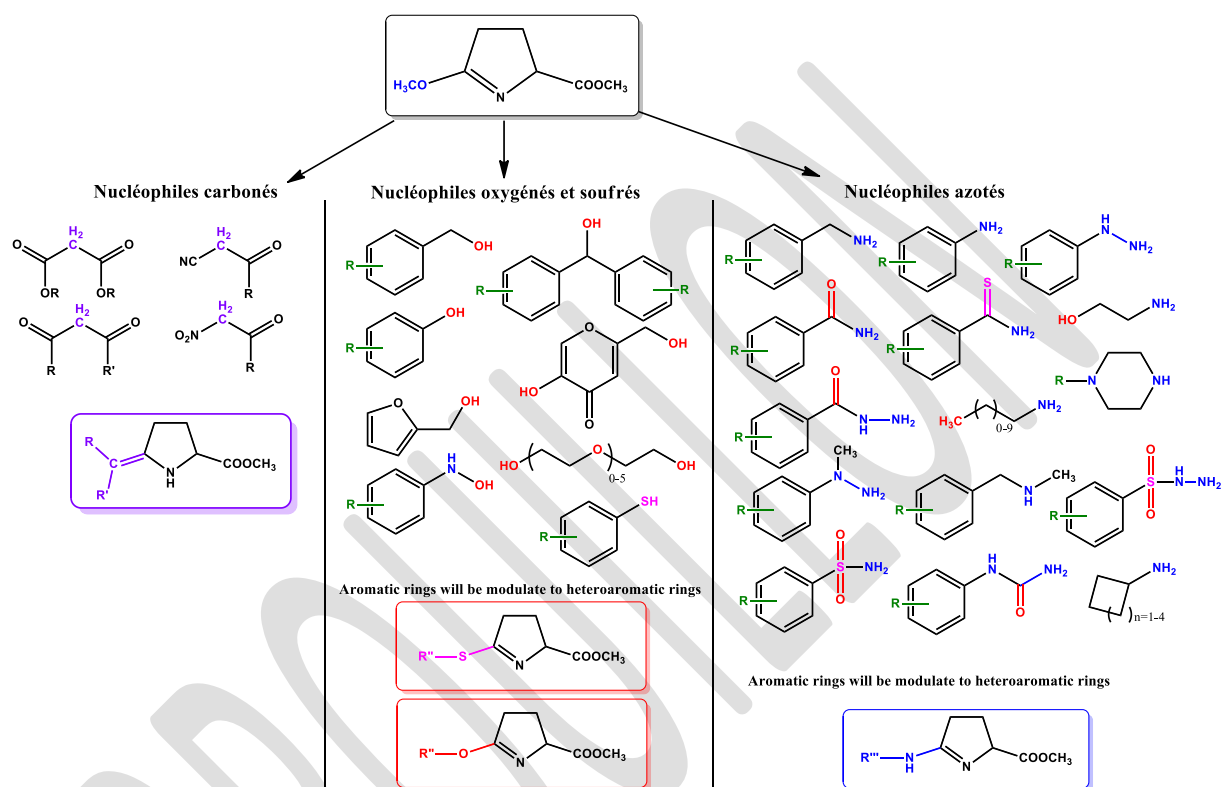


Schéma 28. Proposition de groupements nucléophiles pour substitution en position 2.

Ces différents composés seront testés par les partenaires biologistes dans le cadre du screening préliminaire. Nous pourrons alors connaître l'influence des différents motifs sur les activités antifongiques et antibactériennes. En fonction de ces résultats, la famille de groupements chimiques

Baudelet, D.; Daïch, A.; Rigo, B.; Lipka, E.; Gautret, P.; Homerin, G.; Claverie, C.; Rousseau, J.; Abuhaie, C.-M.; Ghinet, A. *Synthesis*, **2016**, 48(14), 2226-2244.

⁶⁷ a) Cao, G.-r.; Wang, S.; Wu, Y.-t.; Teng, D.-w. *Huaxue Shiji*, **2016**, 38(5), 475-480; b) Rigo, B.; Gouni, I.; El Ghamarti, S.; Gautret, P.; Couturier, D. *Synthetic Commun.*, **1994**, 24(21), 3055-3063; c) Edmondson, S.D.; Zhu, C.; Kar, N.F.; Di Salvo, J.; Nagabukuro, H.; Sacre-Salem, B.; Dingley, K.; Berger, R.; Goble, S.D.; Morriello, G.; Harper, B.; Moyes, C.R.; Shen, D.-M.; Wang, L.; Ball, R.; Fitzmaurice, A.; Frenkl, T.; Gichuru, L.N.; Ha, S.; Hurley, A.L.; Jochowitz, N.; Levorse, D.; Mistry, S.; Miller, R.R.; Ormes, J.; Salituro, G.M.; Sanfiz, A.; Stevenson, A.S.; Villa, K.; Zamlynyy, B.; Green, S.; Struthers, M.; Weber, A.E. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 609-623.

⁶⁸ a) Fasseur, D.; Rigo, B.; Leduc, C.; Cauliez, P.; Couturier, D. *J. Het. Chem.* **1992**, 29, 1285-1291; b) Pichlmair, S.; Mereiter, K.; Jordis, U. *Tet. Lett.*, **2004**, 45(7), 1481-1483; c) Millet, R.; Meulon, E.; Goossens, L.; Houssin, R.; Hénichart, J.-P.; Rigo, B. *J. Het. Chem.*, **2000**, 37(6), 1491-1494; d) Boisse, T.; Gavara, L.; Hénichart, J.-P.; Rigo, B.; Gautret, P. *Tetrahedron*, **2009**, 65, 2455-2466.

la plus prometteuse sera conservée pour poursuivre les modulations chimiques. L'un des premiers travaux consistera à moduler la capacité de liaisons H du composé HIT.

2. Axe 1.2. Modification des liaisons H - Introduction du groupement R₃

La modification du NH du cycle pyro sera effectué selon différents protocoles afin de moduler la capacité de liaison hydrogène en position 1.

a. Introduction d'un groupement aryle ou hétéroaryle

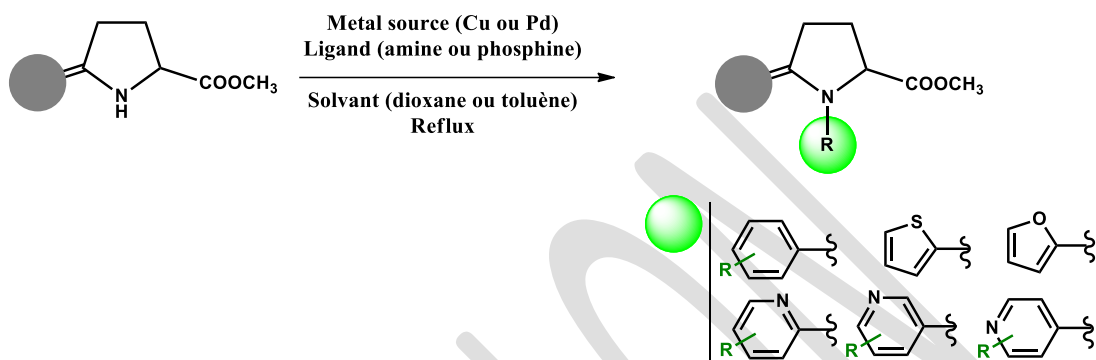


Schéma 29.

Afin d'introduire un groupement aryle ou hétéroaromatique, nous envisagerons l'utilisation d'un couplage croisé catalytique entre le dérivé en position 2 et l'halogénure d'aryle d'intérêt.

Différentes conditions ont été proposées dans la littérature et seront testées lors du projet :

a) Sous atmosphère d'azote, le composé est mis en suspension dans le dioxane en présence de 0,5 équivalent de CuI (source métallique), de carbonate de césium (base minérale, 2,5 équivalents) et 1 équivalent d'halogénure d'aryle. 1 équivalent du ligand DMEDA (N,N'-diméthyléthylènediamine) est alors ajouté goutte à goutte et la réaction catalytique peut commencer.^{69, 63c}

b) Il est également possible d'utiliser un métal noble tel que le tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium (0) en tant que catalyseur (charge de 2mol%). La réaction est alors menée dans le toluène à reflux en présence de carbonate de césium (1,4 éq.) et de Xantphos (5mol%, utilisé en tant que ligand).⁷⁰

c) Le même système catalytique au palladium peut être utilisé dans le dioxane, en augmentant la quantité de palladium à 5mol%.⁷¹

b. Introduction d'un groupement benzyle

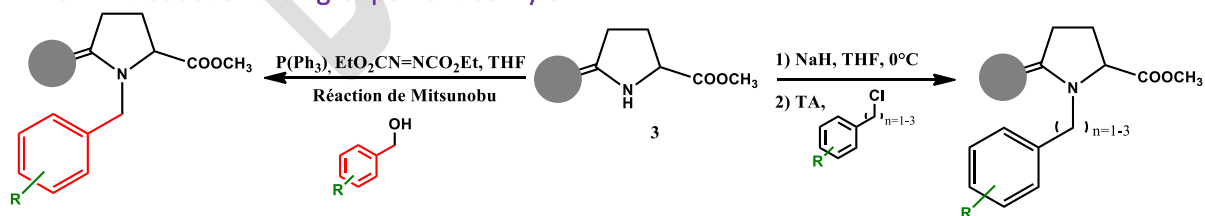


Schéma 30.

⁶⁹ Ghinet, A. ; Oudir, S.; Henichart, J.-P.; Rigo, B.; Pommery, N.; Gautret, P. *Tetrahedron* **2010**, *66*(1), 215-221.

⁷⁰ Michel, A.D.; Walter, D.S. *PCT Int. Appl.*, 2009074518, 18 Jun **2009** ; Kasai, S.; McGee, K.F.Jr. *PCT Int. Appl.*, 2010119992, 21 Oct **2010**.

⁷¹ Chambers, L.J.; Gleave, R.; Senger, S.; Walter, D.S. *PCT Int. Appl.*, 2008003697, 10 Jan **2008**.

Deux protocoles peuvent être envisagés pour introduire un groupement aromatique (benzylique ou phénéthylque) sur le composé **3**. Le premier est basé sur l'utilisation d'une base forte de type hydrure permettant de déprotoner l'azote NH et de générer un bon nucléophile sur le cycle. En présence d'un dérivé halogénure de benzyle, on observe alors une substitution nucléophile efficace pour introduire la dérivation en position 1. Différentes bases et conditions ont été rapportées.⁷² Un second protocole est basé sur la réaction de l'alcool benzylique *via* une réaction de Mitsunobu.⁷³ Il pourra permettre d'éviter l'utilisation de base forte, notamment pour éviter les réactions secondaires sur les dérivés de type hydrazone et hydrazines en position 2.

c. Introduction d'un groupement acyle

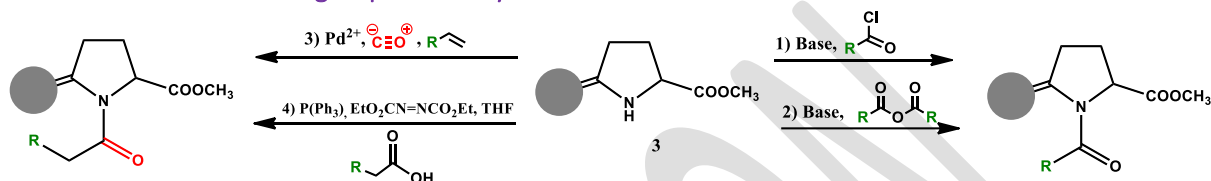


Schéma 31.

L'introduction d'un groupement acyle pourra être envisagée selon différents protocoles. Le plus classique consiste à faire réagir le dérivé du pyroglutamate de méthyle avec une base en présence du dérivé chlorure d'acyle souhaité. Différentes bases ont été décrites : organiques (Et₃N, DIPEA, pyridine, DBU), lithiée (BuLi) ou hydrures (NaH).⁷⁴ Il est également possible d'utiliser l'anhydride correspondant.⁷⁵

Récemment ont été décrites une réaction de Mitsunobu en présence d'un acide carboxylique⁵⁹ ainsi qu'une réaction d'hydroamidocarbonylation du pyroglutamate de méthyle par catalyse au palladium en présence d'un alcène.⁷⁶ Ces protocoles plus complexes pourront être envisagés si l'utilisation d'une base n'est pas possible.

