



HAL
open science

Développement de Plateformes Calixaréniques à Propriétés Antibactériennes

Maxime Mourer

► **To cite this version:**

Maxime Mourer. Développement de Plateformes Calixaréniques à Propriétés Antibactériennes. Chimie organique. Université de Lorraine (Nancy), 2019. tel-02431934

HAL Id: tel-02431934

<https://theses.hal.science/tel-02431934>

Submitted on 10 Jan 2020

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.

Ecole Doctorale C2MP : Chimie Mécanique Matériaux Physique

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme

d'Habilitation à Diriger des Recherches

Spécialité : Chimie

Développement de Plateformes Calixaréniques à Propriétés Antibactériennes

par

Maxime MOURER

Soutenance le 29 novembre 2019

Composition du jury

Rapporteurs : **Mir Wais Hosseini**

Professeur – CMC, Université de Strasbourg

Isabelle Bonnamour

MCU – ICBMS, Université de Lyon

Jean-Claude Chambron

Directeur de Recherches CNRS – Institut de Chimie de Strasbourg

Examineurs : **Stéphane Pellet-Rostaing**

Directeur de Recherches CNRS – ICSM, Université de Montpellier

Raphaël Duval

Professeur – L2CM, Université de Lorraine

Andreea Pasc

Professeur – L2CM, Université de Lorraine

Jean-Bernard Regnouf de Vains – *Parrain Scientifique*

Professeur – L2CM, Université de Lorraine

Ecole Doctorale C2MP : Chimie Mécanique Matériaux Physique

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme

d'Habilitation à Diriger des Recherches

Spécialité : Chimie

par

Maxime MOURER

Soutenance le 29 novembre 2019

Composition du jury

Rapporteurs : **Mir Wais Hosseini**

Professeur – CMC, Université de Strasbourg

Isabelle Bonnamour

MCU – ICBMS, Université de Lyon

Jean-Claude Chambron

Directeur de Recherches CNRS – Institut de Chimie de Strasbourg

Examineurs : **Stéphane Pellet-Rostaing**

Directeur de Recherches CNRS – ICSM, Université de Montpellier

Raphaël Duval

Professeur – L2CM, Université de Lorraine

Andreea Pasc

Professeur – L2CM, Université de Lorraine

Jean-Bernard Regnouf de Vains – *Parrain Scientifique*

Professeur – L2CM, Université de Lorraine

« La science est vaste, la vie humaine est bien courte. »

Honoré de Balzac ; La peau de chagrin (1831)

A mon Père

« Le jeu est la forme la plus élevée de la recherche »

Albert Einstein

A Noa

A Théo

A Joannie

Remerciements

Ce manuscrit est le fruit de quelques années de travail et comme dans toute recherche il est issu d'un travail d'équipe. Ainsi à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, sur le long terme ou ponctuellement, j'adresse mes sincères remerciements.

Un merci particulier à Jean-Bernard Renouf de Vains, garant de cette habilitation et présent tout au long de ces quelques années de carrière. Merci de m'avoir introduit parmi les « calixarénistes » sur cette thématique de travail riche et essentielle qu'est la recherche de nouveaux antibactériens. Merci pour ta disponibilité, ta motivation et ton enthousiasme quotidien. Nous aurons encore sans doute quelques années à travailler ensemble, je les souhaite riches et fructueuses.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait le Pr. Wais Hosseini et les Dr. Isabelle Bonnamour et Jean-Claude Chambron en acceptant de juger et de rapporter ce travail et en participant au jury de cette Habilitation.

J'adresse également un remerciement sincère aux autres membres de mon jury, le Dr. Stéphane Pellet-Rostaing, le Pr. Raphaël Duval et le Pr. Andreea Pasc. Merci à toi Raphaël, présent pratiquement depuis mes premiers pas dans ce domaine de recherche et avec qui nous avons lancé les premiers tests microbiologiques de ces nouvelles structures avec des méthodes « à l'ancienne ».

Merci à tous les étudiants que j'ai pu encadrer durant ces années, merci pour leurs contributions dans l'avancement de ces recherches.

Merci à ma famille et à ma belle-famille, merci d'être là tout simplement. Merci à ceux qui sont partis trop tôt...

« *Aime et ménage ton frère, car celui qui n'a pas de frère est de même qu'un soldat qui va sans arme à une bataille.* » (Jean-Étienne-Judith Forestier ; Les leçons d'orthographe corrigées), merci à mon frère Romain, mon double, présent à chaque instant si besoin, pour les hauts et pour les bas.

Un merci particulier à Joannie, ma femme, présente chaque jour depuis de nombreuses années. Tu as toi-même mis une petite pierre à cet édifice et depuis ce jour nous ne nous sommes plus quittés. Simplement merci d'être là quotidiennement, merci pour tes encouragements à ne pas baisser les bras. Merci de m'avoir donné nos deux ptits loulous. Leurs évolutions, leurs rires, leurs larmes, leurs joies et leurs peines sont une richesse quotidienne.

A mon père, qui comme beaucoup, n'a sans doute jamais trop compris ce que je pouvais bien faire, mais qui, je n'en doute pas, en a toujours été fier.

Sommaire

Présentation Générale du Mémoire d'Habilitation.....	1
Curriculum Vitae détaillé.....	3
I. Curriculum Vitae.....	3
II. Fonctions Universitaires.....	4
III. Formation.....	5
III.1. Formations sanctionnées par un Diplômes Universitaires.....	5
III.2. Expériences Professionnelles Complémentaires.....	6
III.3. Distinctions.....	6
Liste des Travaux.....	6
I. Synoptique des travaux.....	6
II. Publications Internationales.....	7
III. Communications Internationales.....	9
IV. Communication Nationales.....	11
V. Propriété Intellectuelle.....	13
VI.1. Enveloppes Soleau.....	13
VI.2. Brevet.....	14
VI. Participation à appels projets.....	14
Activités Universitaires.....	17
I. Activités d'enseignement.....	17
I.1. Avant-Propos.....	17
I.2. Responsabilités Pédagogiques.....	19
I.2.1. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.....	19
I.2.2. Autres composantes de l'Université de Lorraine.....	19
I.3. Service d'Enseignement.....	19
I.3.1. Première Année Communes aux Etudes de Santé (PACES).....	19
I.3.2. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.....	20
I.3.3. Autre composante de l'université de Lorraine.....	21
I.3.4. Autres activités pédagogiques.....	21

I.4. Responsabilités Administratives / Collectives	21
I.4.1. Conseil de Faculté.....	21
I.4.2. Commission Recherche	21
I.4.3. Conseil de Laboratoire.....	22
I.4.4. Responsabilité administratives.....	22
II. Encadrement d'étudiants	22
II.1. Erasmus	22
II.2. Stage d'Initiation Recherche (SIR)	22
II.3. IUT (Stage de 2 ^{ème} année de chimie de St Avold, Université Paul Verlaine – Metz)	23
II.4. Master 1.....	23
II.5. Master 2.....	23
II.6. Thèse de Docteur d'Université	24
II.7. Thèse d'Exercice	24
III. Participation à des Jurys	25
III.1. Thèse d'Université	25
III.2. Stage Initiation Recherche.....	25
III.3. Stage Recherche	26
III.4. Comité de sélection	26
Activités de recherche	27
I. Avant-propos	27
II. Travaux de DEA.....	29
III. Travaux de Post-doctorat	31
IV. Préambule aux travaux de Doctorat et de MCU	33
IV.1. Positionnement de mes travaux de recherche	33
IV.2. Contexte et problématique de recherche.....	34
IV.3. Stratégie de Travail.....	36
V. Travaux de Doctorat & ATER.....	37
V.1. Thématique antivirale	37
V.2. Thématique antibactérienne.....	40
V.2.1. Synthèse du Cx1	40
V.2.2. Résultats préliminaires (Cx1).....	42

V.2.3. Précision du spectre d'action du Cx1	43
V.2.4. Vers la détermination du mode d'action supposé du Cx1	45
V.2.4.1. Microélectrophorèse.....	45
V.2.4.2. Microscopie à Force Atomique	46
V.2.4.3. Effets sur modèles de membranes et étude par simulation de dynamique moléculaire....	48
V.2.5. Famille dérivé du Cx1	50
V.2.5.1. Synthèse des dérivés bis-hétérocycliques.....	50
V.2.5.2. Résultats	52
V.2.6. Développement des études d'activité : sur le bacille de la tuberculose.....	53
V.2.6.1. Contexte	53
V.2.6.2. Résultats	54
V.2.7. Développement d'une famille de dérivés linéaires.....	56
V.2.7.1. Contexte	56
V.2.7.2. Résultats	58
VI. Travaux effectués depuis mon recrutement.....	60
IV.1. Famille des partiellement substitués	60
VI.2. Famille des étoilés	62
VI.2.1. Synthèse	63
VI.2.2. Résultats	63
VI.3. Transposition d'activité sur supports.....	65
VI.3.1. Résine pyridinium modèle.....	67
VI.3.2. Mise au point de résines fonctionnalisées par nos calixarènes actifs	69
VI.4. Etude conformationnelle.....	73
VI.4.1. Synthèse (Fig. VI.19)	74
VI.4.2. Résultats	75
VI.5. Développement de conformères du Cx1	78
VI.5.1. Synthèse	78
VI.5.2. Résultats	79
VI.6. Famille <i>para</i> -guanidinium	80
VI.6.1. Synthèse	81
VI.6.2. Résultats	82
Projet de Recherche	85
I. Axe I : Activité Antibactérienne	85

I.1. Calixarènes phosphoniums :.....	87
I.2. Calixarènes prodrogues	88
II. Axe II : Outils pour l'imagerie	91
III. Conclusion Projet de Recherche.....	97
Publications significatives.....	99

Présentation Générale du Mémoire d'Habilitation

Introduction générale au mémoire de candidature à l'HDR

Ce document résume une sélection des principaux travaux sur lesquels ma recherche a porté durant ces 15 dernières années. J'en propose ainsi un balayage rapide afin de mettre en lumière leurs points communs et la ligne directrice conduisant à mes projets de recherches à venir.

Depuis mon entrée à l'université j'ai eu l'envie de me diriger vers « le vivant ». Non pas au travers d'études dans le domaine de la biologie, mais en passant par la chimie, et plus précisément la Chimie Organique. Elle ouvre des possibilités infinies à l'homme de l'art qui saura combiner toutes les briques et les outils à sa disposition pour créer de nouvelles entités moléculaires. Si à l'heure actuelle des millions de composés sont déjà référencés et ce pour des applications dans des domaines extrêmement variés, il en est un qui, une fois de plus est associé au vivant : le domaine thérapeutique. C'est donc vers lui que je me suis tout naturellement dirigé.

Ce domaine, bien qu'étant une fraction de la chimie organique reste à lui seul extrêmement vaste. Mes différentes expériences m'ont tout de même permis de m'orienter vers un axe plus précis qu'est la recherche de nouveaux composés anti-infectieux.

Ce « mémoire » est proposé dans le cadre de l'obtention de l'habilitation à diriger les recherches. Il se focalise essentiellement sur la recherche que j'ai pu mener jusqu'à aujourd'hui et elle représentera donc l'essentiel de ce document. Cependant, en tant qu'enseignant chercheur il semble difficile de dissocier totalement les activités de recherche des activités d'enseignement qui, par moment, semblent bien plus gourmande en temps, mais qui restent néanmoins essentielles.

La pédagogie utilisée quotidiennement auprès de nos étudiants me semble être un atout dans les compétences recherchées à travers une évaluation à l'habilitation à diriger les recherches. Il s'avère donc nécessaire de faire une petite présentation de mes activités pédagogiques.

Comme je l'ai dit précédemment, une dissociation franche des activités de recherche et d'enseignement semble difficile, d'autant lorsque l'on a l'opportunité d'exercer sa pédagogie au sein

d'un établissement appartenant à un pôle santé et plus précisément à la Faculté de Pharmacie. Si celle-ci a pour but de former des Pharmaciens destinés à occuper des postes dans des domaines très variés, ces mêmes Pharmaciens n'en restent pas moins connus comme étant les spécialistes du médicament. Que ce soit à l'officine, à l'hôpital ou dans l'industrie pharmaceutique son cœur de métier reste « la molécule » et plus précisément le principe actif. Il existe donc un lien très fort entre ma pédagogie et mes travaux de recherche axés principalement vers la recherche et le développement de nouveaux composés actifs.

Ce document sera divisé en deux sections :

La première, plus petite, est dédiée à une présentation de mon cursus concernant les quelques années post-lycéennes nous conduisant à aujourd'hui. Ce sera une présentation succincte de ces différentes étapes qui m'ont conduit à ce poste d'enseignant-chercheur avec les différents choix que j'ai pu effectuer, les différents enseignements auquel j'ai choisi de participer et l'investissement pédagogique qui en découle.

La seconde section de ce mémoire sera dévolue à la présentation de mon parcours en recherche académique. Tout en faisant la synthèse je tenterai d'en tirer les éléments essentiels permettant de laisser apparaître naturellement le fil conducteur. Et je finirai par présenter mon projet de recherches pour les années à venir.

n.b : Pour une question de facilité de lecture, je choisirai volontairement de faire apparaître un résumé de mes travaux de post-doctorat avant mes travaux de thèse. Ces derniers étant à la base de mes travaux en tant qu'enseignant-chercheur il me semblait difficile d'en couper le lien par la présentation d'une thématique de recherche différente.

Curriculum Vitae détaillé

I. Curriculum Vitae

Etat Civil

Mourer Maxime
Né le 07 Août 1977 à Nancy (54)

Nationalité : Française
Situation familiale : Marié, 2 enfants

Fonction

Maître de Conférences, 86^{ème} section CNU

- Equipe **Molécules et Système Bioactifs** (MolSyBio) animée par le Pr. Andreea Pasc au sein du Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM), UMR 7053 dirigée par le Dr. Philippe Gros.

Adresses professionnelles :

✚ L2CM UMR 7053 Université de Lorraine – CNRS
Faculté des Sciences et Technologies
Campus Aiguillettes, entrée 4A, 5^{ème} étage – BP 70239
F 54506 Vandœuvre les Nancy
☎ 03 72 74 52 63
💻 maxime.mourer@univ-lorraine.fr



✚ Travaux Pratiques de Chimie Organique
Faculté de Pharmacie
7, Avenue de la Forêt de Haye – BP 90170
F 54505 Vandœuvre-lès-Nancy
☎ 03 72 74 73 03



✚ Licence Master Santé
Faculté de Médecine
9, Avenue de la Forêt de Haye – BP 20199
F 54505 Vandœuvre-lès-Nancy
☎ 03 72 74 62 59



II. Fonctions Universitaires

- **2009-2019 : Maître de Conférences titulaire**

Nommé au 1^{er} Septembre 2009 à l'Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté de Pharmacie.

Poste N° : 86 MCF 0442 – Pharmacochimie Supramoléculaire, Produits Synthétiques

Equipe pédagogique : Chimie Organique

Laboratoire de recherche : Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes (SRSMC), UMR 7565, Université de Lorraine-CNRS (dirigée par le Pr. Y. Fort jusqu'en 2015, puis par le Dr. P. Gros).

Jusqu'en 2013 au sein de l'équipe : Groupe des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament (GEVSM) dirigée par le Pr. J.-B. Regnouf de Vains.

Jusqu'en 2013 au sein de l'équipe : Molécules Bioactives et Traceurs (MoBAT) animée par le Pr. J.-B. Regnouf de Vains.

Depuis 2018 au sein de l'équipe Molécules et Système Bioactifs (MolSyBio) animée par le Pr. Andreea Pasc.

Egalement depuis 2018 au sein du Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM), UMR 7053 dirigée par le Dr. Philippe Gros, issue de la division de l'ancienne UMR 7565.

- **2008-2009 : Maître de Conférences Stagiaire**

Nommé au 1^{er} Octobre 2008 à l'Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté de Pharmacie.

Equipe pédagogique : Chimie Organique

Laboratoire de recherche : Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes (SRSMC), UMR 7565, Université de Lorraine-CNRS au sein de l'équipe : Groupe des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament (GEVSM) dirigée par le Pr. J.-B. Regnouf de Vains.

- **2005-2006 : Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche**

Du 1^{er} Octobre 2005 au 31 Août 2006 (demi-poste) à l'Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté de Pharmacie.

Equipe Pédagogique : Chimie Organique

Laboratoire de recherche : Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes (SRSMC), UMR 7565, Université de Lorraine-CNRS au sein de l'équipe : Groupe des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament (GEVSM), dirigée par le Pr. J.-B. Regnouf de Vains.

III. Formation

III.1. Formations sanctionnées par un Diplôme Universitaires

- **2002-2005** : Doctorat Chimie Organique (allocataire de recherche)

Soutenu de 1^{er} décembre 2006 ; sous la direction du Pr. J.-B. Regnouf de Vains.

Laboratoire : Groupe d'Etudes des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament (GEVSM), UMR 7565 Nancy Université, CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy 1, dirigé par J.-B. Regnouf de Vains

Ecole doctorale : Synthèses, Expériences, Simulations, Applications : de la Molécule aux Edifices Supramoléculaires (SESAME – ED 412)

Spécialité : Chimie Organique

Titre : « Calixarènes hydrosolubles à propriétés antivirales et antibactériennes »

Prix de Thèse 2007 de l'Université Henri Poincaré.

Jury :

Pr. Mir Wais Hosseini (Université Louis Pasteur, Strasbourg)	Président
Dr. Gilles Prévost (Université Louis Pasteur, Strasbourg)	Rapporteur
Dr. Anne-Marie Aubertin (Université Louis Pasteur, Strasbourg)	Examineur
Dr. Raphaël Emmanuel Duval (Université Henry Poincaré, Nancy 1)	Examineur
Dr. Jean-Pierre Joly (Université Henry Poincaré, Nancy 1)	Examineur
Pr. Jean-Bernard Regnouf de Vains (Université Henry Poincaré, Nancy 1)	Examineur

- **2001-2002** : D.E.A de Chimie et Physicochimie Moléculaire
Université Henri Poincaré - Nancy 1.

Stage de Recherche sous la direction des Pr. Philippe Coutrot et Claude Grison

Laboratoire : Chimie Organique Biomoléculaire, UMR 7565 CNRS UHP - Nancy 1, dirigé par le Pr. P. Coutrot

Titre : « Etude de l'ouverture des esters glycidiques α -halogénés par les amines : vers la synthèse de la lincosamine »

- **2000-2001** : Maîtrise de Chimie - Filière Chimie Fine Organique
Université Henri Poincaré - Nancy 1.

Stage de Recherche sous la direction du Dr. Diego Munoz-Torrero

Laboratoire : Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, Université de Barcelone (Espagne) dirigé par le Pr. Pelayo Camps

Titre : « Synthèse de précurseurs pour la préparation de nouveaux auxiliaires chiraux dérivés de la pantolactame »

- **1999-2000** : Licence de Chimie-Option Chimie Organique
Université Henri Poincaré - Nancy 1
- **1997-1999** : DEUG Mention Science de la Matière / Mention Assez Bien
Université Henri Poincaré - Nancy 1.
- **1997** : Baccalauréat Scientifique
Lycée Louis Majorelle (Toul - 54).

III.2. Expériences Professionnelles Complémentaires

- **2008** : Stagiaire post-doctoral (C.D.D. 5 mois) sous la responsabilité scientifique du Pr. Eric Monflier

Laboratoire : Laboratoire de Physico-Chimie des Interfaces et Applications (LPCIA) (Unité de Catalyse et de chimie du Solide (UCCS) depuis 2008) FRE CNRS 2485 – FR CNRS 2638

Université d'Artois – Faculté des Sciences Jean Perrin, dirigé par le Pr. E. Monflier

Titre : « Nanoréacteurs hydrosolubles à base de cyclodextrines pour la catalyse dans l'eau »

- **2006-2008** : contrat de recherche (confidentiel – C.D.D. 8 mois) pour la société TOX n'BIO sous la responsabilité scientifique du Pr. Jean-Bernard Regnouf de Vains

Laboratoire : Groupe d'Etudes des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament (GEVSM), UMR 7565 Nancy Université, CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy 1, dirigé par le Pr. J.-B. Regnouf de Vains

Titre : « Mise au point technique de la préparation de billes greffées par des calixarènes à but extractif »

III.3. Distinctions

- Prix de Thèse 2006 de l'Université Henri Poincaré.

« Calixarènes hydrosolubles à propriétés antivirales et antibactériennes »

- Prix meilleur poster : SFC Eurochem Nancy 2005, 28 août – 1^{er} septembre 2005

« A positively charged calixarene derivative displaying antibacterial activities ».

Liste des Travaux

I. Synoptique des travaux

	<i>1^{er} auteur</i>	<i>2^{ème} auteur</i>	<i>Dernier auteur</i>	<i>autre</i>	<i>total</i>
<i>Publications Internationales</i>	10	5	-	11	26
<i>Communications Internationales</i>	3	7	-	9	19
<i>Communications Nationales</i>	7	11	-	5	23

	<i>Facteur d'Impact</i>	<i>1 < FI < 2</i>	<i>2 < FI < 4</i>	<i>FI > 4</i>	<i>Total</i>
<i>Publications Internationales</i>		6	18	2	26

II. Publications Internationales

(FI = Facteur d'Impact 2018)

- P1** M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 1895-1899 (FI = 2,125) « New water soluble calix[4]arene-based bipyridyl podands incorporating carboxylate groups »
- P2** M. Mourer, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, 16, 2960-2963 (FI = 2,442), « Functional Organisation and Gain of Activity: The Case of the Antibacterial tetra-*para*-Guanidinoethyl-Calix[4]arene »
- P3** M. Grare, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R. E. Duval, *Pathologie Biologie*, **2006**, 54, 470-476 (FI = 1,787) « Vers de nouvelles molécules antibactériennes : intérêt du para-guanidinoéthylcalix[4]arène »
- P4** M. Grare, M. Mourer, S. Fontanay, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R. E. Duval, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2007**, 60, 575-581 (FI = 5,217), « *In Vitro* activity of para-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria »
- P5** M. Grare, E. Dague, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, J. F. L. Duval, R. E. Duval, F. Gaboriaud, *Pathologie Biologie*, **2007**, 55, 465-477 (FI = 1,787), « Microélectrophorèse et microscopie à force atomique : deux nouveaux outils d'évaluation de l'effet pariétal d'antibactériens »
- P6** M. Mourer, F. Happiot, E. Monflier, S. Menuel, *Tetrahedron*, **2008**, 64, 7159-7163 (FI = 2,377), « Click chemistry as an efficient tool to access β -cyclodextrin dimmers »
- P7** M. Mourer, F. Happiot, S. Tilloy, E. Monflier, S. Menuel, *European Journal of Organic Chemistry*, **2008**, 34, 5723-5730 (FI = 2,882), « Easily accessible mono and polytopic β -cyclodextrin hosts by click chemistry »
- P8** H. Massimba Dibama, I. Clarot, S. Fontanay, A. Ben Salem, M. Mourer, C. Finance, R.E. Duval, J.B. Regnouf de Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19, 2679-2682 (FI = 2,442), « Towards calixarene-based prodrugs: Drug release and antibacterial behaviour of a water-soluble nalidixic acid / calix[4]arene ester adduct »
- P9** M. Mourer, H. Massimba Dibama, S. Fontanay, M. Grare, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 5496-5509 (FI = 2,881), « *p*-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation »
- P10** M. Grare, S. Fontanay, H. Massimba Dibama, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.-E. Duval, *Pathologie Biologie*, **2009**, 58, 46-51 (FI = 1,787), « Cinétique d'action du para-guanidinoéthylcalix[4]arène, et évolution de la perméabilité membranaire »