3. Axe 1.3. Modification du groupement R₁

Le groupement ester méthylique sera modifié *via* différents protocoles afin de :

- **juger de son importance** : pour cela, nous commencerons par l'éliminer totalement, en synthétisant les dérivés de la proline. Nous pourrons alors confirmer si les résultats

⁷² a) Kono, M.; Harada, S.; Nemoto, T. *Chem. Eur. J.*, **2017**, 23(31), 7428-7432 ; b) Dubowchik, G.M.; Provencal, D.P. *PCT Int. Appl.*, 2001042245, 14 Jun **2001**; c) Li, J.; Stocks, M.; Dou, D.; Wan, J.; Feng, J.; Pan, F.; Song, H.; Hu, X.; Yi, L. *PCT Int. Appl.*, 2014127745, 28 Aug **2014**; d) Dikshit, D.K.; Kumar, K.S.A.; Dikshit, M.; Barthwal, M.K.; Misra, A.; Jain, M. *PCT Int. Appl.*, 2015044951, 02 Apr **2015**; e) Moutevelis-Minakakis, P.; Gianni, M.; Stougiannou, H.; Zoumpoulakis, P.; Zoga, A.; Vlahakos, A. D.; Iliodromitis, E.; Mavromoustakos, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13(10), 1737-1740.

⁷³ Panday, S.K.; Prasad, J.; Pathak, M.B. *Synthetic Commun.* **2011**, 41(24), 3654-3661.

⁷⁴ a) Itoh, T.; Miyazaki, M.; Ikeda, S.; Nagata, K.; Yokoya, M.; Matsuya, Y.; Enomoto, Y.; Ohsawa, A. *Tetrahedron*, **2003**, 59(19), 3527-3536; b) Skof, M.; Svete, J.; Kmetec, M.; Golic-Grdadolnik, S.; Stanovnik, B. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 7, 1581-1584; c) Drauz, K.; Kleemann, A.; Martens, J.; Scherberich, P.; Effenberger, F. *J. Org. Chem.* **1986**, 51(18), 3494-3498.

⁷⁵ a) Perry, M.A.; Trinidad, J.V.; Rychnovsky, S.D. *Org. Lett.* **2013**, 15(3), 472-475; b) Rigo, B.; Lespagnol, C.; Pauly, M. *J. Het. Chem.* **1988**, 25(1), 49-57.

⁷⁶ a) Li, H.; Fang, X.; Jackstell, R.; Neumann, H.; Beller, M. *Chem. Commun.* **2016**, 52(44), 7142-7145; b) Li, H.; Dong, K.; Neumann, H.; Beller, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(35), 10239-10243.

préliminaires observés pour les couples de composés 4/5 et 6/7 sont maintenus pour tous les substituants.

- **modifier la longueur de chaîne de l'ester** : la variation de la longueur de la chaîne apolaire entraînera une modulation de la balance hydrophilie/lipophilie ainsi qu'une stabilité enzymatique variable. Pour cela, il est possible de réaliser une transestérfication sur les dérivés du pyroglutamate de méthyle ou une estérification directe de l'acide pyroglutamique correspondant. Dans les deux cas, une catalyse par un acide organique (APTS) ou par un acide de Lewis ($ZrCl_4$) est décrite. Les conditions réactionnelles ainsi que le type d'acide seront choisis avec précaution selon les substituants déjà intégrés sur le cycle.
- **le réduire en alcool**⁷⁷ : l'ester méthylique est facilement réduit en alcool par le borohydrure de sodium à froid. On obtient alors l'alcool primaire qui peut être dérivé pour conduire à des rétroesters ou des sulfonates. Il est également possible d'activer l'alcool (tosylation ou méthylation) et de réaliser une substitution nucléophile pour introduire différents groupements tels que des amines, hydrazines...
- **introduire une chaîne amide ou hydrazide** par réaction d'aminolyse ou d'hydrazinolyse en présence d'un catalyseur acide⁷⁸
- **introduire un groupement méthoxy**: la modification sera réalisée par réaction électrochimique conduisant au dérivé de type ptérolactame avec des rendements quantitatifs. Celui-ci pourra alors conduire à la formation de sels d'acyliminiums permettant l'introduction de nucléophiles sur le carbone angulaire (C_5).

Le schéma suivant regroupe quelques possibilités, non exhaustives, de modification des dérivés du pyroglutamate de méthyle. La compétition avec la réactivité du NH cyclique sera à contrôler.

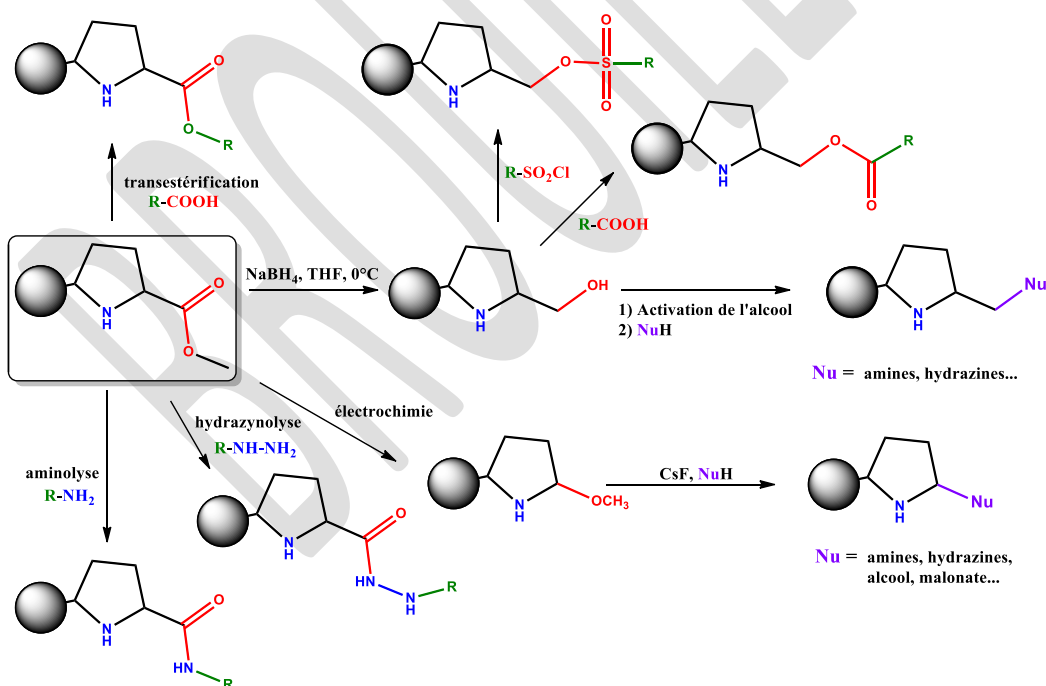


Schéma 32. Potentiel de modification de l'ester méthylique.

⁷⁷ a) Paul, S.; Schweizer, W.B.; Rugg, G.; Senn, H.M.; Gilmour, R. *Tetrahedron*, **2013**, 69(27-28), 5647-5659; b) Barrett, S.D.; Colombo, J.M.; Germain, B.D.; Kornilov, A.; Kramer, J.B.; Uzieblo, A.; Endrès, G.W.; Ciske, F.L.; Owen, T.A.; O'malley, J.P. *PCT Int. Appl.*, 2015009991, 22 Jan **2015**.

⁷⁸ Marini, I. *Lenzinger Berichte*, **1977**, 42, 12-14.

4. Axe 1.4. Capitalisation des connaissances en R₁, R₂, R₃

Les connaissances acquises sur l'impact des dérivations en positions 1, 2 et 5 seront rationalisées afin de définir la meilleure triade R₁, R₂, R₃ pour un composé aux activités mixtes sur *C. albicans* et *A. baumannii*. Ce composé HIT sera conservé pour la suite des études.

5. Axe 1.5. Introduction d'un hétéroatome en position 3 – Groupe Y

Il est envisagé de modifier le cycle pyrrolidinique en introduisant en position 3 un hétéroatome, conduisant aux motifs oxazolidin-2-one (4), imidazolidin-2-one (5) ou thiazolidin-2-one (6).



Figure 25.

Le méthyl 2-oxooxazolidine-4-carboxylate peut être obtenu par condensation du 2-amino-3-hydroxypropanoate de méthyle avec le phosgène ou un donneur de CO.⁷⁹ Un procédé de synthèse a été breveté pour produire le composé d'intérêt en utilisant le dioxyde de carbone et un catalyseur anionique fluoré en remplacement du phosgène.⁸⁰ Il est également possible de réaliser l'extension de cycle des N-carboxylates d'aziridines promu par un acide de Lewis.⁸¹ La combinaison d'une aziridine avec le dioxyde de carbone est également décrite.⁸² La réaction est catalysée par du diode et réalisée sous pression dans un autoclave en acier inoxydable.

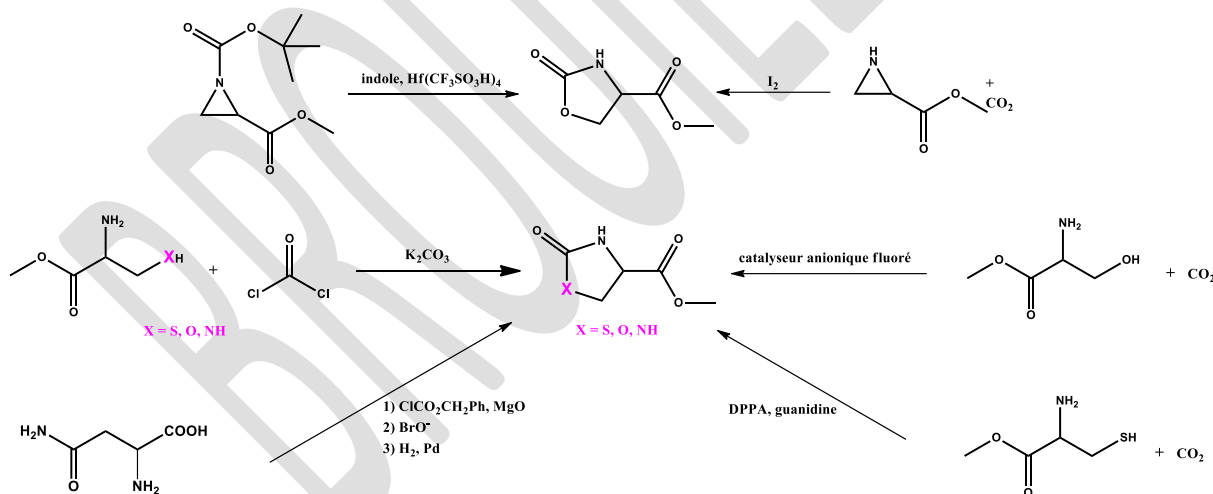


Schéma 33.

⁷⁹ a) Anil Kumar, K. S.; Misra, A.; Siddiqi, T.I.; Srivastava, S.; Jain, M.; Bhatta, R.S.; Barthwal, M.; Dikshit, M.; Dikshit, D.K. Eur. J. of Med. Chem., **2014**, *81*, 456-472; b) Basarab, G.S. et al. U.S. Pat. Appl. Publ., 20140206677, 24 Jul 2014; c) Sibi, M.P. et al U.S., 5623087, 22 Apr 1997 ; d) Simon, M.D.; Feldman, M.E.; Rauh, D.; Maris, A.E.; Wemmer, D.E.; Shokatet, K.M. ACS Chem. Biol., **2006**, *1*(12), 755-760; e) Rein, K.; Goicoechea-Pappas, M.; Anklekar, T.V.; Hart, G.C.; Smith, G.A.; Gawleyet, R.E. J. Am. Chem. Soc. **1989**, *111*(6), 2211-2217.

⁸⁰ Saito, S.; Noyori, R.; Naka, H.; Yamazaki, Y.; Takada, Y. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 2013199456, 03 Oct **2013**.

⁸¹ Tirotta, I.; Fifer, N.L.; Eakins, I.; Hutton, C.A. Tet. Lett. **2013**, *54*(7), 618-620.

⁸² Kawanami, H. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 2003096058, 03 Apr **2003**.

En substituant la sérine par la cystéine, il est possible en utilisant le dioxyde de carbone ou les dérivés du phosgène d'obtenir le 2-oxothiazolidine-4-carboxylate de méthyle.⁸³ L'utilisation d'un dérivé d'alanine en présence d'un donneur de CO ou la modification de l'asparagine permet la synthèse du 2-oxoimidazolidine-4-carboxylate de méthyle.⁸⁴

Ces modifications de cycle permettront de moduler la balance hydrophilie/lipophilie des composés ainsi que de créer un nouveau point d'ancrage chimique dans le cas du 2-oxoimidazolidine-4-carboxylate de méthyle.

6. Axe 1.6. Modification du cycle

L'influence de la taille du cycle, tout en conservant les groupements **R₁**, **R₂** et **R₃** les plus actifs identifiés, sera étudié. A cet effet, l'acide 2-azétidine-4-oxocarboxylique (**7**), l'acide 2-pipéridine-6-oxocarboxylique (**8**), l'acide 2-azépine-7-oxocarboxylique (**9**) seront utilisés en tant que noyaux d'intérêt.

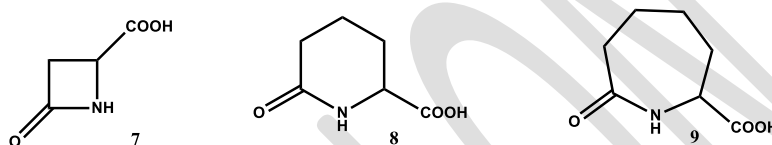


Figure 26.

7. Axe 1.7. Rigidification du système

Nous proposons également de rigidifier le système afin de définir des bicycles pouvant présenter une meilleure activité antifongique.

La série pyrroloquinazolin-9-one peut être obtenu par réaction de l'iminoéther en présence d'un dérivé de l'acide 5-aminobenzoïque à chaud dans le toluène selon le protocole décrit par Dunn *et al*⁸⁵ et appliqué par Boisse *et al*.⁸⁶

Ces synthons présentent l'avantage d'être dérivables par la position ester résiduelle, mais il est également possible d'introduire différents groupements en position 3 du cycle pyroglutamate.

La série triazole est obtenue par cyclisation en présence d'acide acétique dans le chlorobenzène des dérivés hydrazino.⁸⁷ Ce protocole, décrit récemment, semble plus performant que le protocole passant par les dérivés silylés décrit par notre laboratoire.⁸⁸

Nous pouvons également imaginer faire varier le bis-réactif en utilisant des composés tels que les acides aminés, les acides 2-aminométhylbenzoïques, les acides 2-hydrazinylbenzoïques ainsi que leurs homologues hétérocycliques.

⁸³ a) Kambe, T.; Maruyama, T.; Nagase, T.; Ogawa, S.; Minamoto, S.; Sakata, K.; Maruyama, T.; Nakai, H.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*(2), 702-713; b) Paz, J.; Pérez-Balado, C.; Iglesias, B; Muñoz, L. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*(9), 3037-3046.

⁸⁴ Stahl, A.; Steckhan, E.; Nieger, M. *Tet. Lett.* **1994**, *35*(40), 7371-4.

⁸⁵ Dunn, A. D.; Kinnear, K. I. *J. Het. Chem.* **1986**, *23*(1), 53-57.

⁸⁶ Boisse, T.; Gavara, L.; Hénichart, J.-P.; Rigo, B.; Gautret, P. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2455-2466.

⁸⁷ Cao, G.; Wang, S.; Wu, Y.-T.; Teng, D.-W. *Huaxue Shiji*, **2016**, *38*(5), 475-480.

⁸⁸ Rigo, B.; Gouni, I.; El Ghamarti, S.; Gautret, P.; Couturier, D. *Synthetic Commun.* **1994**, *24*(21), 3055-63.

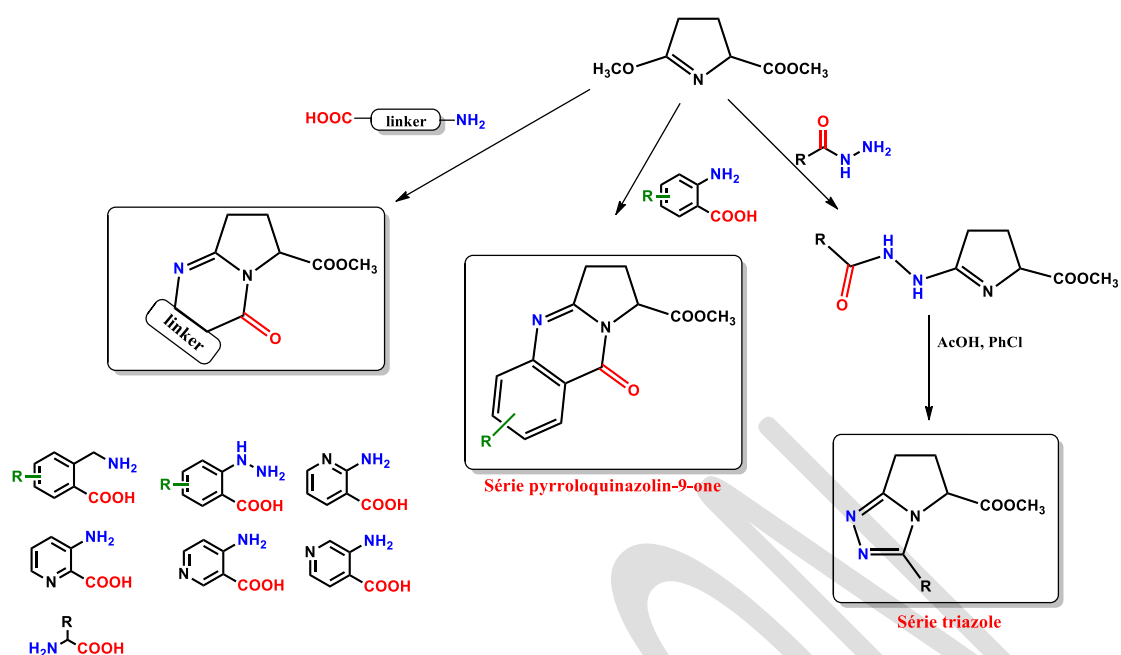


Schéma 34.

AXE 2 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ SUR *CANDIDA ALBICANS*

Une fois que les candidats médicaments auront été synthétisés, il est nécessaire d'évaluer leur activité antifongique sur *Candida albicans*. Dans cette optique, nous travaillerons en collaboration avec l'équipe du professeur Boualem Sendid, plus particulièrement avec le docteur Samir Jawhara, HDR au sein de l'équipe.

Différentes séries de tests seront réalisées, afin de valider le potentiel des composés et proposer quelques pistes concernant le mode d'action de ces candidats.

1. Partie 1 : Modèles *in vitro*

a. Screening d'action directe de molécules dans un modèle de bioluminescence

La totalité des composés synthétisés sera évaluée pour son action directe sur une souche de *Candida albicans* bioluminescente en plaques 96 puits. Lors des expériences, dans chaque puits seront introduits précisément 10^6 cellules de *Candida* en présence d'une concentration connue du composé et de substrat nutritif. Un contrôle en présence du tampon PBS seul sera réalisé. Deux antifongiques de référence (caspofongine et fluconazole) seront également utilisés en tant que témoins.

Afin d'évaluer la survie des levures dans le milieu, un dosage de l'ATP, produit par toute cellule vivante au sein des mitochondries, sera réalisé. Ce dosage repose sur la mesure de l'intensité de l'émission lumineuse qui est produite dans le milieu mis en présence de luciférine et de luciférase. Cette bioluminescence, comparée avec celles du tampon seul et des antifongiques de référence, permettra de quantifier l'action antifongique des composés. En effet, il existe une relation de proportionnalité directe entre le quantum de lumière émise et la quantité d'ATP produite par les cellules.

De plus, un suivi de la variation de la bioluminescence dans le temps sera réalisé, afin d'évaluer le profil d'activité des composés par rapport aux antifongiques de référence. Nous pourrons alors estimer

grossièrement si les composés ont un profil fongicide (identique à la caspofongine) ou fongistatique (identique au fluconazole).

A titre d'exemple, voici un cliché d'une plaque 96 puits obtenu dans un appareil d'imagerie Xenogen ayant permis d'effectuer le screening préliminaire de la chimiothèque. La lecture se fait en continue pendant 3 minutes avec une superposition des images (1image/seconde). Cette méthode permet d'observer en temps réel l'évolution des cellules fongiques.

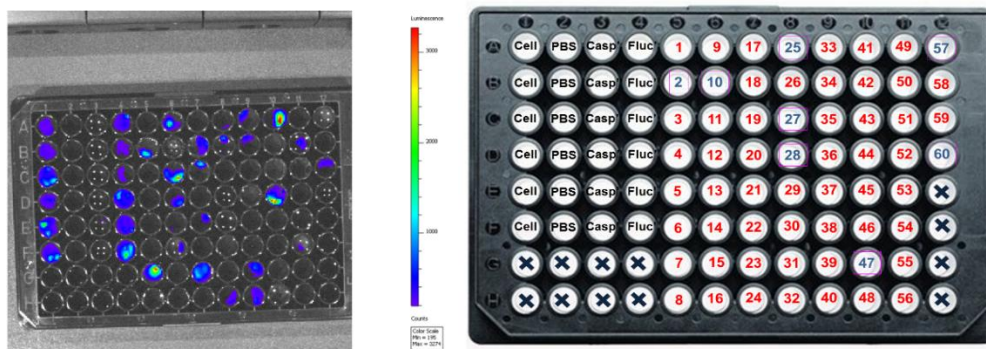


Figure 27.

La lecture de ces résultats, rapportés au témoin PBS, nous permettra de calculer un pourcentage d'inhibition à un temps donné. Ces mesures seront comparées aux contrôles caspofongine et fluconazole. Les études sur les composés les plus intéressants seront poursuivies.

b. Mesure des CMI des composés

La sensibilité d'un microorganisme est mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique considéré: la plus petite quantité d'antibiotique capable d'inhiber une croissance visible à l'œil nu. Pour déterminer cette CMI, il est possible d'utiliser la méthode standardisée de Kirby Bauer modifiée. Il s'agit de la méthode par diffusion à partir de disques imprégnés d'antibiotiques qui classe les souches à tester en 3 catégories : sensibles (S), intermédiaires (I) et résistantes (R) sur la base des diamètres critiques. En réalisant des concentrations décroissantes d'antibiotiques sur chacun des disques, il est possible d'évaluer rapidement la CMI de chaque composé. Pour cela, dans le cas de *Candida albicans*, il est nécessaire d'utiliser le milieu de Sabouraud, auquel sera additionné des antibiotiques afin d'éliminer les bactéries et promouvoir la croissance des champignons et levures.

Le milieu de culture aseptique est placé dans une boîte de Pétri et ensemencé par un inoculum standardisé de *Candida*. Après quelques minutes de séchage de l'inoculum, des disques de papier buvard imbibés de concentrations variables de candidat-médicament sont déposés à la surface de la gélose. Les disques sont disposés de façon uniforme à 15 mm du bord de la boîte. Après avoir assuré un contact uniforme des disques avec la surface, les boîtes sont mises à incuber à 37°C durant 16 à 18 heures.

La lecture des résultats est réalisée en mesurant le diamètre de chaque zone d'inhibition (y compris le diamètre du disque), en comparaison des diamètres de composés contrôle.

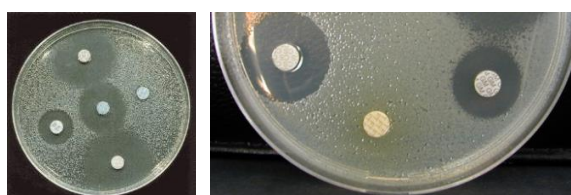


Figure 28.

c. Effet des molécules antifongiques sectionnées sur les souches cliniques résistantes aux antifongiques

L'activité des composés ressortant du screening primaire seront confirmées sur boîte de pétri, en conservant la caspofungine et le fluconazole comme contrôles.

En cas de confirmation, le spectre d'activité des composés sera élargi, en testant sur boîte de pétri des souches cliniques *C. albicans* résistantes, notamment à la caspofungine. D'autres souches telles que *Candida glabrata* ou *Candida tropicalis* seront également évaluées.

Nous aurons ainsi une vision plus nette du potentiel de nos composés. En effet, un composé actif uniquement sur les souches sensibles de *Candida albicans* ne représenterait pas une avancée majeure dans le domaine des antifongiques et justifierait l'abandon de son développement.

A la suite de ces confirmations, nous retiendrons donc les composés montrant un spectre d'activité le plus large possible, principalement sur les souches résistantes de l'espèce *albicans* et idéalement sur d'autres espèces de *Candida*, dont certaines deviennent problématiques en milieu hospitalier.

d. Etude préliminaire du mode d'action par cytométrie en flux et microscopie confocale

La cytométrie en flux (fluorescence-activated cell sorting) est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont relatifs i) aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule et à leur structure interne ; ii) aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Ce procédé d'analyse individuelle est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées. La fonction tri des cytomètres en flux les plus évolués permet de trier physiquement une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques.