- P11** M. Mourer, N. Psychogios, G. Laumond, A.-M. Aubertin, J.-B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2010**, *18*, 36-45 (FI = 2,881), « Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands »
- P12** M. Grare, H. Massimba Dibama, S. Lafosse, A. Ribon, M. Mourer, J.B. Regnouf de Vains, C. Finance, R.E. Duval, *Clinical Microbiology and Infection*, **2010**, *16*, 432-438 (FI = 5,394), « Cationic compounds vs. multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound versus two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine »
- P13** C. Geller, S. Fontanay, M. Mourer, H. Massimba Dibama, J.B. Regnouf de Vains, C. Finance, R.E. Duval, *Antiviral Research*, **2010**, *88*, 343-346 (FI = 4,307), « Antiseptic properties of two calix[4]arene derivatives on the human coronavirus 229E »
- P14** M. Mourer, H. Massimba Dibama, P. Constant, M. Daffe, J.B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (6), 2035-2041 (FI = 2,881), « Antimycobacterial activities of some cationic and anionic calix[4]arene derivatives »
- P15** M. Mourer*, J.B. Regnouf de Vains, *Helvetica Chimica Acta*, **2012**, *95* (5), 766-771 (FI = 1,081), « New Efficient Synthetic Pathways to Tetrakis{p-[(diethylphosphono)methyl]}calix[4]arene »
- P16** S. Hamzaoui, A. Ben Salem, A. Ben Hsouna, N. Chaari, M. Trigui, M. Mourer, M. Kossentini, *Mediterranean Journal of Chemistry*, **2012**, *1* (5), 246-258 (FI = 1,452), « Synthesis, characterization and antibacterial activity of bis-amidrazones and bis-triazolones derivatives »
- P17** M. Mourer, S. Fontanay, R.E. Duval, J.B. Regnouf de Vains, *Helvetica Chimica Acta* ; **2012**, *95* (8), 1373-1386 (FI = 1,081), « Synthesis, Characterisation and Biological Evaluation as Antibacterial Agents of Water-Soluble Calix[4]arenes and Phenol Derivatives Incorporating Carboxylate Groups »
- P18** C. Formosa, M. Grare, E. Jauvert, A. Coutable, J.-B. Regnouf-de-Vains, M. Mourer, R. E. Duval, E. Dague, *Scientific Reports*; **2012**, *2*, 575 (FI = 4,122), « Nanoscale analysis of the effects of antibiotics CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain »
- P19** N. Derbel, I. Clarot, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, M. F. Ruiz-Lopez, *The Journal of Physical Chemistry A*, **2012**, *116* (37), 9404-9411 (FI = 2,836), « Intramolecular interaction vs hydration effects on *p*-guanidinoethyl-phenol structure and pK's »
- P20** S. Hamzaoui, K. Hamden, A. Ben Salem, M. Mourer, J.-B. Regnouf-De-Vains, M. Kossentini, *Archiv der Pharmazie*, **2013**, *346* (4), 321-329 (FI = 2,288), « Synthesis and evaluation of 1, ω -bis(1,2,3,5-thiatriazol-5-yl)alkanes as *in vitro* and *in vivo* α -amylase and lipase inhibitors »
- P21** H. Massimba Dibama, M. Mourer, R. E. Duval, J.-B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, *24*, 4791-4793 (FI = 2,442), « Poly-guanidinoethylphenylethers organized around a benzene ring: synthesis and evaluation of their antibacterial and cytotoxic properties »

- P22** F. Lemée, I. Clarot, L. Ronin, L. Aranda, **M. Mourer**, J. -B. Regnouf-de-Vains, *New Journal of Chemistry*, **2015**, 39, 2123-2129 (FI = 3,201), « A Bacteriophilic Resin, Synthesis and *E. coli* Sequestration Study »
- P23** H. Massimba-Dibama, **M. Mourer**, P. Constant, M. Daffe, J. -B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2015**, 23 (17), 5410-5418 (FI = 2,881), « Guanidinium compounds with sub-micromolar activities against *Mycobacterium tuberculosis*. Synthesis, characterization and biological evaluations »
- P24** B. Korchowiec, M. Gorczyca, E. Rogalska, J. -B. Regnouf-de-Vains, **M. Mourer**, J. Korchowiec, *Soft Matter*, **2016**, 12, 181-190 (FI = 3,709), « The selective interactions of cationic *tetra-p*-guanidinoethylcalix[4]arene with lipid membranes: theoretical and experimental model studies »
- P25** F. Lemée, **M. Mourer**, L. Aranda, I. Clarot, J.-B. Regnouf-de-Vains, *New Journal of Chemistry*, **2016**, 40, 8239-8250 (FI = 3,201), « Bacteriophilic *tetra-p*-Guanidinoethyl-Calix[4]arene Derived Polymers. Syntheses and *E. coli* Sequestration Studies. »
- P26** **M. Mourer***, R. E. Duval, P. Constant, M. Daffé, J.-B. Regnouf-de-Vains, *ChemBioChem - A European Journal of Chemical Biology*, **2019**, 20, 911-921 (FI = 2,774), « Impact of tetracationic calix[4]arene conformation - from conic structure to expanded bolaform - on their antibacterial and antimycobacterial activities. »

III. Communications Internationales

(O_I = orale ; P_I = poster)

- P_{I1}** **M. Mourer**, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf de Vains, SFC Eurochem Nancy 2005, Nancy, 28 août – 1^{er} septembre **2005**, « A positively charged calixarene derivative displaying antibacterial activities »
- P_{I2}** R.E. Duval, **M. Mourer**, M. Commeny, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, 25^{ème} réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Palais des Congrès de Paris, 1-2 décembre **2005**, « Developing new anti-infectious strategies: Interest for calixarenes as potent antibacterial drugs »
- P_{I3}** M. Grare, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, R.E. Duval, 8th European Congress of Chemotherapy and Infection (ECC8), Budapest, Hungary, 25-28 October **2006**, « Para-guanidinoethylcalix[4]arene: a new product with promising in vitro antibacterial activity against antibiotic-resistant bacteria. »
- P_{I4}** M. Grare, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, R. E. Duval, 26^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 7-8 décembre **2006**, « Para-guanidinoethylcalix[4]arène : un 1^{er} pas vers une nouvelle molécule antibactérienne ? »

- P₁₅** M. Grare, E. Dague, **M. Mourer**, J. F. L. Duval, F. Jorand, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, F. Gaboriaud, R. E. Duval, 26^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 7-8 décembre **2006**, « Para-guanidinoethylcalix[4]arène : un 1^{er} pas vers la compréhension de sa cible d'action »
- P₁₆** M. Grare, **M. Mourer**, S. Fontanay, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, R. E. Duval, 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, USA, 17-20 Septembre **2007**, « Activity of *para*-guanidinoethyl[4]arene against clinical isolates of MRSA, VRE and ESBL-producing Enterobacteriaceae »
- P₁₇** M. Grare, H. Massimba Dibama, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, R. E. Duval, 27^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 6-7 décembre **2007**, « Le *para*-guanidinoethylcalix[4]arène : activité sur SARM, ERG et sur Entérobactérie productrices de BLSE... Cytotoxycité...Cible d'action ? »
- P₁₈** C. Geller, S. Fontanay, **M. Mourer**, H. Massimba Dibama, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval, 4th European Congress of Virology (ECV), Cernobbio, Como Lake, Italy, 7-11 April **2010**, « Evaluation of the antiseptic virucidal activity of 2 new calix[4]arenes on the Human coronavirus 229E thanks to an original method using Sephadex™ columns »
- P₁₉** M. Grare, **M. Mourer**, H. Massimba Dibama, J.-B. Regnouf-de-Vains, R.E. Duval, 50th annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Boston, MA, USA, 12-15 September **2010**, « Synthesis and antibacterial properties of potent antibacterial drugs emerging from a new promising family of cationic compounds: the (4-(2-guanidinoethyl)phenoxy) alkanes »
- P₁₁₀** C. Geller, S. Fontanay, **M. Mourer**, H. Massimba Dibama, J.-B. Regnouf-de-Vains., C. Finance, R.E. Duval, 14th SarLorLux Workshop on Virus Research, 27 September **2010**, Hamburg, « Evaluation of the antiseptic virucidal activity of 2 new calix[4]arenes on the Human coronavirus 229E thanks to an original method using Sephadex™ columns. »
- P₁₁₁** M. Grare, **M. Mourer**, H., J.-B. Regnouf-de-Vains et R.E. Duval, 52th annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, USA, 9-12 September **2012**, « In Vitro Synergy Studies with a Promising New Compound, the tetra-*para*-guanidinoethylcalix[4]arène »
- O₁₂** F. Lemée, I. Clarot, B.S. Nguyen, P. Lemiere, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf-de-Vains, 5th EuCheMS Chemistry Congress, Istanbul, Turkey, 31 Août - 4 septembre **2014**, « Polycationic resins for anionic drugs capture and release. Case of nalidixic acid and penicillin V »
- P₁₁₃** F. Lemée, **M. Mourer**, L. Ronin, G. Sautrey, J.-B. Regnouf-de-Vains, I. Clarot, 5th EuCheMS Chemistry Congress, Istanbul, 31 Août - 4 septembre **2014**, « Bacteria capture by new cationic resins synthesis, evaluation by capillary electrophoresis »
- P₁₁₄** D. Zheleva-Dimitrova, S. Bouguet-Bonnet, S. Poinsignon, J.-B. Regnouf-de-Vains, **M. Mourer**, R. Gevrenova, M. Henry, 6th Congress of Pharmacy with international

Participation, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Octobre **2016**, « New approach in triterpene saponin purification »

- O₁₅** J.-B. Regnouf-de-Vains, F. Lemée, I. Clarot, **M. Mourer**, European Chemistry Congress, Euro Chemistry, Rome, Italy, 16-18 juin 2016, « From discrete to supported antibacterial calixarenes: Towards bacteriophilic materials. »
- O₁₆** F. Lemée, I. Clarot, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf-de-Vains, Congrès SCF 2018, Montpellier, 30 juin – 4 juillet 2018, « From discrete to supported antibacterial calixarenes: Towards bacteriophilic materials. »
- O₁₇** **M. Mourer**, M. Grare, J.-B. Regnouf-de-Vains, R. E. Duval, 15th International Conference on Calixarenes, Cassis, France, 10-14 juin 2019, « Towards new calixarene-based antibacterials “an unexpected journey” with tetra-para-guanidinoethyl-Calix[4]arene. »
- P₁₈** **M. Mourer**, R.E. Duval, P. Constant, M. Daffé, J.-B. Regnouf-de-Vains, 15th International Conference on Calixarenes, Cassis, France, 10-14 juin 2019, « Impact of tetracationic calix[4]arene conformation - from conic structure to expanded bolaform - on their antibacterial and antimycobacterial activities. »
- P₁₉** F. Deligey, M. Girardon, **M. Mourer**, P. Durand, S. Bonnet, A. Pasc, A. Gansmüller, EUROISMAR 2019, Berlin, Allemagne, 25-30 août 2019, « Solid State NMR study of Curcumin partition inside solid lipid nanoparticle@mesostructured silica matrix. »

IV. Communication Nationales

(O_N = orale ; P_N = poster)