Dans notre cas, les composés étudiés seront tout d'abord mis en présence de cellules de *Candida albicans*. Ensuite, la solution résultante sera incubée en présence de marqueurs spécifiques des différents composants de la paroi de la levure : β -glucanes, chitine ou mannanes. Ces marqueurs pourront être des anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques des composants ou des récepteurs tels que la dectine-1 ou les TLR. Les conjugués utilisés sont couplés à des fluorochromes (FITC ou PE) ou fluorescents. Après incubation et lavages, les anticorps secondaires nécessaires seront ajoutés. La solution de levures résiduelle sera alors analysée par cytométrie en flux. La granulométrie des cellules (FSC) ainsi que la taille de celles-ci (SSC) seront analysées sur des échelles linéaires, tandis que l'intensité de fluorescence (à différentes longueurs d'onde) sur des échelles logarithmiques. Les analyses permettent d'obtenir un histogramme autour de différentes populations, répertoriant l'abondance relative des différents composés de la paroi ainsi que le pourcentage de cellules mortes. Selon le mode d'action des candidats-médicaments, une disproportion des différents composés marqués pourra être observée. Par exemple, si le candidat-médicament inhibe la biosynthèse des β -glucanes, il sera logique d'observer une population proportionnellement plus forte de chitine et de

mannanes. Cette étude quantitative par cytométrie en flux sera complétée par une étude par microscopie confocale.

En effet, la microscopie confocale est de plus en plus utilisée dans le monde de la recherche biomédicale. Grâce à sa très faible profondeur de champs (environ 400 nm), cette technique permet de sectionner un échantillon en tranche optique de très bonne qualité sans traitement ultérieur. Comme pour la microscopie de fluorescence classique, il faut avec le microscope confocal, marquer les échantillons à étudier avec des fluorochromes. Les fluorochromes sont alors excités par le L.A.S.E.R. qui convient. Pour cela, le faisceau du rayon L.A.S.E.R. est balayé sur l'ensemble de l'échantillon grâce à un jeu de miroir. L'émission des fluorochromes, résultant de l'excitation, est captée par le photomultiplicateur et l'image est reconstituée point par point sur l'écran. Le microscope confocal permet d'obtenir des images de fluorescence des marqueurs présents dans l'échantillon étudié. Les images ne sont composées que de la fluorescence émise au plan focal. Les images apparaissent donc nettes sans traitement. En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet.

Dans notre étude, le microscope confocal permettra de marquer et d'identifier les différents composants de la paroi de *Candida albicans*, tel que les β -glucanes, la chitine et les mannanes. Selon le mode d'action des candidats-médicaments, une disproportion des différents composés pourra être observée. Il sera également possible d'observer la forme de la cellule en présence du candidat-médicament, afin de constater la présence d'altérations de sa structure et notamment de sa paroi, résultant de l'action de candidat-médicament.

Globalement, ces deux séries de mesures devraient permettre de proposer un mode d'action potentiel des différents composés. Ces modes d'action pourront être approfondis et affinés en collaboration avec une équipe spécialisée en microbiologie et génétique.

e. Effet des molécules antifongiques sélectionnées sur la perméabilité des cellules intestinales Caco-2

La barrière épithéliale intestinale est constituée de deux compartiments : une couche de cellules épithéliales cylindriques et une couche de mucus couvrant ces cellules. Les éléments jouant un rôle fondamental dans la protection de l'intégrité de cette barrière sont les cellules épithéliales intestinales et les jonctions serrées intercellulaires. Les cellules épithéliales intestinales sont en effet étroitement associées, tant sur le plan morphologique que fonctionnel, à travers les jonctions intercellulaires. Le rôle et la composition des jonctions serrées sont partiellement connus. Elles constituent une barrière semi-perméable aux différentes molécules et ainsi une vraie frontière entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur de l'organisme.

Afin de mimer ce transport, la perméabilité membranaire des cellules intestinales (enterocytes HT29 ou Caco 2) sera étudiée en présence des levures et des candidats-médicaments. Ce test de perméabilité sera établi par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER). Dans un premier temps, la perméabilité maximale sera établie au sein des cellules intestinales. Ensuite, une concentration connue de candidat-médicament sera additionnée, suivie de l'infection par les levures. Si la membrane est perméable, les cellules intestinales peuvent la passer et se développer. Cette étude montrera donc la capacité des candidats-médicaments à réduire l'infection/invasion fongique.

2. Partie 2 : tests *in vivo*

Lors de ces tests, nous évaluerons l'effet antifongique systémique curatif des composés sélectionnés *in vitro*. Des groupes de souris C57BL6 seront infectées par un inoculum unique de *Candida albicans* à J0. Cinq heures plus tard, une première dose de candidat-médicament sera injectée par voie intrapariétale aux souris. Ces injections seront poursuivies durant 5 jours de traitement. Chaque jour, les souris seront pesées et leur taux de survie sera observé. Des groupes témoins (placebo et antifongiques commerciaux tels que la caspofungine et le fluconazole) seront également suivis.

A J14, les souris seront sacrifiées et différentes analyses seront réalisées. Visuellement, le nombre de colonies de levures sera comptabilisé sur chaque organe entier de chaque souris. La rate, le rein, le foie, le cœur et le cerveau seront étudiés. Ces organes seront ensuite pesés et broyés individuellement afin de réaliser des cultures pour déterminer le nombre de colonies par unité de poids.

Ces différentes mesures permettront d'évaluer la toxicité et l'efficacité de nos candidats-médicaments sur les infections fongiques massives dans un modèle murin systémique.

AXE 3 : EVALUATION DE L'ACTIVITE SUR *ACINETOBACTER BAUMANNII*

En parallèle de l'activité antifongique, l'activité antibactérienne contre *Acinetobacter baumannii* sera évaluée. Pour cela, nous procéderons par étapes.

1. Evaluation *in vitro*

La première étape consistera à envoyer les composés au docteur Alysha Elliott de l'Institute for Molecular Bioscience, à l'Université de Queensland, en Australie. Cette équipe réalisera l'évaluation *in vitro* des composés sur les 5 souches bactériennes ESKAPE, dont *Acinetobacter baumannii* (souche ATCC 19606, sensible à la colistine). Les mesures seront réalisées en duplicat en plaque 384 puits. Les composés dont l'inhibition est supérieure à 80% à une concentration de 32 µg/mL seront considérés comme actifs et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) seront alors mesurées par dilutions successives.

La sélectivité pour *Acinetobacter baumannii* sera évaluée en comparaison avec les autres pathogènes ESKAPE (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Les composés les plus actifs seront alors conservés pour validation.

2. Validation et mode d'action

Pour les composés les plus actifs, nous nous sommes rapprochés de l'équipe "Biologie chimique des antibiotiques" du CIIL, dirigée par le Dr Ruben Hartkoorn, appartenant à l'Institut Pasteur de Lille. A ce jour, il est envisagé de confirmer les activités des composés vis-à-vis d'*A. baumannii*. Des expériences complémentaires seront réalisées en cas d'activité probante de cette famille chimique (mutagène dirigée, séquençage...). L'objectif est de déterminer si la famille de composés a un réel potentiel en thérapeutique. Le cas échéant, un dépôt de projet de plus grande ampleur sera réalisé (ANR, FEDER...).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Afin d'évaluer ce projet, la matrice SWOT suivante a été constituée :

FORCES	FAIBLESSES
<ul style="list-style-type: none">• Le projet répond à un besoin réel de santé publique• Implication du porteur de projet• Soutien de l'établissement employeur et de l'équipe de recherche• Dynamisme des équipes impliquées• Résultats préliminaires probants• Expertise des équipes dans leur domaine respectif	<ul style="list-style-type: none">• Les partenaires chimistes et biologistes (<i>A. baumannii</i>) n'ont jamais collaboré auparavant• Pas de personnel dédié à ce jour• Peu de recul sur le secteur des antibactériens/antifongiques
OPPORTUNITES	MENACES
<ul style="list-style-type: none">• Intégration d'une nouvelle équipe dynamique (<i>A. baumannii</i>) experte dans son domaine• Thématique d'enjeu sociétale qui devrait permettre de décrocher un financement	<ul style="list-style-type: none">• Difficulté de financement des projets• Lourdeur administrative dans la conduite du projet• Peu de temps disponible à la paille

La force principale de ce projet repose sur le besoin sociétal en alternatives thérapeutiques dans le domaine des antibactériens et/ou antifongiques. Le dynamisme des différents partenaires, experts dans leur domaine devrait permettre de faire rapidement avancer ce projet. Bien que les collaborations débutent seulement, les résultats préliminaires positifs nous encouragent à poursuivre nos efforts. Il est notable que les différentes équipes de biologistes impliquées et les résultats préliminaires obtenus résultent de mon implication des 18 derniers mois dans le développement de la thématique antibactérien/antifongique, efforts que je compte poursuivre afin de parfaire les équipes projet selon les besoins que nous identifierons au fur et à mesure de l'avancée du projet.

Le manque de personnel dédié à ce jour devrait être pallié par le dépôt de demandes de financement sur différents fonds (ANR, ANSES, FRM...). J'ai en effet répondu cette année à l'appel Chimie pour la Médecine de la Fondation de la Recherche Médicale, sur la thématique « *Candida albicans* versus inflammation », en collaboration avec le Dr Samir Jawhara (LIRIC, équipe 2). Ce projet n'a malheureusement pas été retenu, mais nous comptons le réviser pour une seconde soumission. La même démarche sera réalisée avec le Dr Ruben Hartkoorn, en cas de confirmation de nos résultats préliminaires.

D'un point de vue technique, la démarche de créer des composés possédant plusieurs activités pour une seule molécule a été relativement développée durant les 20 dernières années. Cependant, la combinaison antifongique/antibactérien est relativement originale. Elle pourrait permettre de limiter le problème de l'émergence de résistance et la multiplication des prescriptions.

De plus, d'un point de vue chimique, les familles de molécules envisagées sont originales et n'ont jamais été décrites pour ce genre d'activité, ce qui permettra d'envisager des valorisations ultérieures. Après une prise de brevet éventuelle, des publications et communications auprès des journaux spécialisés tels que Journal of Medicinal Chemistry contribueront à la diffusion des résultats

de ce projet, après concertation avec la cellule de valorisation de notre établissement, pour vérifier que le timing de diffusion n'entrave pas le bon déroulement du processus de valorisation.

BROUILLON

BROUILLON

ACTIVITES D'ENCADREMENT

BROUILLON

Bilan

2016-2019 :	Thèse de doctorat d'Anca - Elena Dascalu (début 10/10/16)	
	Financement : 50% HEI / 25% Université Catholique de Lille/ 25% IFMAS	P20
	Directrices de thèse (HDR) : A. GHINET / E. LIPKA	P21
	Sujet BIOANTIBIO : « <i>Antibactériens et antifongiques biosourcés</i> »	D1
<hr/>		
2016-2019 :	Thèse de doctorat de Claire Imbs (début 01/01/16)	
	Financement : 100% ESCOM	
	Directeur de thèse (HDR) : E. LEONARD	P19
	Sujet NACRE : « <i>Nouveaux Amphiphiles par Chimie Radicalaire</i> »	
<hr/>		
2012-2015 :	Thèse de doctorat de Nicolas Sotto	B1
	Financement : 100% SAS PIVERT	P17
	Directeur de thèse (HDR) : C. LEN	P16
	Sujet BIODVG : « <i>Vers la synthèse écocpatible de divinylglycol biosourcé</i> »	P12 P11
<hr/>		
2014-2016 :	Supervision du post-doctorat de Clément Cazorla	P18
	Financement : 100% SAS PIVERT	P17
	Sujet : DVG POLYM : « <i>Synthesis of biobased polymers starting from bio-sourced DVG</i> »	P16 P15
<hr/>		
2018 (6 mois) :	Stage de M2 de Simge DUMAN (Etudiante Master Chimie et Sciences du Vivant – Univ. Lille)	
	Financement : 50% HEI – 50% ISA	
	Sujet BIOFONG : « <i>Biofongicides à base d'acide kojique</i> »	
<hr/>		
2017 (6 mois) :	Stage de M2 d'Audrey Damiens (Etudiante Master TVRN UPJV Amiens)	
	Financement : 100% HEI	
	Sujet AMPHIBIOSTIM : « <i>Nouveaux Amphiphiles Biosourcés en tant que Stimulateurs de défense des plantes – définition de relations structure-activité</i> »	
<hr/>		
2014 (6 mois) :	Stage de M2 de Noadya Monnier (3 ^{ème} année d'Ingénieur Centrale Marseille)	
	Cotutelle avec Dr Magali Deleu (Agrobiotech Gembloux)	
	Financement : 100% ESCOM	
	Sujet : « <i>Evaluation du potentiel d'interaction de composés amphiphiles avec les membranes végétales et/ou microbiennes – définition de relations structure-activité</i> »	
<hr/>		
2009-2010 :	Management de 4 techniciens (niveau DUT / BTS Chimie et Génie Chimique) au sein d'un Laboratoire de Développement Chimique de la société ROOWIN SA.	
2008-2015 :	Suivi de 4 étudiants Licence, 2 étudiants M1	

Durant ces dix dernières années, j'ai eu la responsabilité d'encadrer une quinzaine de personnes et d'étudiants de parcours et niveaux variés, ce qui m'a appris énormément sur moi-même.

En **industrie**, j'ai dirigé une équipe de **4 techniciens** (BTS ou DUT Chimie ou Génie Chimique), tous des hommes. Généralement, ces techniciens prenaient en charge des projets différents, ce qui m'a forcé à développer mon sens de l'organisation. J'ai également dû m'adapter aux difficultés que rencontrent toute jeune femme lorsqu'elle est nommée à un poste hiérarchiquement supérieur à celui des hommes qu'elle doit manager. Après une période d'observation mutuelle, nous avons défini des règles de travail suffisamment souples pour pouvoir gérer les imprévus liés au travail de synthèse à façon.

Nous avons construit le schéma suivant : le jour n-1, à 17 heures, je voyais chacun des techniciens afin de faire le point sur l'avancée de son travail, ses difficultés et nous planifions la journée n, qui débutait pour lui à 8 heures. Le technicien pouvait alors quitter le laboratoire, et j'assurais, le cas échéant, la fin de la synthèse engagée ou les analyses nécessaires, jusqu'à 19 heures. Le jour n, lorsque j'arrivais à 9 heures, les synthèses étaient déjà commencées et nous avons mis en place une période de réflexion commune sur des thématiques telles que la résolution d'un problème chimique ou l'étude d'un procédé.

Cette organisation a bien fonctionné, puisque nous avons toujours tenu les délais et les spécifications requises par les clients. La plage horaire de travail étant étendue (8h-19h) nous apportait de la souplesse. Et les exercices de chimie nous incitaient à la formation constante et à toujours imaginer des problèmes challengeant les autres. Globalement, cette période en tant que responsable de laboratoire a été très riche personnellement et professionnellement parlant. Je peux aujourd'hui affirmer qu'elle m'a appris à m'adapter, avec le sourire, à toute circonstance, quelle que soit le caractère de la personne en face de moi.

En tant qu'**enseignant-chercheur**, j'ai pu superviser le travail de 3 doctorants et 3 étudiants master recherche. Ces expériences ont été très différentes d'un étudiant à l'autre. En effet, suite à mon expérience en industrie, j'ai choisi de ne pas imposer un modèle à suivre à mes étudiants, mais plutôt à faire évoluer ma façon de les accompagner en fonction de leur maturité et de leur potentiel propre. Parfois, des objectifs initiaux ambitieux ont été revus à la baisse ; parfois, nous avons dépassé les attentes...

Certaines façons de travailler sont cependant constantes d'un étudiant à l'autre. Lors des premières périodes de présence des étudiants au laboratoire, je les accompagne systématiquement à la paillasse, afin de les guider et d'évaluer leur besoin pratique individuel. Cette période varie de quelques semaines à quelques mois.

Ensuite, nous travaillons par objectif. Selon une périodicité prédéfinie, je leur fixe des objectifs à remplir (famille de composés à synthétiser, bilan bibliographique à fournir...). Après le délai imparti, j'attends un bilan écrit de leurs résultats que je peux archiver. A titre d'exemple, pour un doctorant débutant, les objectifs sont fixés par semaine, avec un bilan le vendredi en fin de journée pour une prise de décision d'action à commencer le lundi matin. Cette façon de travailler ressemble à celle des équipes projet en industrie et est parfaitement adaptable en laboratoire académique.

De plus, je veille à passer le plus de temps possible au laboratoire, afin d'être disponible pour toute question éventuelle.

D'un point de vue personnel, je donne ma confiance à l'étudiant pour la conduite de son projet. La confiance cependant ne se conçoit sans communication. Il est tout à fait libre de proposer ses idées, et de les tester, après discussion commune. Je qualifierai cette attitude de bienveillante. La confiance

accordée ne se brisera que si l'étudiant fait preuve d'un manquement caractérisé. Dans ce cas, je deviendrai beaucoup plus intrusive.

Globalement, les relations avec les candidats que j'ai encadrés n'ont pas toujours été un long fleuve tranquille, mais nous avons toujours atteint les objectifs attendus par les financeurs, même si parfois pour y arriver, j'ai dû personnellement m'investir énormément à la paillasse. D'un point de vue valorisation, tous les doctorants sont publiant. En ce qui concerne les étudiants de master recherche, c'est plus variable, étant donné qu'ils sont généralement sur des sujets plus exploratoires.

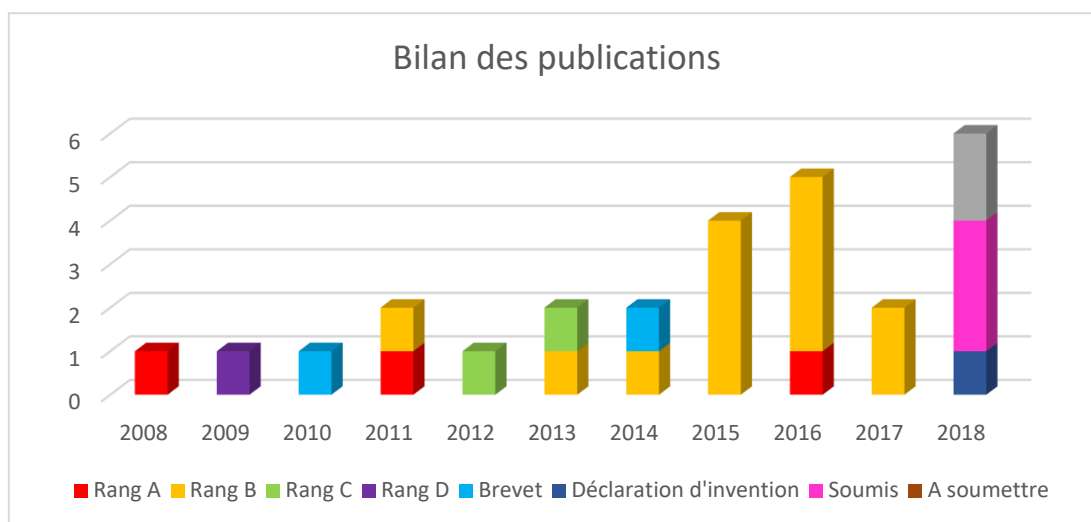
Pour résumé, je dirais que je suis une encadrante présente et réactive, capable de dégager du temps pour aider d'un point de vue pratique. Je ne conçois pas le travail de recherche sans le volet paillasse. J'essaie également de dupliquer dans mon encadrement la confiance que m'avait accordée mon ancien directeur de thèse, confiance qui m'avait permis d'exprimer mes envies et de progresser. Mon objectif primordial est que le doctorant devienne autonome, maître de son projet et puisse s'insérer professionnellement, en ayant défini ses qualités et affiné ses envies.

BROUILLON

BROUILLON

LISTE DES PUBLICATIONS

19 publications, 2 brevets, 1 déclaration d'invention, 18 communications orales.



Brevets et déclarations d'invention

- B2** *Process of synthesis of divinylglycol from glycerol via pinacol coupling.* Déposant : PIVERT ; N. Sotto, M. Billamboz, C. Chevrin-Villette, C. Len, FR. Demande (2016), FR 3030507 A1 20160624.
- B1** *2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones and related compounds useful as HIV replication inhibitors.* F. Bailly, M. Billamboz, F. Christ, P. Cotelle, Z. Debyser, C. Lion, V. Suchaud. WO2011EP73480 20111220.
- D1** Déclaration d'invention SATT Nord : *Antibactériens sélectifs d'Acinetobacter Baumannii.* A.-E. Dascalu, A. Ghinet, M. Billamboz, E. Lipka, R. Hartkoorn, C. Ple, B. Rigo, déposée en mars 2018.

Publications dans des journaux internationaux avec comité de lecture (ACLI)

- P19** *Selective One-Pot-Three-Steps Cascade Reaction: from aromatic aldehydes to 2,2-diphenyl ethanol derivatives.* M. Billamboz, C. Imbs, E. Léonard, C. Len. *Org. Process Res. Dev.* **2017**, 21(6), 835-843. (IF = 2,857; Rang B)
- P18** *Green and Scalable Palladium on Carbon-Catalyzed Tsuji-Trost Coupling Reaction Using an Efficient and Continuous Flow System,* C. Cazorla, M. Billamboz, H. Bricout, E. Monflier, C. Len. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 6, 1078-1085. (IF = 3,068; Rang B)
- P17** *Selective Pinacol Coupling Reaction using a Continuous Flow System.* N. Sotto, C. Cazorla, C. Villette, M. Billamboz, C. Len. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 11065-1107. (IF = 4,721; Rang B)
- P16** *Towards the Sustainable Synthesis of Biosourced Divinylglycol from Glycerol.* N. Sotto, C. Cazorla, C. Villette, M. Billamboz, C. Len. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, 4, 6996-7003 (IF = 4,642; Rang B)
- P15** *Conjugated Dienyl Derivatives by Green Bisallylic Substitution: Synthetic and Mechanistic Insight.* C. Cazorla, M. Billamboz, C. Chevrin-Villette, F. Hapiot, E. Monflier, C. Len. *ChemCatChem* **2016**, 8(14), 2321-2328. (IF = 4,556; Rang B)
- P14** *2-hydroxyisoquinoline-1,3-(2H,4H)-diones (HIDs) as human immunodeficiency virus type 1 integrase inhibitors: Influence of the alkylcarboxamide substitution of position 4.,* M. Billamboz

- V. Suchaud, F. Bailly, C. Lion, M.-L. Andreola, F. Christ, Z. Debyser, P. Cotelle. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 117, 256-268. (IF = 3,447; Rang A)
- P13** Azobenzenes and catalysis, E. Léonard, F. Mangin, C. Villette, M. Billamboz, C. Len. *Catal. Sci. Technol.*, **2016**, 6(2), 379-398. (IF = 5,426 ; Rang B)
- P12** Selective Pinacol Coupling on Regenerable Supported Acids in Sole Water, N. Sotto, M. Billamboz, C. Chevrin-Villette, C. Len. *J. Org. Chem.* **2015**, 80(12), 6375-6380. (IF = 4.721; Rang B)
- P11** Simple and expeditious pinacol coupling of non usual α,β -unsaturated carbonyl compounds in water. M. Billamboz, N. Sotto, C. Chevrin-Villette, C. Len, *RSC Adv.* **2015**, 5, 46026-46030. (IF= 3,84 ; Rang B)
- P10** Self-assembly, photoresponsive behavior and transport potential of azobenzene grafted dendronized polymeric amphiphiles. M. Kumari, M. Billamboz, E. Léonard, C. Len, C. Böttcher, A.K. Prasad, R. Haag, S.K. Sharma. *RSC Adv.* **2015**, 5, 48301-48310. (IF= 3,84 ; Rang B)
- P9** First Pinacol Coupling in Emulsified Water: Key Role of Surfactant and Impact of Alternative Activation Technologies. M. Billamboz, C. Len. *Chem. Sus. Chem.* **2015**, 8(10), 1664-1675. (IF= 7,657 ; Rang B)
- P8** Synthesis and evaluation of a photochromic surfactant: application to the Pd-catalysed Tsuji-Trost reaction in water. M. Billamboz, F. Mangin, E. Leonard, C. Chevrin Villette, N. Drillaud, C. Len. *J. Org. Chem.* **2014**, 79(2), 493-500. (IF= 4,721; Rang B)
- P7** 4-Substituted 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as a Novel Class of HIV-1 Integrase Inhibitors. M. Billamboz, V. Suchaud, F. Bailly, C. Lion, J. Demeulemeester, C. Calmels, M.-L. Andréola, F. Christ, Z. Debyser, P. Cotelle. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**, 4(7), 606-611. (IF= 3,073; Rang C)
- P6** 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones (HIDs), Novel Inhibitors of HIV Integrase with a High Barrier to Resistance. B.A. Desimmie, J. Demeulemeester, V. Suchaud, O. Taltynov, M. Billamboz, C. Lion, F. Bailly, S.V. Strelkov, Z. Debyser, P. Cotelle, F. Christ. *ACS Chem. Biol.*, **2013**, 8 (6), pp 1187–1194. (IF= 5,356; Rang B)
- P5** Novel Strategy for the Bis-Butenolide Synthesis via Ring-Closing Metathesis. M. Billamboz, J.C. Legeay, F. Hapiot, E. Monflier, C. Len, *Synthesis*, **2012**, 44, 137-143. (IF= 2,5; Rang C)
- P4** Magnesium Chelating 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones, as Inhibitors of HIV-1: Integrase and/or the HIV-1 Reverse Transcriptase Ribonuclease H Domain: Discovery of a Novel Selective Inhibitor of the Ribonuclease H Function, M. Billamboz, F. Bailly, C. Lion, N. Touati, H. Vezin, C. Calmels, M.-L. Andréola, F. Christ, Z. Debyser, P. Cotelle. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1812-1824. (IF= 4,898; Rang A)
- P3** 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as inhibitors of HIV-1 integrase and reverse transcriptase RNase H domain: Influence of the alkylation of position 4, M. Billamboz, F. Bailly, C. Lion, C. Calmels, M.-L. Andréola, M. Witvrouw, F. Christ, Z. Debyser, L. De Luca, A. Chimirri, P. Cotelle. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 535-546. (IF= 3,346; Rang B)
- P2** Facile Synthesis of 4-Alkoxy-carbonylisoquinoline-1,3-diones and 5-Alkoxy-carbonyl-2-benzazepine-1, 3-diones via a Mild Alkaline Cyclization. M. Billamboz, F. Bailly, P. Cotelle. *J. Het. Chem.* **2009**, 46, 392-398. (IF= 1,009; Rang D)
- P1** Design, synthesis, and biological evaluation of a series of 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as dual inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the reverse transcriptase RNase H domain. M. Billamboz, F. Bailly, M.L. Barrecca, L. De Luca, J.F. Mouscadet, C. Calmels, M.L. Andréola, M. Witvrouw, F. Christ, Z. Debyser, P. Cotelle. *J. Med. Chem* **2008**, 51, 7717-7730. (IF= 4,898; Rang A)