- P_{N1}** N. Psychogios, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, SFC, Grand-Est 2003 Reims ; 15-16 Janvier **2003**, « Nouveaux calixarènes hydrosolubles potentiellement complexants de cations métalliques »
- P_{N2}** N. Psychogios, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, Journée Scientifique de l'Institut Nancéen de la Chimie Moléculaire, Faculté des Sciences – Nancy, 20 Janvier **2003**, « Nouveaux calixarènes hydrosolubles potentiellement complexants de cations métalliques »
- P_{N3}** N. Psychogios, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, Journée Pharma Recherche 2003, Faculté de Pharmacie – Nancy, 12 mai **2003**, « Nouveaux calixarènes hydrosolubles potentiellement complexants de cations métalliques »
- O_{N4}** **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, Journée scientifique 2003 de l'Ecole Doctorale SESAMES, Faculté des Sciences – Nancy, 20 mai **2003**, « Calixarènes complexants hydrosolubles à visée antimicrobienne »
- O_{N5}** **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, Journée Pharma Recherche 2004, Faculté de Pharmacie – Nancy, 09 mars **2004**, « Calixarènes complexants hydrosolubles à visée antimicrobienne »

- P_N6** **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, Journée scientifique de l'Ecole doctorale SESAMES, Université de Metz, 17 septembre **2004**, « A new water-soluble calix[4]arene-based bipyridyl podant »
- P_N7** **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, 150^{ème} anniversaire de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Henri Poincaré – Nancy, Nancy, 22 novembre **2004**, « A new water-soluble calix[4]arene-based bipyridyl podant »
- P_N8** M. Grare, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, R.E. Duval, Eurobiologie 2006, Nancy, 16-17 mars **2006**, « Calixarènes fonctionnels : vers de nouvelles molécules antibactériennes »
- P_N9** M. Grare, **M. Mourer**, J.B. Regnouf de Vains, C. Finance, R.E. Duval, Journées Pharma-Recherche, Nancy, 20 avril **2006**, « Calixarènes fonctionnels : vers de nouvelles molécules antibactériennes »
- O_N10** M. Grare, **M. Mourer**, J.B. Regnouf de Vains, C. Finance, R.E. Duval, Journées Pharma-Recherche, Nancy, 20 avril **2006**, « Etude de polyphénols cycliques présentant des propriétés antibactériennes : les calixarènes. Evaluation du spectre d'activité et des effets sur les parois bactériennes. Détermination de l'index de sélectivité »
- P_N11** **M. Mourer**, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf de Vains, 1^{ère} Journées de l'Institut Jean Barriol, Nancy, 24 Octobre **2006**, « A positively charged calixarene derivative displaying antibacterial activities »
- P_N12** M.Grare, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, R. E. Duval, 1^{ère} Journées de l'Institut Jean Barriol, Nancy, 24 Octobre **2006**, « *Para*-guanidinoethylcalix[4]arene: a new product with promising in vitro antibacterial activity against antibiotic-resistant bacteria »
- P_N13** M. Grare, E. Dague, **M. Mourer**, J.F.L. Duval, F. Jorand, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, F. Gaboriaud, R.E. Duval, 1^{ère} Journées de l'Institut Jean Barriol, Nancy, 24 Octobre **2006**, « *Para*-guanidinoethylcalix[4]arène : un 1^{er} pas vers la compréhension de sa cible d'action »
- P_N14** M. Grare, H. Massimba Dibama, **M. Mourer**, J.B. Regnouf de Vains, C. Finance, R.E. Duval, Journées Pharma-Recherche, Nancy, 20 mars **2008**, « Le *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène : activité sur SARM, ERG et sur Entérobactéries productrices de BLSE... Cytotoxicité... Cible d'action ? »
- P_N15** H. Massimba Dibama, I. Clarot, **M. Mourer**, S. Fontanay, R.E. Duval, J.B. Regnouf de Vains, SFC Grand-Est 5, Nancy, 22-23 mai **2008**, « Vers de nouveaux prodrogues. Exemple d'un podant calixarene-quinolone antibiotique. »
- P_N16** H. Massimba Dibama, I. Clarot, S. Fontanay, R.E. Duval, C. Finance, **M. Mourer**, J.B. Regnouf de Vains, 12^{ème} journée du club français des cyclodextrines, Université Claude

Bernard – Lyon 1, 3-4 décembre 2009, « Toward calixarenes-based prodrugs: the case of the antimicrobial nalidixic acid. »

- O_N17** **M. Mourer**, H. Massimba Dibama, S. Fontanay, M. Grare, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains, 12^{ème} journée du club français des cyclodextrines, Université Claude Bernard - Lyon 1, 3-4 décembre 2009, « Vers un nouvel antibactérien »
- O_N18** H. Massimba Dibama, I. Clarot, S. Fontanay, R.E. Duval, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf-de-Vains, SFC Grand-Est.6, Strasbourg, 20-21 mai 2010, « Hydrophilic labile Quinolone-Calixarene adducts. Looking for an anti-bacterial prodrug »
- P_N19** **M. Mourer**, H. Massimba Dibama, P Constant, M. Daffé, J.-B. Regnouf-de-Vains, 13^{ème} journée du club français des cyclodextrines, Université du Littoral Côte d’Opale – Dunkerque, 9-10 décembre 2010, « Evaluation of anti-mycobacterial activities of some cationic and anionic calix[4]arene derivatives »
- O_N20** J.-B. Regnouf-de-Vains, **M. Mourer**, SFC Grand Est 7, Reims, Université de Reims Champagne Ardenne, 29-30 mars 2012, « Nouvelles plate-formes (macro)cycliques polyanioniques bioactives - calixarènes et dérivés »
- P_N21** F. Lemée, **M. Mourer**, I. Clarot, J.-B. Regnouf-de-Vains, Journée de rentrée de l'ED SESAMES, Metz, 08 novembre 2012, « An attempt to support calixarene derivatives on Merrifield resin »
- P_N22** F. Lemée, **M. Mourer**, I. Clarot, J.-B. Regnouf-de-Vains, DocSciLor, 2^{ème} rencontre de doctorants lorrains en sciences exactes et naturelles, Pont à Mousson, France, 6 juin 2013, « An attempt to support calixarene derivatives on Merrifield resin »
- P_N23** F. Lemée, **M. Mourer**, L. Ronin, G. Sautrey, J.-B. Regnouf-de-Vains, I. Clarot, 10 years IJB, Molecular Sciences: Facing Up to Major Societal Challenges, Nancy, 2-3 octobre 2014, « Bacteria capture by new cationic resins synthesis, evaluation by capillary electrophoresis »

V. Propriété Intellectuelle

VI.1. Enveloppes Soleau

- 1 N° 265982, déposée le 20 juillet 2006
J.-B. Regnouf-de-Vains, **M. Mourer**, R. E. Duval
- 2 N° 357384, déposée le 24 juillet 2009
J.-B. Regnouf de Vains, **M. Mourer**, H. Massimba Dibama;
- 3 N° 357386, déposée le 24 juillet 2009
J.-B. Regnouf de Vains, H. Massimba Dibama, **M. Mourer**
- 4 N° 370028, déposée le 17 décembre 2009
M. Mourer, J.-B. Regnouf de Vains.

VI.2. Brevet

1 Un dépôt de brevet « français » en juillet 2008 (n°08/03940), avec une demande d'extension « internationale » (PCT/FR2009/051388) déposée en juillet 2009, et un dépôt « international » en janvier 2010 (WO/2010/004231).

"Nouveaux composés, leur utilisation comme médicaments, et leur procédé de préparation"

R.E. Duval, M. Grare, **M. Mourer**, J.-B. Regnouf de Vains.

VI. Participation à appels projets

Projets retenus

- BQR Région Lorraine 2011 : soutien aux jeunes chercheurs (Porteur)
« Agents anti-infectieux supportés 24 k€ »
- Institut Jean-Barriol AAP 2013 (Collaborateur) – Macrocyclus antibactériens antibiofilms (3k€) (porteur Pr. Jean-Bernard Regnouf de Vains)
- ANR 2017 (Collaborateur) : M³ODALity:
« *Modular, Multivalent and Multiplexed tOols for DuAl moLecular Imaging* » (porteur Dr B. Kuhnast - CEA) (582 k€)
- IJB 2018 (Collaborateur) : Etude RMN de nanoparticules de lipides chargées en curcumine et encapsulées dans une matrice de silice (4 k€) (porteur Axel Gansmuller - CRM2)

Projets non-retenus

- ANR 2009 (Collaborateur) : Appel à Projet Blanc
« *Macrocyclus Synthétiques Anti-Infectieux* » (Porteur : J.-B. Regnouf de Vains)
- BQR Région Lorraine 2010 (Porteur) : soutien aux jeunes chercheurs
« *Synthèse de composés actifs à degrés d'organisation fonctionnelle pilotés : vers de nouveaux matériaux anti-infectieux* »
- ANR 2010 (Collaborateur) : jeunes chercheuses et jeunes chercheurs
« *Fonctionnalisation sélective de Cyclodextrines et de Calixarènes dans l'eau en phase subcritique* » (Porteur : F. Dumarçay-Charbonnier)
- ANR 2011 (Collaborateur) : Appel à Projet Blanc
« *Fonctionnalisation directe et sélective de Cyclodextrines et de Calixarènes dans l'eau en phase subcritique* » (Porteur : F. Dumarçay-Charbonnier)
- ANR 2013 (Collaborateur) : Projet Blanc
« *Macrocyclus antiinfectieux antibiofilms* » (Porteur : J.-B. Regnouf de Vains)
- ANR 2014 (Collaborateur) : Défi de tous les avoires
« *Propriétés Antibiofilm de Nouveaux Macrocyclus Antibactériens* » (Porteur : J.-B. Regnouf de Vains)
- ANR 2016 (Collaborateur) : AAP Innovation Biomédicale
« *Développement de nouvelles sondes bimodales et multivalentes pour l'imagerie moléculaire PET/NIRF* » (Porteur : Dr B. Kuhnast)

- INCa 2016 (Collaborateur) :
« *Nouveaux outils pour l'imagerie théranostique du cancer colorectal* » (Porteur : Dr B. Kuhnast)
- FRM : appel à projet 2018 : AAP Chimie pour la Médecine 2018
« *Calixarènes anti-mycobactériens : impact sur l'enveloppe mycobactérienne* » (Porteur : J.-B. Regnouf de Vains)

Activités Universitaires

I. Activités d'enseignement

I.1. Avant-Propos

J'ai effectué mes premiers enseignements au sein de la composante Pharmacie à travers une vacation au cours de ma seconde année de doctorat et ce pour une quarantaine d'heures de travaux pratiques de chimie organique. L'obtention d'un demi-poste d'ATER en 2005 m'a permis de terminer mes travaux de thèse tout en effectuant un demi-service d'enseignement : TD (stéréochimie, nomenclature, propriétés et réactivités des principales fonctions, mécanismes réactionnels) et TP de chimie organique (apprentissage des gestes de base et synthèse organique).

Depuis mon arrivée en octobre 2008 en tant que stagiaire puis titulaire j'ai participé à divers type d'enseignements et j'ai pris la responsabilité de différentes unités d'enseignement (UE) au sein de la faculté de Pharmacie entre autre. J'ai été au départ amené à participer aux enseignements existants au niveau du cursus pharmacie, essentiellement en 1^{ère} année (Ancien Concours Pharmacie) et en 2^{ème} année en TD et TP.

En 2010, la fin du concours de Pharmacie au profit de la Première Année Commune aux Etudes de Santé (PACES) a engendré un changement important au niveau des enseignements. J'ai donc dès le départ participé à la mise en place de la PACES, essentiellement au niveau des travaux dirigés, avec la création de nouvelles séances d'enseignements dirigés en UE de tronc commun et en UE spécifique pharmacie.