Publications et déclaration d'invention en cours de rédaction ou soumission

- P20** *Kinetic study of chlorinated chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography for separation of new biosourcable compounds.* A.-E. Dascalu, A. Ghinet, M. Billamboz, E. Lipka, en révision.
- P21** *CsF as a powerful catalyst for solvent free nucleophilic substitutions. Cesium fluoride as a powerful catalyst for solvent-less modifications of biosourced pterolactam* A.-E. Dascalu, A. Ghinet, E. Lipka, M. Collinet, B. Rigo, M. Billamboz, soumis.
- P22** *Divinylglycol as a bio-based platform.* T. Vanbésien, M.-M. Wei, H. Bricout, M. Billamboz, C. Len, E. Monflier, F. Hapiot, soumis.
- P23** *Silica supported orthophosphoric acid (H_3PO_4/SiO_2): preparation, characterization and evaluation as green reusable catalyst.* M. Billamboz, E. Léonard.
- P24** *Driving the selectivity: study of solvent-free acid-mediated pinacolic-pinacolone rearrangement under microwave irradiation.* M. Billamboz, E. Léonard, A. Daïch.

Communications avec actes dans un congrès international (ACTI) ou national (ACTN)

- C18** *Impact of alternative technologies for promoting pinacol coupling reaction.* **In:** *IntechemProcess*, Compiègne (France), 2018
- C17** *Green chemistry: from principles to applications. Case study of Pinacol Coupling.* **In:** *4ème Colloque Franco-Roumain de Chimie Médicinale*, Université « Al. I. Cuza », Iasi (Roumanie), 2017
- C16** *Toward "greener" pinacol coupling reactions.* N. Sotto, C. Len, M. Billamboz, C. Chevrin-Villette. **In:** 3th International Symposium on Green Chemistry – ISGC3 La Rochelle (France), 2015
- C15** *First pinacol coupling under micellar conditions – Key role of surfactant and impact of alternative activation technologies.* C. Len, M. Billamboz. **In:** 250th American Chemical Society National meeting, Innovation from discovery to application - Boston (USA), 2015
- C14** *Glycerol dehydration to acrolein in liquid phase.* N. Sotto, H. Yalgin, M. Billamboz, D. Luart, C. Chevrin-Villette, C. Len. **In:** *Catalysis Applied to Biomass – Toward sustainable processes and chemicals – CABiomass-II Compiègne (France)*, 2014
- C13** *Photochromic micellar catalysis applied to the palladium catalyzed nucleophilic allylic substitution.* M. Billamboz, F. Mangin, N. Drillaud, C. Chevrin-Villette, E. Banaszak-Léonard, C. Len. **In:** *Catalysis Applied to Biomass – Toward sustainable processes and chemicals – CABiomass-II – Compiègne (France)*, 2014
- C12** *Photochromic micellar catalysis: A convenient tool applied to the palladium-catalyzed Tsuji-Trost reaction.* M. Billamboz, F. Mangin, N. Drillaud, C. Chevrin-Villette, E. Banaszak-Léonard, C. Len. **In:** 5th EuCheMS Chemistry Congress - Istanbul (Turkey), 2014
- C11** *Effect of surfactant on the pinacol coupling reaction in sole water.* M. Billamboz, C. Len. **In:** *Catalysis Applied to Biomass – Toward sustainable processes and chemicals – CABiomass-II - Compiègne (France)*, 2014
- C10** *Micelle photorégulable au service de la catalyse – Exemple de la substitution allylique nucléophile.* M. Billamboz, F. Mangin, N. Drillaud, C. Chevrin-Villette, E. Banaszak-Léonard, C. Len. **In:** 16^{èmes} journées de formulation, Groupe Formulation, Société Chimique de France, Villeneuve d'Ascq, 2014.
- C9** *Pinacol coupling in sole water: Key role of surfactants on rate and selectivity.* M. Billamboz, C. Len. **In:** 5th EuCheMS Chemistry Congress - Istanbul (Turkey), 2014.

- C8** *Novel photochromic surfactants as chemoreactor for organic synthesis in aqueous media.* C. Len, E. Léonard, M. Billamboz, C. Villette, N. Drillaud, F. Mangin, I. Pezron. **In**: 2nd International Symposium on Green Chemistry – ISGC2 La Rochelle (France), 2013.
- C7** *N-hydroxyisoquinoline-1,3-dione derivatives as dual inhibitors of HIV-1 Integrase and RNase H that bind divalent cations.* M. Billamboz, F. Bailly, G. Mbemba, J.-F. Mouscadet, A. Faure, M.-L. Andréola, Z. Debyser, M. Witvrouw, P. Cotelle. **In** : XXth Internatoinal Symposium on Medicinal Chemistry, Vienna (Austria), 2008.
- C6** *Une nouvelle famille d'inhibiteurs mixtes chélatants de l'intégrase et de la Ribonucléase H du VIH-1 : les dérivés de la N-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione.* M. Billamboz, F. Bailly, G. Mbemba, J.-F. Mouscadet, A. Faure, M.-L. Andréola, Z. Debyser, M. Witvrouw, P. Cotelle. **In** : Semaine d'Etudes de Chimie Organique (SECO45), La Colle Sur Loup (France), 2008.
- C5** *Une nouvelles famille d'inhibiteurs mixtes chélatants de l'intégrase et de la Ribonucléase H du VIH-1 : les dérivés de la N-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione.* M. Billamboz, F. Bailly, P. Cotelle. **In** : Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs, Lille (France), 2008.
- C4** *Dérivés de la N-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione : inhibiteurs des enzymes virales à deux cations métalliques.* M. Billamboz, F. Bailly, P. Cotelle. **In** : Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs, Caen (France), 2007. [Prix de la Communication Orale](#).
- C3** *Dérivés de la N-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione : inhibiteurs des enzymes virales à deux cations métalliques.* M. Billamboz, F. Bailly, G. Mbemba, J.-F. Mouscadet, A. Faure, M.-L. Andréola, P. Cotelle. **In** : SAJEC, Ile de France (France), 2007.
- C2** *Synthèse de dérivés de la N-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione : inhibiteurs mixtes des enzymes virales à deux cations métalliques.* M. Billamboz, F. Bailly, P. Cotelle. **In** : 20^{èmes} Journées Franco-Belges de Pharmaco-chimie, Lille (France), 2006.
- C1** *Synthèse de dérivés de la 2-hydroxyisoquinoléine-1,3-dione, inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1.* M. Billamboz, F. Bailly, G. Mbelba, J.-F. Mouscadet, P. Cotelle. **In** : Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs, Lille (France), 2006.

PUBLICATIONS SELECTIONNEES

Chimie pharmaceutique

- *2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones (HIDs), Novel Inhibitors of HIV Integrase with a High Barrier to Resistance.* B.A. Desimmie, J. Demeulemeester, V. Suchaud, O. Taltynov, M. Billamboz, C. Lion, F. Bailly, S.V. Strelkov, Z. Debyser, P. Cotelle, F. Christ. *ACS Chem. Biol.*, **2013**, 8 (6), pp 1187–1194. (IF= 5,356; Rang B)
- *Design, synthesis, and biological evaluation of a series of 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as dual inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the reverse transcriptase RNase H domain.* M. Billamboz, F. Bailly, M.L. Barrecca, L. De Luca, J.F. Mouscadet, C. Calmels, M.L. Andréola, M. Witvrouw, F. Christ, Z. Debyser, P. Cotelle. *J. Med. Chem* **2008**, 51, 7717-7730. (IF= 4,898; Rang A)

Chimie durable

- *Conjugated Dienyl Derivatives by Green Bisallylic Substitution: Synthetic and Mechanistic Insight.* C. Cazorla, M. Billamboz, C. Chevrin-Villette, F. Hapiot, E. Monflier, C. Len. *ChemCatChem* **2016**, 8(14), 2321-2328. (IF = 4,556; Rang B)
- *First Pinacol Coupling in Emulsified Water: Key Role of Surfactant and Impact of Alternative Activation Technologies.* M. Billamboz, C. Len. *Chem. Sus. Chem.* **2015**, 8(10), 1664-1675. (IF= 7,657 ; Rang B)
- *Synthesis and evaluation of a photochromic surfactant: application to the Pd-catalysed Tsuji-Trost reaction in water.* M. Billamboz, F. Mangin, E. Leonard, C. Chevrin Villette, N. Drillaud, C. Len. *J. Org. Chem.* **2014**, 79(2), 493-500. (IF= 4,721; Rang B)

BROUILLON

Muriel BILLAMBOZ

13 rue du Molinel - 59160 LOMME

Mariée, 2 enfants

Née le 12 janvier 1982 à Besançon

06.86.26.84.40

muriel.billamboz@yncrea.fr

Qualification aux fonctions de Maître de Conférence – Section 32 – N°11232216770

Chercheur en Chimie Durable et Santé

Expériences Professionnelles

- Depuis septembre **2016** : **HEI- Groupe Yncrea** (Ecole des Hautes Etudes d'Ingénieur)

Enseignant-Chercheur au département Chimie, Textiles et Process Innovants (CTPI), Laboratoire de Chimie Durable et Santé – Rattachement UMR Inserm U995 - LIRIC

- 2010-2016 : **ESCOM/UTC** (Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale/Université de Technologie de Compiègne)

Enseignant-Chercheur en Chimie Organique Durable - Directeur Recherche : Pr. C. Len : « Nouveaux outils pour la synthèse de molécules biosourcées à visée industrielle » - Equipe TIMR EA4297

Formateur au sein de la société **SANOFI** en formation continue (Chimie Organique et Médicinale)

- 2009-2010 : **ROOWIN SA**

Responsable Laboratoire R&D (confidentiel) : « Synthèse à façon – Recherche, développement et production »

- 2008-2009 : **Laboratoires Servier (Oril Industrie)**

Ingénieur de Recherche en Développement au sein du Laboratoire Industriel, équipe du Dr J. Fournier (*confidentiel*) : « Développement de voies d'accès à un principe actif en vue d'une application à l'échelle industrielle »

Formation

2005-2008 : **Thèse de doctorat** (01/10/2005 – soutenance 10/10/2008) financée par une bourse docteur-ingénieur CNRS/Région, spécialité Chimie Organique et Macromoléculaire, Université de Lille 1 – **Mention Très Honorable**.

2005-2006 : Mastère Spécialisé en Drug Design, ENSCL, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille et Université de Lille 2 – Droit et Santé (**Major de promotion**)

2002-2005 : Ingénieur Chimiste de l'ENSCL / Master 2 Recherche « Chimie Organique et Macromoléculaire », Université de Lille 1- ENSCL (**Major de promotion**)

2007 : **Bourse d'étude pour l'Ecole d'été du LEEM Recherche** – Les entreprises du Médicament – Abbaye des Vaux de Cernay – « *Le développement préclinique du médicament* »

Activités d'enseignement

En formation continue

En octobre 2013, la direction de l'ESCOM m'a sollicitée afin de répondre à un appel d'offre de la société **SANOFI**, qui souhaitait étoffer sa formation continue *via* des modules de chimie organique et de chimie médicinale. Après validation de notre proposition, j'ai animé en tant que formateur SANOFI, 5 sessions de ces modules (session de 14 heures chacune).