En 2010 également, une demande de Dotation Spécifique par Projet (DSP) à destination de l'enseignement à la Faculté de Pharmacie m'a permis d'acquérir de nouveaux matériels et la création de nouvelles séances de TP de chimie organique. En parallèle j'ai eu l'occasion de participer à des enseignements de travaux dirigés au sein d'une UE concernant la chimie pharmaceutique industrielle (Etude de brevets, schémas blocs et schémas de principes). J'ai rapidement pris la responsabilité de cette UE destinée aux étudiants de 3^{ème} et 4^{ème} année (Initialement de 90h avec la participation d'un certain nombre d'intervenants extérieurs et universitaires). La réforme des études de Pharmacie (Septembre 2011 pour la 3^{ème} année) nous a contraints à fortement diminuer le volume horaire de cette UE. J'ai donc créé une nouvelle UE (30 heures) : *Initiation à la Pharmacie Industrielle* (IPI) dont j'ai également la responsabilité depuis et dans laquelle j'effectue un certain nombre de cours magistraux et travaux dirigés.

La création en 2012 d'une UE libre en 2^{ème} année de Pharmacie intitulée *Synthèse Organique Avancée Appliquée au Médicament* m'a permis de mettre au point de nouveaux enseignements tournés vers la chiralité. J'ai ainsi créé 4h de CM (Chiralité), 9h de TD (Chiralité et synthèses multi-étapes) et 9h de TP (Synthèse multi-étapes). J'en ai ensuite pris la responsabilité dès 2013.

Pour la rentrée 2013, j'ai été sollicité par les responsables de la Licence Sciences pour la Santé pour créer et prendre la responsabilité d'un module de chimie organique (30h) inexistant alors au sein de cette formation. J'ai ainsi créé 6h de CM (chimie organique générale, réactivité et applications aux fonctions simples), appliquées ensuite au travers de 6h de TD et 18h de TP. Dès septembre 2018 le

module de chimie organique a été converti en une UE à part entière « *Chimie Organique : réactivité théorique & expérimentale* », dont j'ai pris la responsabilité.

Depuis la rentrée 2016, suite au départ à la retraite du Professeur Alain Marsura j'ai pris en charge les différents enseignements magistraux de chimie organique que ce soit au niveau de la PACES (Tronc commun et unité d'enseignement spécifique pharmacie) ainsi qu'au niveau de la Faculté de Pharmacie (2^{ème} année). J'ai par la même occasion pris la responsabilité de l'unité d'enseignement de base intitulée *Voie d'Accès aux Substances Actives Médicamenteuses*, à destination des étudiants en pharmacie de 2^{ème} année et dans laquelle la chimie organique est enseignée.

Le but de ma démarche sur la prise en main de la totalité des enseignements magistraux de chimie organique (1^{ère} et 2^{ème} année) est de créer un ensemble homogène au niveau de la présentation, et de la façon d'aborder la chimie organique. Un premier semestre en PACES aborde la chimie organique de base, ainsi que les notions essentielles de réactivité, le tout appliqué à quelques fonctions simples. Le second semestre de PACES me permet de poursuivre en introduisant les autres fonctions de la chimie organique tout en appliquant une teinture générale cette fois-ci axée pharmacie (A travers notamment le choix des exemples d'applications). J'ai ensuite revu les cours de chimie organique pour les étudiants arrivant en 2^{ème} année du 1^{er} cycle de pharmacie. En gardant la même philosophie de présentation j'aborde les composés aromatiques et hétérocycliques en insistant toujours sur la réactivité. Le but n'est pas de faire de ces étudiants en pharmacie des chimistes organiciens mais de les préparer à la Chimie Thérapeutiques enseignée dès l'année suivante. Nous cherchons ainsi, avec les enseignants de Chimie Thérapeutique à créer un lien fort entre les deux matières et à redonner un intérêt à ces enseignements essentiels pour ces étudiants dont « la molécule » (Principe actif), est au cœur de leur futur métier.

A la rentrée 2017 j'ai demandé, à la suite d'un départ en retraite, à m'occuper des cours magistraux concernant la spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire enseignés en tronc commun de PACES. Deux raisons à cela : la première étant que cela me permet d'appuyer mes propos et de bien poser les bases de mon cours concernant l'Imagerie par Résonance Magnétique proposé aux étudiants du cursus Pharmacie (DFG-SP2, UE libre Instrumentation). La seconde étant ma demande d'acquisition de RMN de paillasse au niveau des travaux pratiques de synthèse. En effet il s'agit de l'analyse de routine essentielle pour la caractérisation structurale de molécules et cette technique reste quasiment méconnu pour nos étudiants du fait de la difficulté d'accès en temps et en lieu à un appareil de recherche.

Cet équipement permet ainsi de compléter/affiner la formation des étudiants en chimie de synthèse et thérapeutique, leur donnant ainsi la possibilité d'analyser en temps quasi « réel » la qualité de leurs productions de TP.

A la rentrée 2018, de par mon investissement au sein de la licence Sciences pour la Santé, il m'est proposé la responsabilité du parcours Bio-Ingénierie et Médicament (BIM) au niveau de la L3, associé à la responsabilité des stages de ce même parcours.

Ci-dessous un tableau récapitulatif des heures d'enseignements de ces dernières années :

Année Universitaire	2012-	2013-	2014-	2015-	2016-	2017-	2018-	2019-
HETD (hors référentiel)	13	14	15	16	17	18	19	20
	168	278	286	266	207 ¹	238	233	230 (estimation)

¹ Recrutement d'un nouvel enseignant-chercheur à la rentrée 2016

I.2. Responsabilités Pédagogiques

I.2.1. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

DFG-SP2 :

- Responsable UEB² SAM : Voie d'Accès aux Substances Actives Médicamenteuses (49,5h/étudiant)
- Responsable des Travaux Pratiques et Dirigés de Chimie Organique (28,5h/étudiant)
- Responsable de l'UEL³ SYN : Synthèse Organique Avancée Appliquée au Médicament (30h/étudiant)

DFG-SP3 :

- Responsable de l'UEL IPI : Initiation à la Pharmacie Industrielle (30h/étudiant)

I.2.2. Autres composantes de l'Université de Lorraine

- Responsable du module chimie organique de l'UE1. Atomes, biomolécules, génome, bioénergétique, métabolisme. Première Année Communes aux Etudes de Santé (PACES) (10,5h/étudiant)
- Responsable du module Chimie du Médicament de l'UE spécifique pharmacie. PACES (19,5h/étudiant)
- Responsable du module de Chimie Organique de l'UFD⁴ Sciences Appliquées. Licence Sciences pour la Santé (L2) (30h/étudiant) (jusqu'en 2018)
- Responsable de l'UE : Chimie Organique : réactivité théorique & expérimentale. L2 Sciences pour la Santé (à partir de septembre 2018) (30h/étudiant)
- Responsable du parcours « Bio-Ingénierie et Médicament » (BIM) de la L3 Sciences pour la Santé (à partir de septembre 2018)
- Responsable des stages du parcours « Bio-Ingénierie et Médicament » (BIM) de la L3 Sciences pour la Santé (à partir de septembre 2018)

I.3. Service d'Enseignement

I.3.1. Première Année Communes aux Etudes de Santé (PACES)

- UE 1 (~2100 étudiants) : Atomes, biomolécules, génome, bioénergétique, métabolisme.
 - CM Chimie Organique (10h) :
 - ✚ Nomenclature des principales fonctions et représentation en stéréochimie : stéréoisomérisation plane et spatiale, molécules chirales et activité optique.

² UEB : Unité d'Enseignement de Base

³ Unité d'Enseignement Librement choisie

⁴ UFD : Unité Fondamentale Disciplinaire

- ✚ Bases essentielles de la réactivité à travers les effets électroniques permettant d'appréhender les mécanismes réactionnels (« réactionthèque » : acide-base, addition, élimination...).
- ✚ Applications aux fonctions chimiques à simple liaison : dérivés halogénés, alcools et amines.
- TD Chimie Organique *UE1*
 - ✚ Application du CM.
- *UE 3* (~2100 étudiants) : *Organisation des appareils et systèmes : aspects fonctionnels et méthodes d'études.*
 - CM Résonance Magnétique Nucléaire (2h) :
 - ✚ Les bases de la RMN. Application en chimie de synthèse et en imagerie.
- *UE spécifique Pharmacie module Chimie du Médicament* (~2100 étudiants) :
 - CM Chimie Organique (13h) :
 - ✚ Les fonctions à double liaison : les alcènes et les carbonyles.
 - ✚ Les fonctions à triple liaison : les acides carboxyliques, les esters, les autres dérivés (chlorures d'acides, anhydrides, nitriles, amides).
 - TD Chimie Organique *UE spécifique Pharmacie* :
 - ✚ Application du CM.

1.3.2. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

DFG-SP2

- *UEB SAM* (~125 étudiants) : *Voies d'Accès aux Substances Actives Médicamenteuses* (Responsable)
 - CM (9h) :
 - ✚ Systèmes aromatiques homocycliques et hétérocycliques.
 - ✚ Les systèmes hétérocycliques présents dans la majorité des structures des principes actifs : réactivités et propriétés chimiques.
 - TP et TD de chimie organique (Responsable) :
 - ✚ Organomagnésien (synthèse d'alcool), diazotation (synthèse acide salicylique), fonctionnalisation de cyclodextrine (tosylation), colonne chromatographique.
- *UEL ANA* (~125 étudiants) : *Sciences et Techniques Analytiques Pharmaceutiques*
 - CM (1h) : détermination de structure par RMN.
- *UEL SYN* (~30 étudiants) : *Synthèse Organique Avancée Appliquée au Médicament* (Responsable)
 - CM (4h) : Maîtrise de la chiralité : facteurs princeps de l'activité biologique des molécules actives
 - TD (9h) : synthèses multi-étapes
 - TP (9h) : synthèses multi-étapes (benzoxazine, coumarine), autour de la molécule de camphre (réduction, oxydation, saponification)
- *UEL INS* (~30 étudiants) : *Instrumentations et Techniques Médicales pour le diagnostic et la Thérapie*
 - CM (2h) : exploration par résonance magnétique nucléaire.

DFG-SP3

- *UEL IPI* (~30 étudiants) : *Initiation à la Pharmacie Industrielle* (Responsable)

- CM (4h) : Initiation à la Pharmacie Industrielle – rapide tour d’horizon de la chimie lourde à la chimie fine pharmaceutique.
- TD (3h) : étude de parties expérimentales brevetées : analyses, interprétations et adaptations de procédés de synthèses (schéma block, schéma de principe)

DFA-SP1

- *UEF⁵ MAN (~50 étudiants) : Management de Projet R&D par la Pratique : le Principe Actif, de la synthèse à l’évaluation*
 - TP de chimie organique pour la synthèse d’un principe actif (20h)

I.3.3. Autre composante de l’université de Lorraine

- Licence Sciences pour la Santé (L2) : *UE Chimie Organique : réactivité théorique & expérimentale* (responsable) (~80 étudiants)
 - CM (6h) et TD (6h) de chimie organique générale
 - TP de synthèses orientées médicaments (18h) : benzoxazine, coumarine, autour de la molécule de camphre (réduction, oxydation, saponification), estérification, organomagnésien (synthèse d’un alcool).
- Licence Sciences pour la Santé (L3) parcours Bioingénierie et Médicament : UE Outils Documentaires Scientifiques (~25 étudiants)
 - CM (6h) : préparation au retour de stage (rédaction du rapport et préparation de soutenance orale)

I.3.4. Autres activités pédagogiques

- Jury de soutenance de stage hospitalo-universitaire de 5^{ème} année des études de Docteur en Pharmacie filière industrie : analyse des rapports de stages et auditions orales.
- Jury nommé pour les années DFG-SP2 et/ou DGF-SP3.
- Participation aux entretiens de recrutement Pharma-Plus ENSIC depuis 2017.
- Membre de l’équipe pédagogique de la licence Sciences pour la Santé.

I.4. Responsabilités Administratives / Collectives

I.4.1. Conseil de Faculté

Membre élu au Conseil de Faculté à la Faculté de Pharmacie de Nancy depuis 2017.

I.4.2. Commission Recherche

Membre nommé à la Commission Recherche de la Faculté de Pharmacie de Nancy depuis 2015.

⁵ UEF : Unité d’enseignement de Filière

1.4.3. Conseil de Laboratoire

Membre élu au conseil de laboratoire au sein du L2CM (UMR 7053 depuis 2018).

1.4.4. Responsabilité administratives

Responsable d'un certain nombre d'unités et de modules d'enseignement. (Cf. § I.2)

Demande de Dotations Spécifiques pour la Pédagogie (DSP) à la faculté de pharmacie :
Elaboration de dossiers pour l'acquisition de matériels dans la cadre de la pédagogie (contacts, mise en concurrence, devis...)

- **2010** : 23 k€, équipements avec mise en place de nouveaux TP (plaques chauffantes, agitateurs mécaniques, réfrigérateur, verrerie spécifique, réactifs) : acceptée
- **2015-2016** : 30 k€, renouvellement du matériel d'évaporation (évaporateurs, pompes à vide et groupe froid) : acceptée
- **2016-2017** : 79 k€. Projet soumis au Collégium Santé et retenu dans le cadre des projets structurants de l'Université de Lorraine (co-financement Université de Lorraine – Faculté de Pharmacie) : achat de deux spectromètres RMN ¹H à transformé de Fourier. Acceptée
- **2017-2018** : 9 k€, renouvellement d'équipement.

II. Encadrement d'étudiants

J'ai depuis mon arrivée au laboratoire encadré un certain nombre d'étudiants dans diverses formations.

II.1. Erasmus

- Laia Baques Salado, co-encadrement avec J.-B. Regnouf de Vains (2011)
Etudiante en 4^{ème} année de Pharmacie à la faculté de pharmacie de Barcelone.
Titre : « Développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, Synthèse de nouveaux anti-infectieux, développement d'une méthode électrophorétique dédiée »

II.2. Stage d'Initiation Recherche (SIR)

Etudiants de 2^{ème} et 3^{ème} et 4^{ème} année du diplôme de Pharmacie, Université de Lorraine

- Caroline Kuhner (2012)
Titre : « Nouveaux ligand sidérophores pour une application en infectiologie »
- Dorian Grodemouge (2013)
Titre : « Synthèse calix[4]résorcinarènes fonctionnalisés-Partie I »
- Merwan Baghli (2014)
Titre : « Développement d'une nouvelle famille de composés antibactériens potentiels »
- Dorian Grodemouge (2014)
Titre : « Synthèse calix[4]résorcinarènes fonctionnalisés-Partie II »

- Célia Isernia (2019)
Titre : « Développement de structures chirales pour l'induction asymétrique »
- Joseph-Antoine Dolcemascolo (2019)
Titre : « Mise au point de nouveaux prodrogues antimycobactériens »

II.3. IUT (Stage de 2^{ème} année de chimie de St Avold, Université Paul Verlaine – Metz)

Stagiaires de 2^{ème} année de chimie à l'IUT de St Avold, Université Paul Verlaine – Metz

- Valène Molitor, co-encadrement avec J.-B. Regnouf de Vains (2005)
Titre : « Etude de la complexation par spectrométrie UV-visible »
- Gaëlle Kerzero (2005)
Titre : « Le tétra-para-(aminoéthyl)calix[4]arène. Un intermédiaire clef pour le GEVSM »
- Sophie Vanesson (2006)
Titre : « Synthèse du tétra-para-(tert-butyloxycarbonylaminoéthyl)calix[4]arène »
- Camera Jessica (2010)
Titre : « Intermédiaires clefs dans la synthèse de nouveaux composés macrocycliques d'intérêt »
- Justine Ahisai (2013)
Titre : « Intermédiaires clefs dans la synthèse de composés actifs »
- Pauline Archambaux (2013) :
Titre : « Intermédiaires clefs dans la synthèse de composés actifs : vers de nouveaux antibactériens »

II.4. Master 1

M1 Chimie et Physico-Chimie Moléculaire. Faculté des Sciences, Nancy Université

- Hassan Mroue (2009) :
Titre : « Composés macrocycles hydrosolubles d'intérêt – Partie I »
- Amélie Clément (2009)
Titre : « Nouveaux dérivés de phénols et de biguanides »
- Hassan Mroue (2010)
Titre : « Composés macrocycles hydrosolubles d'intérêt – Partie II »
- Boshra Ben Salah, co-encadrement avec J.-B. Regnouf de Vains (2012) : Etudiante en 2^{ème} année de doctorat à l'université de Sfax (Tunisie)
Développement d'une partie de ses travaux de thèse à Nancy

II.5. Master 2

M2 SAMS (Synthèse, Analyse, Modélisation, Spectrométrie), Université de Lorraine

- M. Saïd El Khezraji (16/01/2017 au 30/06/2017)
Titre : « Etude des voies d'incorporation de motifs peptidiques sur une plate-forme calixarénique »
- M. Bastien Tozzi (05/02/18 au (15/07/18)

Titre : « Multifonctionnalisation régiosélective de plateformes macrocycliques »

II.6. Thèse de Docteur d'Université

Co-encadrement

- Frédéric Lemée

Dans le cadre de mon activité de recherche en tant que Maître de Conférences, et sous la direction du Pr. Regnouf de Vains, j'ai co-encadré le travail de thèse de M. Frédéric Lemée :

Spécialité : Chimie et Physico-chimie Moléculaire.

Soutenance publique le 23 mars 2015, à la Faculté des Sciences et Techniques, Université de Lorraine

Titre : « Composé polyioniques contraint bioactifs libres et supportés. Accès à de nouveaux matériaux antibactérien »

Jury : Dr J.-C. Chambron (Université de Bourgogne), Dr. I. Bonnamour (Université de Lyon), Pr. E. Marchioni (Université de Strasbourg), Pr. J.-B. Regnouf de Vains, Dr. I. Clarot, et Dr. M. Mourer (Université de Lorraine)

- Hugues Massimba-Dibama

J'ai également collaboré au travail de thèse de M. Hugues Massimba-Dibama. A ce titre j'ai été invité à faire partie du jury lors de sa soutenance :

Spécialité : Chimie et Physico-chimie Moléculaire.

Soutenance : le 15 novembre 2010, à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Henri Poincaré, Nancy I

Titre : « Calixarènes et composés apparentés à propriétés anti-infectieuses »

Jury : Pr. H. Parrot-Lopez, (Université de Lyon I), Dr. C. Jeunesse (Université de Strasbourg), Pr. J.-B. Regnouf de Vains, Dr. I. Clarot, Dr P. C. Gros et Dr. M. Mourer (Université de Nancy 1)

- Jérémy Pecourneau (début : octobre 2019)

Thèse en co-direction avec le Pr. Andreea Pasc

Spécialité : Chimie et Physico-chimie Moléculaire

Titre : « Lipides Photo-Commutables : nouveaux outils moléculaires pour une thérapie photo-induite »

II.7. Thèse d'Exercice

- Laure Pierre (Co-encadrement)

Titre : « Transfert d'un atelier de fabrication d'un principe actif pharmaceutique : application au salicylate le méthyle »

Soutenance : le 25 septembre 2015, à la faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Jury : Dr. E. Schmidt – Directeur (Laboratoire Novacyl), Dr. M. Yriarte-Blondey, Pr. J.-B. Regnouf de Vains et Dr. M. Mourer (Université de Lorraine)

- Marianne Bru (Co-encadrement)

Titre : « Analyse de risque et mise sous contrôle des paramètres des équipements d'un atelier de conditionnement de forme stérile »

Soutenance : 20 décembre 2018, à la faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Jury : J. Rousselot – Directeur (Sanofi Pasteur), Dr. A. M. Jankowski (Pharmacie Jankowski), Pr. I. Lartaud et Dr. M. Mourer (Université de Lorraine)

- Zoé Marhoffer (Co-encadrement)

Titre : « Amélioration du système de management de la qualité : implantation de l'application « événement & CAPA » »

Soutenance : septembre 2019, à la faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Jury : Dr. R. Monzat – Directeur (Laboratoire Intervet Production S.A.-MSD Santé Animale), Pr. I. Lartaud, Dr. M. Mourer (Université de Lorraine) et Dr. A. Pallotta (Université de Lorraine)

- Adnan Ammara (Co-encadrement)

Titre : « Stérilisation des dispositifs médicaux à l'oxyde d'éthylène »

Soutenance : septembre 2020, à la faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Jury : M. Thuries Serge – Directeur (GMED S.A.S), Pr. J.-B. Regnouf-de-Vains et Dr. M. Mourer (Université de Lorraine)

- Léa Desboeufs (Co-encadrement)

Titre : « stratégie technico-réglementaire mise au point dans le cadre d'un projet de nouvelle ligne de fabrication de médicaments »

Soutenance : septembre 2020, à la faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Jury : Pr. Pr. I. Lartaud et Dr. M. Mourer (Université de Lorraine)

III. Participation à des Jurys

En plus de l'encadrement et la soutenance des stages étudiants sous ma responsabilité, j'ai été sollicité pour participer aux jurys d'étudiants de diverses formations :

III.1. Thèse d'Université

- François Aubert-Viard (sous la direction du Dr. N. Blanchemain)

Titre : « Conception d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques »

Soutenance : le 26 septembre 2014 à l'Université de Lille 2

Jury : Pr. X. Garric (Université de Montpellier), Pr. E. Pauthe (Université de Cergy-Pontoise), Pr. E. Senneville (CHU de Tourcoing), Pr. B. Martel (Université de Lille 1), Dr. C. Neut (Université de Lille 2), Dr. C. Roques (Université de Toulouse 3), Dr. M. Mourer (Université de Lorraine)

III.2. Stage Initiation Recherche

- Arnaud Pallota

Titre : « Synthesis and characterization of thiols derivatived from cysteine core »

Soutenance : le 16 novembre 2012

Jury : Pr. P. Leroy, Dr. A. Boudier, Dr. M. Mourer

- Kevin Petitcolas

Titre : « Synthèse d'un antibactérien potentiel. Etude de nouveaux sels d'un antibactérien polycationique »

Soutenance : le 03 juin 2015

Jury : Pr. J.-B. Regnouf de Vains, Dr. I. Clarot, Dr. M. Mourer

- Benjamin Sporrer

Titre : « Tripeptide RGD : synthèse et voie d'amélioration »

Soutenance : le 16 janvier 2017

Jury : Pr. J.-B. Regnouf de Vains, Dr. I. Clarot, Dr. M. Mourer

- Jérémy Redzinski

Titre : « fonctionnalisation du Tripeptide RGD »

Soutenance : le 02 février 2017

Jury : Pr. J.-B. Regnouf de Vains, Dr. I. Clarot, Dr. M. Mourer

- Charlène Martin

Titre : « Optimisation de la lyophilisation de nanoparticules chargées en *S*-nitrosoglutathion »

Soutenance : le 17 octobre 2017

Jury : Dr. M. Parent, Dr. I. Clarot, Dr. M. Mourer

- Mohamed Amine Minani Tuyaga

Titre : « Préparation et caractérisation de nanoparticules à bas d'alginate »

Soutenance : le 15 mars 2018

Jury : Dr. M. Parent, Dr. A. Sapin, Dr. M. Mourer

- Pierre Schmitt

Titre : « Développement et caractérisation de particules composites pour l'administration orale de monoxyde d'azote »

Soutenance : le 15 mars 2018

Jury : Dr. M. Parent, Dr. A. Sapin, Dr. M. Mourer

III.3. Stage Recherche

- Cédric Barthel (DFA-SP2 – Stage recherche Internat)

Titre : « Synthèse du tripeptide RGD en solution »

Soutenance : le 15 juin 2015

Jury : Pr. J.-B. Regnouf de Vains, Dr. N. Pellegrini-Moise, Dr. M. Mourer

III.4. Comité de sélection

En 2010 membre du comité de sélection constitué au sein de l'Université de Strasbourg concernant le poste de MCF N°0410 en 32^{ème} section sur un profil « Synthèse et auto-assemblage moléculaires et supramoléculaires »

Activités de recherche

I. Avant-propos

Mon parcours universitaire est relativement classique. J'ai débuté mon initiation à la recherche lors de mon stage de maîtrise en 2001. J'ai à l'époque choisi de le réaliser en Espagne à la Faculté de Pharmacie de Barcelone dans le Laboratoire de Chimie Pharmaceutique dirigé par le Pr. Pelayo Camps. Le travail qui m'avait alors été proposé concernait la : « synthèse de précurseurs pour la préparation de nouveaux auxiliaires chiraux dérivés de la pantolactame ». La pantolactone **1** utilisée à l'époque comme auxiliaire chiral en synthèse asymétrique pour la fabrication d'acides α -arylpropanoïques par exemple⁶ posait comme difficulté : une obtention difficile de l'énantiomère *S*, une nature très hygroscopique et de très faibles propriétés cristallologènes.