En formation initiale

Cours magistraux et travaux pratiques : En tant qu'enseignant-chercheur, j'ai eu l'opportunité d'enseigner sous tout format et tout type de classe (groupe de 20 à 130 étudiants) des cours de niveaux et sujets variés : *Chimie organique*, *Structure et propriétés des matériaux*, *Chimie Organométallique*, *Macromolécules et applications*, *Macromolécules et biologie*, *Green Chemistry et Drug Design*.

Chacun des cours (français ou anglais) est construit sous format powerpoint et évolue au regard des avancées et découvertes du domaine concerné. Je veille à intégrer différents outils pédagogiques tels que les projets, le travail par groupe, les chronoquizz d'autoévaluation et l'autoapprentissage.

Encadrements Projets Chimie HEI4 (80h) : Projets de chimie organique à objectif recherche « Autour de la Sessiline – 2016-2017 » ; « Antioxydants – 2017-2018 », groupes de 3-4 étudiants HEI4, bibliographie, protocole expérimental, manipulations.

Encadrements Projets Co-Elab (150h) : Projet co-elaboratif ORANGY financé par un industriel (JFT&Co) pour répondre à la problématique de « Conception d'une solution innovante de nettoyage automatique pour une machine à presser les oranges » ; groupe de 5 étudiants, suivi, tests, rapports.

Responsabilités liées à l'enseignement

- 2016-... :** **Co-Responsable de l'Unité d'Enseignement « Chimie, Matériaux et Environnement »**
Evaluer les besoins, proposer et mettre en place les évolutions pédagogiques dans le domaine « Chimie, Matériaux et Environnement ».
- 2016-... :** **Référent de classe (50 étudiants) sur les 3 années du cycle ingénieur HEI.**
Interlocuteur privilégié des étudiants : assure la liaison entre le groupe, l'administration et le corps professoral. Suivi et accompagnement (méthodologie de travail, gestion du planning, rencontre des parents).
- 2012-2106 :** **Responsable des TP de chimie organique de 4A – ESCOM**
Implication des étudiants : mise en place de travaux pratiques ciblés sur les activités de recherche ESCOM et accès au matériel de pointe du laboratoire de Recherche.
- 2012-2016 :** **Responsable des Unités d'Enseignements Optionnels 4A – ESCOM**
Organisation et évolution pédagogique des enseignements optionnels (60h/an) : définition des branches, des matières, proposition des intervenants, projets...

2012-2016 : Tuteur apprentissage ESCOM : suivi des étudiants en formation par apprentissage ;
rencontre avec les tuteurs entreprise sur les 3 années du cycle ingénieur.

BROUILLON

REFERENCES

1. Andreola, M. L. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3713-3723.
2. Hang, J. Q.; Rajendran, S.; Yang, Y.; Li, Y.; Wong Kai In, P.; Overton, H.; Parkes, K. E. B.; Cammack, N.; Martin, J. A.; Klumpp, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *317*, 321–329.
3. Barreca, M. L.; Rao, A.; De Luca, L.; Zappalà, M.; Gurnari, C.; Monforte, P.; De Clercq, E.; Van Maele, E.; Debysers, Z.; Witvrouw, M.; Briggs, J.M.; Chimirri, A. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 1450-1455.
4. Ames, D. E.; Grey, T. F. *J. Chem. Soc.* **1955**, *351*, 3518–3521.
5. Billamboz, M.; Bailly, F.; Barreca, M.L.; De Luca, L.; Mouscadet, J.F.; Calmels, C.; Andréola, M.L.; Witvrouw, M.; Christ, F.; Debysers, Z.; Cotellet, P. *J. Med. Chem* **2008**, *51*, 7717-7730.
6. La lignée MT4 est une lignée de cellules T humaines transformées par le virus HTLV1. Ces cellules sont particulièrement sensibles au virus HIV1 puisque 6 à 7 jours après surinfection par des quantités infimes de virus HIV1, elles montrent un effet cytopathogène important (formation de syncytia) conduisant 50 à 80% des cellules vers la mort.
7. Billamboz, M. ; Bailly, F. ; Lion, C. ; Calmels, C. ; Andréola, M.-L. ; Witvrouw, M. ; Christ, F. ; Debysers, Z. ; De Luca, L. ; Chimirri, A. ; Cotellet, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 535-546.
8. a) De Luca, L. ; De Grazia, S. ; Ferro, S. ; Gitto, R. ; Christ, F. ; Debysers, Z. ; Chimirri, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*(2), 756-764 ; b) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748 ; c) Korb, O.; Stützel, T.; Exner, T. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 84-96.
9. Hare, S.; Gupta, S.S.; Valkov, E.; Engelma, A.; Cherepanov, P. *Nature*, **2010**, *464*, 232-236.
10. Billamboz, M.; Bailly, F.; Cotellet, P. *J. Het. Chem.* **2009**, *46*, 392-398.
11. Billamboz, M.; Bailly, F.; Lion, C.; Calmels, C.; Andréola, M.-L.; Witvrouw, M.; Christ, F.; Debysers, Z.; De Luca, L.; Chimirri, A.; Cotellet, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 535-546.
12. Fräter, G. ; Müller U. ; Günther, W. *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 1269-1277.
13. a) Spangler, C.W.; McCoy, R.K.; Dembek, A.A.; Sapochak, L.S.; Gates, B.D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1989**, *1*, 151-154; b) Schwarzwald, G.M.; Steinhardt, S.E.; Pham, H.V.; Houk, K.N.; Vanderwal, C.D. *Org. Lett.*, **2013**, *15*(23), 6014-6017; c) Brown, D.M.; Li, M.T.-P. U.S. Pat. Appl. Publ., 20150329511, 19 Nov **2015**; d) Brown, D. M. U.S. Pat. Appl. Publ., 20140155638, 05 Jun **2014**; e) Lin, C.-W.; Liu, S.-W.; Hou, D.-R. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*(32), 5292-5299; f) Ohmiya, H.; Yoshida, M.; Sawamura, M. *Synlett*, **2010**, *14*, 2136-2140; g) Donohoe, T.J.; Kershaw, N.M.; Orr, A.J.; Wheelhouse, K.M. P.; Fishlock, L.P.; Lacy, A.R.; Bingham, M.; Procopiou, P.A. *Tetrahedron*, **2007**, *64*(5), 809-820; h) Liu, C.-W.; Yeh, T.-C.; Chen, C.-H.; Yu, C.-C.; Chen, C.-S.; Hou, D.-R.; Guh, J.-H. *Tetrahedron*, **2013**, *69*(14), 2971-2976.
14. a) Verweij, P.E.; Snelders, E.; Kema, G.H.; Mellado, E.; Melchers, W.J. *Lancet Infect. Dis.* **2009**, *9*, 789-795; b) Snelders, E.; Huis In 't Veld, R.A.; Rijs, A.J.; Kema, G.H.; Melchers, W.J.; Verweij, P.E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*(12), 4053-4057; c) Enserin, M. *Science* **2009**, *326*, 1173.
15. Vaezi, A. ; Fakhim, H. ; Javidnia, J. ; Khodavaisy, S. ; Abtahian, Z. ; Vojoodi, M. ; Nourbakhsh, F. ; Badali, H. *J. Mycol. Méd.* **2018**, *28*, 59-64.
16. Propositions du groupe de travail special pour la preservation des antibiotiques ; “Tous ensemble, sauvons les antibiotiques”, Rapporteurs ; Dr Jean Carlet et Pierre Le Coz, Juin **2015**
17. Donnée issues de l'étude Burden menée en France par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS)
18. Centers for Diseases Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States **2013** (<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>), consulté le 25/11/2017
19. <http://domino.home/html/home?target=www.rand.org/randeurope/research/projects/antimicrobial-resistance-costs.html>, consulté le 25/11/2017
20. Bréchet, C.; Plantin, J. ; Sauget, M. ; Thouverez, M. ; Talon, D. ; Cholley, P. ; Guyeux, C. ; Hocquet, D. ; Bertrand, X. *Clin Infect Dis.* **2014**, *58*, 1658-1665.
21. Plan Ecoantibio : <http://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2017>, consulté le 26/11/2017
22. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1057-1098.
23. WHO, « Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics », published on-line 02.27.2017, consulté le 15/11/2017.
24. http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_R7-fr.pdf, consulté le 15/11/2017.
25. Abu-Elteen, K.; Hamad, M. *Jordan J Biol Sci* **2012**, *5*, 215-230.
26. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 133-163.
27. Allison, D.; Willems, H.; Jayatilake, J.; Bruno, V.; Peters, B.; Shirtliff, M. *Microbiol. Spectrum* **2016**, *4*(3), 11-26.

28. Lescher, G.Y.; Froelich, E.D.; Gruet, M.D.; Bailey, J.H.; Brundage, R.P. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *5*, 1063-1068.
29. a) Slee, A.M.; Wuonola, M.A.; McRipley, R.J.; Zajac, I.; Zawada, M.J.; Bartholomew, P.T.; Gregory, W.A.; Forbes, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 1791-1797; b) Norrby, R. *Exp. Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 1-10.
30. a) Blondeau, J.M.; DeCarolis, E.; Metzler, K.L.; Hansen, G.T. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11*, 189-215; b) Zhanel, G.G.; Walters, M.; Noreddin, A.; Vercaigne, L.M.; Wierzbowski, A.; Embil, J.M.; Gin, A.S.; Douthwaite, S.; Hoban, D.J. *Drugs* **2002**, *62*, 1771-1804; c) Zhong, P.; Shortridge, V. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2001**, *1*, 125-131.
31. Granier, F. *La presse médicale*, **2000**, *29*, 2051.
32. Granier, F. *Antibiotiques* **2003**, *5*, 39-48.
33. Vandeputte, P. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida Glabrata* - 168p. Thèse de Biologie des organismes, Angers : **2008** ; 930.
34. Yu, S.; Chai, X.; Hu, H.; Yan, Y.; Guan, Z.; Zou, Y.; Sun, Q.; Wu, Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4435-4445.
35. Delaunay, P.; Fissore, C. *J. Med. Mycology*, **2006**, *16*, 152-158.
36. Lortholary, O.; Tod, M.; Dupont, B. *Maladies infectieuses*, **1999**, 1-21.
37. Gubbins, P.O. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **2011**, *7*(11), 1411-1429.
38. Bretagne, S. *Antibiotiques*, **2005**, *7*, 5-15.
39. Hochart, S. ; Barrier, F. ; Durand-Joly, I. ; Horrent, S. ; Decaudin, B. ; Odou, P. *Le Pharmacien Hospitalier*, **2008**, *43*, 103-109.
40. Herbrecht, R. ; Nivoix, Y. ; Fohrer, C. ; Natarajan-Amé, S. ; Letscher-Bru, V. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, i39-i48.
41. Joly-Guillou, M.L. *Revue Francophone des Laboratoires*, **2012**, *441*, 34-72.
42. Sato, K.; Nakae, T. *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**, *28*, 35-45.
43. Damier-Piolle, L. ; Magnet, S. ; Brémont, S. ; Adel, J.K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 557-62.
44. Seward, R.J.; Lambert, T.; Towner, K.J. *J. Med. Microbiol.* **1998**, *47*, 455-462.
45. Adams, M.D.; Nickel, G.C.; Bajaksouzian, S.; Lavender, H.; Murthy, A.R.; Jacobs, M.R.; Bonomo, R.A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3628-3634.
46. Mycobiome = ensemble des génomes des microorganismes colonisant les écosystèmes de l'homme.
47. Chen, Y.; Chen, Z. ; Guo, R.; Chen, N.; Lu, H.; Huang, S.; Wang, J.; Li, L. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* **2011**, *70*, 492-498.
48. Harrison, M.J.; Twomey, K.B.; McCarthy, Y.; O'Connell, O.J.; Alston, M.; Febrer, M.; Murphy, D.M.; Ryan, R.P.; Plant, B.J. *Ir. J. Med. Sci.* **2012**, *181*, S369-437.
49. a) Kuehbach, T. ; Ott, S.J. ; Helwig, U. ; Mimura, T.; Rizzello, F.; Kleessen, B.; Gionchetti, P.; Blaut, M.; Campieri, M.; Fölsch, U.R.; Kamm, M.A.; Schreiber, S. *Gut* **2006**, *55*, 833-841; b) Ott, S.J.; Kuhbacher, T.; Musfeldt, M.; Rosenstiel, P.; Hellmig, S.; Rehman, A.; Drews, O.; Weichert, W.; Timmis, K.N.; Schreiber, S. *Scand. J. Gastroenterol.* **2008**, *43*, 831-841.¹
50. Noverr MC, Falkowski NR, McDonald RA, et al. Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase : role of host genetics, antigen, and interleukin-13. *Infect Immun* **2005** ;73:30-8.
51. Darling, W.M. *Lancet*, **1976**, *2*, 740.
52. Kerr, J. *J. Infect.* **1994**, *28*, 305-310.
53. Van der Velden, W.J.; Netea, M.G.; de Haan, A.F.; Huls, G.A.; Donnelly, J.P.; Blijlevens, N.M. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2013**, *19*, 329-332.
54. Chu, W. S., Magee, B. B.; Magee, P. T. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 6637-6651.
55. Graser, Y.; Volovsek, M.; Arrington, J.; Schonian, G.; Presber, W.; Mitchell, T. G.; Vilgalys, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 12473-12477.
56. Gow, N.A.; Hube, B. *Cur. Opin. Microbiol.* **2012**, *15*, 406-412.
57. a) Eggimann, P.; Garbino, J.; Pittet, D. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 685-702; b) Richards, M.J.; Edwards, J.R.; Culver, D.H.; Gaynes, R.P. *Crit. Care Med.* **1999**, *27*, 887-892; c) Vincent, J.L.; Rello, J.; Marshall, J.;