Il s'agissait pour moi de mettre au point et d'optimiser la synthèse de dérivé aminés (racémique) d'auxiliaires chiraux utilisés en synthèse asymétrique (α -aminoacide, α -hydroxyacide...). (Fig. I.1). Il s'agissait à partir du racémique du 3-hydroxy-4,4-diméthyl-1-phényl-2-pyrrolidinone **2**, fabriqué à partir de la pantolactone **1**, de créer le dérivé aminé **5**.

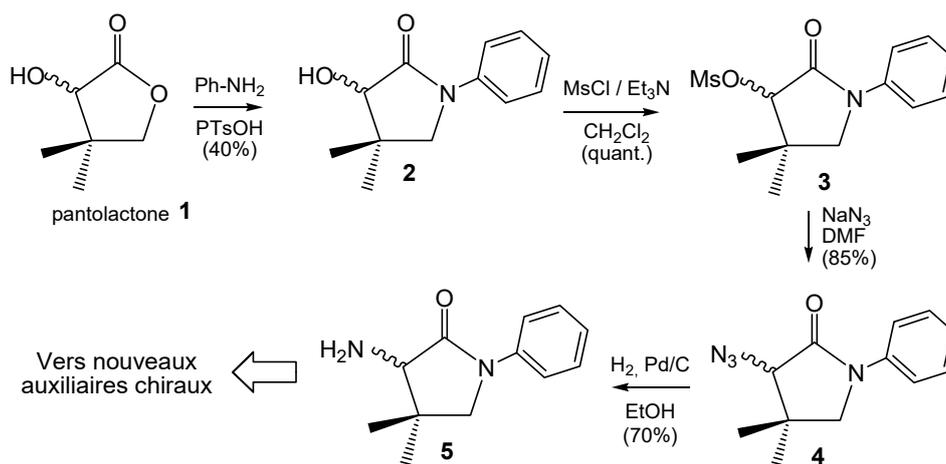


Figure I.1 : synthèse de la pantolactame **5** à partir de la pantolactone **1**

Ces premiers pas dans la recherche en chimie organique n'ont permis de me conforter dans le choix de mon parcours universitaire. Avec une envie particulière de faire de la recherche en synthèse organique tout en orientant ces dernières dans les domaines d'application de la thérapeutique, j'ai naturellement poursuivi mon cursus à travers un D.E.A. Je l'ai réalisé à la Faculté des Sciences de Nancy en Chimie et Physicochimie Moléculaire. J'ai choisi d'effectuer mes six mois de stage dans un laboratoire de synthèse très orienté vers les applications biologiques. J'y ai découvert de nouveaux types de chimie, cette fois-ci sur des plateformes saccharidiques. J'ai alors abordé des recherches avec comme objectif pour le laboratoire de développer une voie de synthèse originale d'un précurseur clef nécessaire à l'obtention de nouveaux principe actifs antibactériens de type lincomycine (Cf § II p. 30).

⁶ Camps P ; et al., *Tetrahedron: asymmetrie*, **1995**, 6, 991-1000 ; Camps P ; et al., *Tetrahedron: asymmetrie*, **1996**, 7, 1227-1234 ; Camps P ; et al., *Tetrahedron: asymmetrie*, **1999**, 10, 3123-3138.

⁷ Camps P ; et al., *Tetrahedron: asymmetrie*, **2007**, 18, 2947-2958.

L'obtention d'une bourse ministérielle m'a permis de poursuivre mon parcours *via* le doctorat. Motivé par le fait d'envisager des applications en thérapeutique je me suis rapproché du laboratoire GEVSM (Groupe des Vecteurs Supramoléculaires de Médicament) de la faculté de Pharmacie de Nancy. Sous la direction du Pr. Jean-Bernard Regnouf de Vains j'ai eu l'opportunité de développer des recherches orientées vers l'infectiologie (plus particulièrement bactériologie). Ces recherches m'ont permis de découvrir une plateforme offrant un très grand potentiel dans de multiples applications : le calixarène. Mon travail, très méthodologique, axé sur la multifonctionnalisation régiosélective de ces plateformes avait pour but, entre autres, le développement de structure présentant des propriétés antibactériennes, et présentant, dans l'idéal, un mécanisme d'action original (Cf § IV p. 35). Ces travaux s'inscrivaient dans un projet visant à lutter contre les infections bactériennes (développement de résistances face aux antibiotiques couramment employés) mais également parce qu'il y a un manque crucial de nouveaux antibiotiques sur le marché.

Ces travaux m'ont permis de travailler en lien étroit avec les biologistes en charge des différentes études, et de prendre encore plus conscience de l'importance d'une approche multidisciplinaire.

Un contrat d'ATER m'a permis de finaliser sereinement mes travaux et la rédaction de mon manuscrit de thèse. Une fois mon doctorat obtenu j'ai effectué un C.D.D. à l'Université Henri Poincaré pour la société TOXn'BIO au sein du laboratoire GEVSM. Les travaux qui m'avaient été confiés, de par mon expérience, concernaient la mise au point technique de la préparation de billes (magnétiques) greffées en surface par des structures calixaréniques. L'objectif de ce travail était le développement de systèmes d'extraction de protéines.

Suite à cela j'ai réalisé un post-doctorat à l'Université d'Artois (Faculté des Sciences Jean Perrin) sous la direction du Pr. E. Monflier. J'ai alors travaillé avec un autre représentant majeur des macromolécules : les cyclodextrines. Ce travail méthodologique consistait à fabriquer des systèmes bis- ou tris-cyclodextrine et prenait place au sein d'un projet de développement de nanoréacteurs hydrosolubles à base pour la catalyse dans l'eau (Cf § III p. 30).

Arrive enfin septembre 2008, où je suis recruté en tant que Maître de Conférences au sein du groupe GEVSM, Laboratoire de Synthèse et Réactivité de Systèmes Moléculaires Complexes (SRSMC). J'y ai depuis poursuivi la mise au point de nouvelles structures actives afin de répondre aux besoins toujours plus pressants de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-infectieuses.

Pour conclure cet avant-propos, je pense avoir acquis au cours de toutes ces années les compétences nécessaires à la construction d'un projet de recherche cohérent et organisé, encadrer sa réalisation jusqu'à son aboutissement et trouver des alternatives en cas d'impasses.

L'ensemble des travaux que j'ai pu effectuer au travers de mes différentes expériences sont liés au domaine de la biologie, ce qui en fait la ligne directrice de mes recherches. Comme je l'ai annoncé précédemment, il me paraît difficile pour la compréhension du lecteur d'en découper la présentation de manière chronologique. C'est pour cette raison que j'ai fait le choix de commencer par présenter mes travaux post-doctoraux avant ceux réalisés pour l'obtention de mon doctorat d'Université. En effet ces derniers sont intimement liés à mes travaux en tant qu'enseignant-chercheur puisqu'en étant la suite logique. Il me semblerait ainsi difficile d'en faire une coupure avec mes activités postdoctorales.

II. Travaux de DEA

J'ai choisi de réaliser mon stage de recherche de 6 mois (2002) au laboratoire de Chimie Organique Biomoléculaire appartenant à l'UMR 7565. Ce stage sous la direction des Pr. P. Coutrot et C. Grison intitulé « Etude de l'ouverture des esters glycidiques α -halogénés par les amines : vers la synthèse de la lincosamine » m'a permis de découvrir une nouvelle chimie basée, entre autre, sur les plateformes saccharidiques.

La lincosamine **1** représente un précurseur essentiel pour la fabrication du composé thiométhylé **2**. Ce dernier correspond à la partie sucre de l'antibiotique lincomycine **3** et de son analogue 7-chloro **4**. Si l'introduction du thiométhyle de **2**⁸, ainsi que la synthèse du dérivé proline⁹ et sa fixation sur avec **2**¹⁰ étaient déjà décrites, l'obtention de **1** et de la stéréochimie de ses deux centres stéréogènes C-6 et C-7 restait problématique.

Un des axes de recherche du laboratoire était la synthèse de molécules d'intérêt biologique faisant appel à des systèmes glucidiques fonctionnalisés. Le point de départ était l'utilisation d'une procédure développée par P. Coutrot consistant en un allongement de chaîne carbonée de deux carbones. Celle-ci consiste en une réaction de Darzens et permet, par exemple, le développement d' α -cétoester à partir d'un carbonyle et d'un carbanion alkyl-dichloroacétate de potassium¹¹. Appliquée à des dialdoses elle permet une extension de la chaîne carbonée avec des groupements α -cétoesters¹² et d'introduire diverses fonctionnalités en position 6. Le travail qui m'a été confié concernait l'étude de l'ouverture de motifs ester glycidique α -chlorés par différentes amines primaires et secondaires, permettant la formation d'un motif ester pyruvique (α -cétoester) β -aminé sur un motif glucidique en se servant des acquis de l'équipe (Fig. II.1). Le but ultime étant l'accès à des structures antibactériennes de type lincosamides.

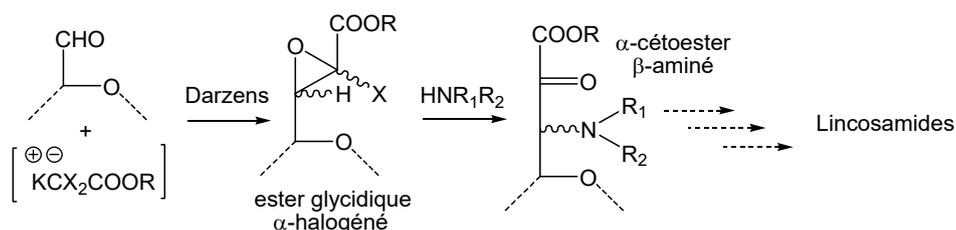
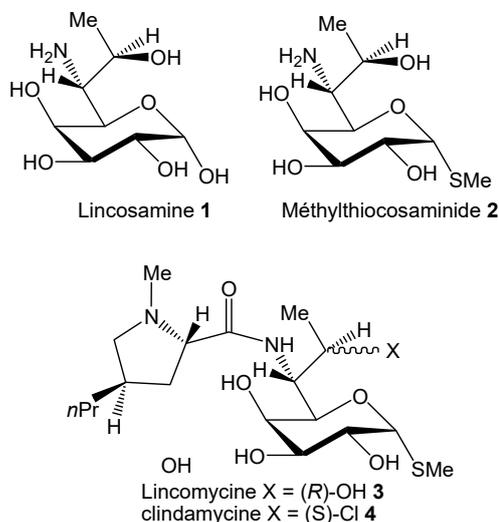


Figure II.1 : réaction de Darzens et ouverture de l'époxyde par les amines

⁸ Kukkola P. J. *et al.* *J. Chem. Soc.*, **1990**, 55, 1632-1636.