- Silva, E.; Anzueto, A.; Martin, C.D.; Moreno, R.; Lipman, J.; Gomersall, C.; Sakr, Y.; Reinhart, K. *JAMA* **2009**, *302*, 2323-2329 ; d) Leroy, O.; Gangneux, J.P.; Montravers, P.; Mira, J.P.; Gouin, F.; Sollet, J.P. *et al Crit. Care Med.* **2009**, *37*, 1612-1618; e) Holley, A.; Dulhunty, J.; Blot, S.; Lipman, J.; Lobo, S.; Dancer, C.; Rello, J.; Dimopoulos, G. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 554-557; f) Tortorano, A.M.; Caspani, L.; Rigoni, A.L. *J. Hosp. Infect.* **2004**, *57*, 8-13.
58. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 133-163.
59. Nolte, F.S.; Parkinson, T.; Falconer, D.J.; Dix, S.; Williams, J.; Gilmore, C.; Geller, R.; Wingard, J.R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 196-199.
60. a) Harriott, M.M.; Noverr, M.C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*(9), 3914-3922 ; b) Schlecht, L.M.; Peters, B.M.; Krom, B.P.; Freiberg, J.A.; Hänsch, G.M.; Filler, S.G.; Jabra-Rizk, M.-A.; Shirliff, M.E. *Microbiology*. **2015**, *161*, 168-181 ; c) Lin, Y.J.; Alsad, L.; Vogel, F.; Koppa, S.; Nevarez, L.; Auguste, F.; Seymour, J.; Syed, A.; Christoph, K.; Loomis, J.S. *BIOS* **2013**, *84*(1), 30-39.
61. a) Klaerner, H.G.; Uknis, M.E.; Acton, R.D.; Dahlberg, P.S.; Carlone-Jambor, C.; Dunn, D.L. *J. Surg. Res.* **1997**, *70*(2), 161-165; b) Diebel, L.N.; Liberati, D.M.; Diglio, C.A.; Dulchavsky, S.A.; Brown, W.J. *J. Trauma*. **1999**, *47*(6), 1045-1050; c) Sawyer, R.G.; Adams, R.B.; May, A.K.; Rosenlof, L.K.; Pruett, T.L. *J. Med. Vet. Mycol.* **1995**, *33*(1), 49-52; d) Liu, P.; Wu, X.; Liao, C.; Liu, X.; Du, J.; Shi, H.; Wang, X.; Bai, X.; Peng, P.; Yu, L.; Wang, F.; Zhao, Y.; Liu, M. *PLoS ONE* **2014**, *9*(2): e90042 ; e) Hermann, C.; Hermann, J.; Munzel, U.; Ruchel, R. *Mycoses*, **1999**, *42*, 619-627.
62. Richards, A.M.; Abu, K.Y.; Lamont, R.J. *Mol. Oral Microbiol.*, **2015**, *30*, 2-15.
63. Neely, A.N.; Law, E.J.; Holder, I.A. *Infect Immun.*, **1986**, *52*, 200-204.
64. a) Kerr, J.R. *J. Clin. Microbiol.*, **1994**, *32*, 525-527 ; b) Kerr, J.R.; Taylor, G.W.; Rutman, A.; Hoiby, N.; Cole, P.J.; Wilson, R. *J. Clin. Pathol.* **1999**, *52*, 385-387; c) Kaleli, I.; Cevahir, N.; Demir, M.; Yildirim, U.; Sahin, R. *Mycoses*, **2007**, *50*, 74-78.
65. <http://www.co-add.org/>, consulté le 31/12/2017
66. a) Homerin, G.; Baudalet, D.; Dufrénoy, P.; Rigo, B.; Ghinet, A. *Tet. Lett.* **2016**, *57*(10), 1165-1170 ; b) Bourry, A.; Akué-Gédu, R.; Rigo, B.; Hénichart, J.-P.; Sanz, G.; Couturier, D. *J. Het. Chem.* **2003**, *40*(6), 989-993; c) Baudalet, D.; Daïch, A.; Rigo, B.; Lipka, E.; Gautret, P.; Homerin, G.; Claverie, C.; Rousseau, J.; Abuhaie, C.-M.; Ghinet, A. *Synthesis*, **2016**, *48*(14), 2226-2244.
67. a) Cao, G.-r.; Wang, S.; Wu, Y.-t.; Teng, D.-w. *Huaxue Shiji*, **2016**, *38*(5), 475-480; b) Rigo, B.; Gouni, I.; El Ghamarti, S.; Gautret, P.; Couturier, D. *Synthetic Commun.*, **1994**, *24*(21), 3055-3063 ; c) Edmondson, S.D.; Zhu, C.; Kar, N.F.; Di Salvo, J.; Nagabukuro, H.; Sacre-Salem, B.; Dingley, K.; Berger, R.; Goble, S.D.; Morriello, G.; Harper, B.; Moyes, C.R.; Shen, D.-M.; Wang, L.; Ball, R.; Fitzmaurice, A.; Frenkl, T.; Gichuru, L.N.; Ha, S.; Hurley, A.L.; Jochowitz, N.; Levorse, D.; Mistry, S.; Miller, R.R.; Ormes, J.; Salituro, G.M.; Sanfiz, A.; Stevenson, A.S.; Villa, K.; Zamlyny, B.; Green, S.; Struthers, M.; Weber, A.E. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 609-623.
68. a) Fasseur, D.; Rigo, B.; Leduc, C.; Cauliez, P.; Couturier, D. *J. Het. Chem.* **1992**, *29*, 1285-1291 ; b) Pichlmair, S.; Mereiter, K.; Jordis, U. *Tet. Lett.*, **2004**, *45*(7), 1481-1483 ; c) Millet, R.; Meulon, E.; Goossens, L.; Houssin, R.; Hénichart, J.-P.; Rigo, B. *J. Het. Chem.*, **2000**, *37*(6), 1491-1494; d) Boisse, T.; Gavara, L.; Hénichart, J.-P.; Rigo, B.; Gautret, P. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2455-2466.
69. Ghinet, A.; Oudir, S.; Henichart, J.-P.; Rigo, B.; Pommery, N.; Gautret, P. *Tetrahedron* **2010**, *66*(1), 215-221.
70. Michel, A.D.; Walter, D.S. PCT Int. Appl., 2009074518, 18 Jun **2009** ; Kasai, S.; McGee, K.F.Jr. PCT Int. Appl., 2010119992, 21 Oct **2010**.
71. Chambers, L.J.; Gleave, R.; Senger, S.; Walter, D.S. PCT Int. Appl., 2008003697, 10 Jan **2008**.
72. a) Kono, M.; Harada, S.; Nemoto, T. *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*(31), 7428-7432 ; b) Dubowchik, G.M.; Provencal, D.P. PCT Int. Appl., 2001042245, 14 Jun **2001**; c) Li, J.; Stocks, M.; Dou, D.; Wan, J.; Feng, J.; Pan, F.; Song, H.; Hu, X.; Yi, L. PCT Int. Appl., 2014127745, 28 Aug **2014**; d) Dikshit, D.K.; Kumar, K.S.A.; Dikshit, M.; Barthwal, M.K.; Misra, A.; Jain, M. PCT Int. Appl., 2015044951, 02 Apr **2015**; e) Moutevelis-Minakakis, P.; Gianni, M.; Stougiannou, H.; Zoumpoulakis, P.; Zoga, A.; Vlahakos, A. D.; Iliodromitis, E.; Mavromoustakos, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*(10), 1737-1740.
73. a) Itoh, T.; Miyazaki, M.; Ikeda, S.; Nagata, K.; Yokoya, M.; Matsuya, Y.; Enomoto, Y.; Ohsawa, A. *Tetrahedron*, **2003**, *59*(19), 3527-3536; b) Skof, M.; Svete, J.; Kmetec, M.; Golic-Grdadolnik, S.; Stanovnik,

- B. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 7, 1581-1584; c) Drauz, K.; Kleemann, A.; Martens, J.; Scherberich, P.; Effenberger, F. *J. Org. Chem.* **1986**, 51(18), 3494-3498.
74. Panday, S.K.; Prasad, J.; Pathak, M.B. *Synthetic Commun.* **2011**, 41(24), 3654-3661.
75. a) Perry, M.A.; Trinidad, J.V.; Rychnovsky, S.D. *Org. Lett.* **2013**, 15(3), 472-475; b) Rigo, B.; Lespagnol, C.; Pauly, M. *J. Het. Chem.* **1988**, 25(1), 49-57.
76. a) Li, H.; Fang, X.; Jackstell, R.; Neumann, H.; Beller, M. *Chem. Commun.* **2016**, 52(44), 7142-7145; b) Li, H.; Dong, K.; Neumann, H.; Beller, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(35), 10239-10243.
77. a) Paul, S.; Schweizer, W.B.; Rugg, G.; Senn, H.M.; Gilmour, R. *Tetrahedron*, **2013**, 69(27-28), 5647-5659; b) Barrett, S.D.; Colombo, J.M.; Germain, B.D.; Kornilov, A.; Kramer, J.B.; Uzieblo, A.; Endrès, G.W.; Ciske, F.L.; Owen, T.A.; O'malley, J.P. *PCT Int. Appl.*, 2015009991, 22 Jan **2015**.
78. Marini, I. *Lenzinger Berichte*, **1977**, 42, 12-14.
79. a) Anil Kumar, K. S.; Misra, A.; Siddiqi, T.I.; Srivastava, S.; Jain, M.; Bhatta, R.S.; Barthwal, M.; Dikshit, M.; Dikshit, D.K. *Eur. J. of Med. Chem.*, **2014**, 81, 456-472; b) Basarab, G.S. et al. U.S. Pat. Appl. Publ., 20140206677, 24 Jul 2014; c) Sibi, M.P. et al U.S., 5623087, 22 Apr 1997; d) Simon, M.D.; Feldman, M.E.; Rauh, D.; Maris, A.E.; Wemmer, D.E.; Shokatet, K.M. *ACS Chem. Biol.*, **2006**, 1(12), 755-760; e) Rein, K.; Goicoechea-Pappas, M.; Anklekar, T.V.; Hart, G.C.; Smith, G.A.; Gawleyet, R.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111(6), 2211-2217.
80. Saito, S.; Noyori, R.; Naka, H.; Yamazaki, Y.; Takada, Y. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2013199456, 03 Oct **2013**.
81. Tirotta, I.; Fifer, N.L.; Eakins, I.; Hutton, C.A. *Tet. Lett.* **2013**, 54(7), 618-620.
82. Kawanami, H. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2003096058, 03 Apr **2003**.
83. a) Kambe, T.; Maruyama, T.; Nagase, T.; Ogawa, S.; Minamoto, S.; Sakata, K.; Maruyama, T.; Nakai, H.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20(2), 702-713; b) Paz, J.; Pérez-Balado, C.; Iglesias, B; Muñoz, L. *J. Org. Chem.*, **2010**, 75(9), 3037-3046.
84. Stahl, A.; Steckhan, E.; Nieger, M. *Tet. Lett.* **1994**, 35(40), 7371-4.
85. Dunn, A. D.; Kinnear, K. I. *J. Het. Chem.* **1986**, 23(1), 53-57.
86. Boisse, T.; Gavara, L.; Hénichart, J.-P.; Rigo, B.; Gautret, P. *Tetrahedron* **2009**, 65, 2455-2466.
87. Cao, G.; Wang, S.; Wu, Y.-T.; Teng, D.-W. *Huaxue Shiji*, **2016**, 38(5), 475-480.
88. Rigo, B.; Gouni, I.; El Ghammarti, S.; Gautret, P.; Couturier, D. *Synthetic Commun.* **1994**, 24(21), 3055-63.