⁹ Slomp G. et Mackeller F. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 2454-2459.

¹⁰ Magerlein B. J., *tetrahedron Lett.* **1970**, 89, 2459-2464.

¹¹ Coutrot P. *et al.*, *J. Organomet. Chem.*, **1985**, 280, C11, Coutrot P. *et al.* *Synthesis*, **1984**, 115-117 ; Coutrot P. et Legris C. *Synthesis*, **1975**, 118-120.

¹² Coutrot *et al.* *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 1515-1516.

La figure suivante (Fig. II.2) décrit la stratégie mise en place pour arriver à l'objectif :

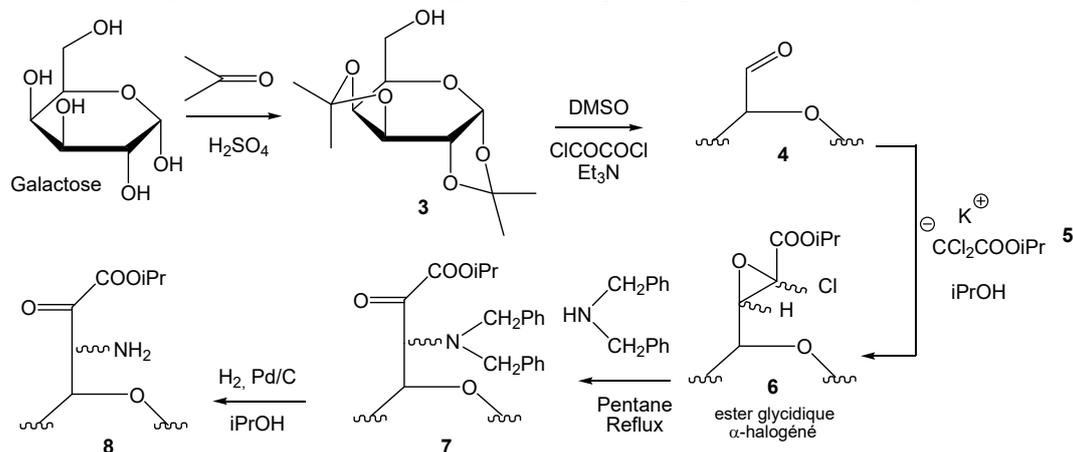


Figure II.2 : Approche synthétique choisie pour l'ouverture des esters glycidiques α -halogénés par les amines

Le précurseur **4** dérivé du galactose est préparé selon une méthode classique : protection des hydroxyles secondaires sous forme acétal (**3**) puis oxydation de l'alcool primaire par la méthode de Swern. Le dérivé **4** ainsi obtenu subit alors la réaction de Darzens (équivalente à une aldolisation) en présence du carbanion dichloroacétate d'isopropyle. Obtenus avec environ 85% de rendement, l'ester glycidique **6** est ensuite ouvert à l'aide d'une amine secondaire pour donner le dérivé α -céto- β -amino-ester **7**. Enfin une étape de réduction permet la libération de l'amine en C-6. Lors de ce travail trois plateformes saccharidiques différentes ont été utilisées sur le même schéma réactionnel et deux amines différentes ont été étudiées quant à l'ouverture de l'époxyde. L'objectif initial atteint nous avons alors commencer à réfléchir à la suite du mécanisme à envisager pour aboutir à une structure de type lincosamine : *figure II.3*.

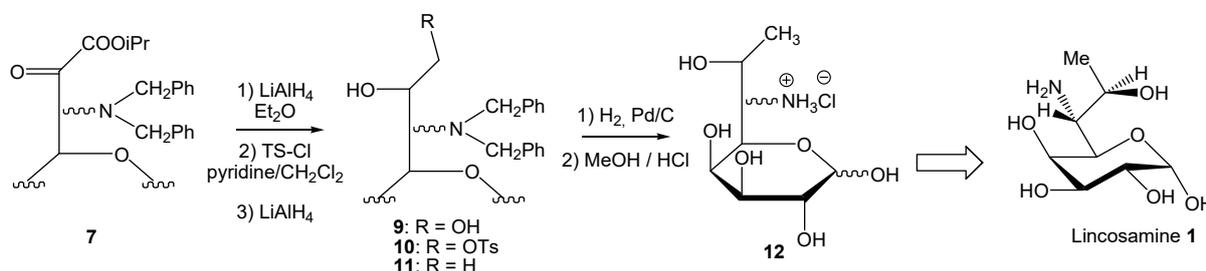


Figure II.3 : approche réactionnelle envisagée pour la formation de structures type lincosamine

Suite à l'ouverture de l'époxyde **6** par l'amine, le composé (**7**) est mis en réduction pour l'obtention d'un diol **9** (en C-7 et C-8). L'introduction de manière chimiosélective d'un motif tosylé en C-8 permet une réduction du carbone par action d'un hydrure. Ces deux premières étapes ont été réalisées avec succès sur cette série galactose. Enfin il était envisagé pour la suite, une réduction des groupements protecteurs benzyles (*via* hydrogénation : composé **11**) puis une déprotection de la plateforme saccharidique en milieu acide, pour arriver à la structure **12** proche de la lincosamine recherchée (pas de contrôle de stéréochimie dans notre première approche). Une approche similaire a été reprise quelques années plus tard en envisageant une préparation stéréosélectivité du dérivé intermédiaire **11**¹³.

¹³ Grison C. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 1841-1847

III. Travaux de Post-doctorat

Tetrahedron, **2008**, *64*, 7159-7163

European Journal of Organic Chemistry, **2008**, *34*, 5723-5730

J'ai effectué un stage post-doctoral à la Faculté des Sciences Jean-Perrin (Université d'Artois) au sein du Laboratoire de Physico-Chimie des Interfaces et Applications (LPCIA) sous la direction du Pr. E. Monflier. J'ai alors bénéficié d'un financement ANR – Nanoréacteurs hydrosolubles à base de cyclodextrine pour la catalyse dans l'eau – (coordinateur : Pr. Didier Astruc, Université de Bordeaux I)

La catalyse de réactions organiques classiques (hydrogénation de liaisons C=C et C=N, hydrosilylation, hydroformylation, couplages C-C) dans l'eau par les métaux de transition constitue un enjeu majeur de la « chimie verte ».

Se diriger vers la « chimie verte » en catalyse implique l'utilisation de l'eau en tant que solvant dans la transformation catalytique d'un substrat organique hydrophobe. Afin de l'envisager il est essentiel, cependant, que le substrat soit au moins légèrement soluble dans l'eau. Les recherches d'agent permettant la solubilisation de molécules organiques hydrophobes sans compromettre le recyclage du catalyseur est un problème important pour les chimistes voulant développer des procédés catalytiques dans l'eau. Dans ce contexte, l'assemblage covalent ou supramoléculaire de cyclodextrines possédant un centre catalytiquement actif apparaît comme une approche originale pour améliorer la réactivité et la solubilité des molécules organiques fortement hydrophobes dans des systèmes biphasiques.

Au cours des 30 dernières années, les cyclodextrines (CD) ont montré leur intérêt indéniable pour leur capacité à former des complexes d'inclusion avec des composés organiques, inorganiques, organométalliques ou des molécules biologiques. Cependant, les propriétés de liaison des CD natives sont généralement limitées et des structures plus élaborées sont souvent nécessaires. Ainsi, les CD modifiées ont été synthétisées pour s'adapter efficacement à la structure de l'invité. La force de l'interaction entre les hôtes CD et leurs invités peuvent varier considérablement en fonction de leurs structures. Il a été montré que les dimères et trimères de CD sont des hôtes supramoléculaires polytopiques intéressants avec une capacité de liaison plus forte qu'un récepteur CD simple. En plus de la complexation améliorée par la puissance générée par la présence de deux ou trois CD autour de l'invité, les jonctions qui relient les CD ensemble peuvent également contribuer à une capacité de liaison accrue en fournissant une pseudo-cavité supplémentaire.

Cet ensemble de liaisons coopératives pourrait avoir des effets bénéfiques et a été utilisé dans de nombreux domaines, par exemple en catalyse, synthèse, photochimie, mimés enzymatiques. Pour cette raison, de nombreuses CD modifiées ont déjà été élaborées mais l'obtention de ces composés multi-CD peut s'avérer fastidieux, chronophages et avec des rendements parfois faibles, en particulier pour les espèces trimériques stériquement encombrées.

Le laboratoire développait depuis quelques années la synthèse de CD pour des applications dans les processus catalytiques¹⁴. Il a alors été décidé d'étendre l'approche à des systèmes plus complexes et plus performants. Il était ainsi nécessaire d'accéder facilement à des systèmes plus élaborés. Nous avons alors montré dans un premier temps que les dimères CD peuvent être facilement obtenus par *Click Chemistry* (copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC)) à partir de mono-6-azido- β -CD et d'un *ortho*-, *mé*ta- ou *para*-bis (prop-2-ynoxy) benzène comme spacer (*Fig.*

¹⁴ Monflier E. *et al.*, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4811–4817 ; Roucoux A. *et al.*, *Chem. Commun.* **2006**, 296–298 ; Monflier E. *et al.*, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 4823–4826 ; Monflier E. *et al.*, *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, *348*, 379–386 ; Monflier E. *et al.*, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 609–618.

III.1). Nous avons ainsi développé trois séries de dimères utilisant la CD-hydroxylée, perméthylée ou peracétylée. Les dimères hydroxylés sont appropriés pour la catalyse aqueuse lorsque les perméthylés trouvent un intérêt plutôt pour la catalyse dans les solvants organiques. Quant aux dimères péracétylés, ils sont préférentiellement consacrés à des études de catalyse en CO₂ supercritique. Quelle que soit la structure, leur utilisation devrait conduire à des propriétés complexantes de divers substrats ou de phosphines.

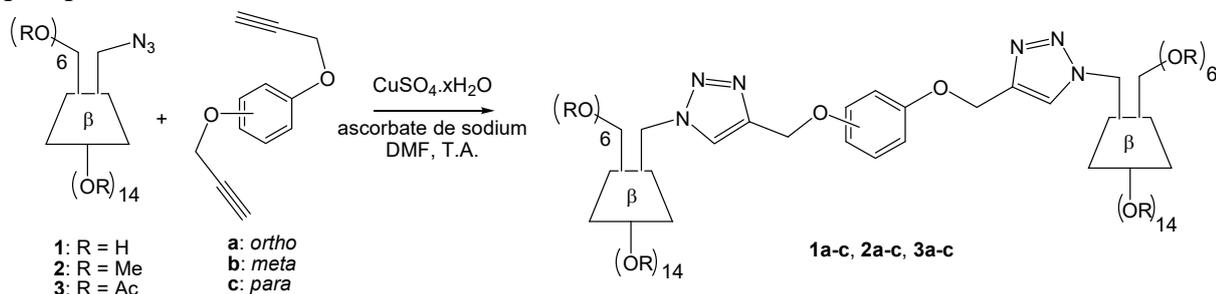


Figure III.1 : synthèse de dimères de cyclodextrines hydroxylées, perméthylées et peracétylées

Nous avons ensuite développé d'autres familles de dérivés afin de confirmer que cette méthode de cycloaddition pouvait être généralisée à l'obtention de CD mono- et polytopiques en partant d'un panel de cyclodextrines mono-azide facilement accessibles et de dérivés alcyne de nature diverse. Nous avons, dans cette seconde étude, utilisé d'une part la mono-azido cyclodextrine hydroxylée avec des dérivés mono-, di- ou tri-alcynes (*Fig. III.2*).

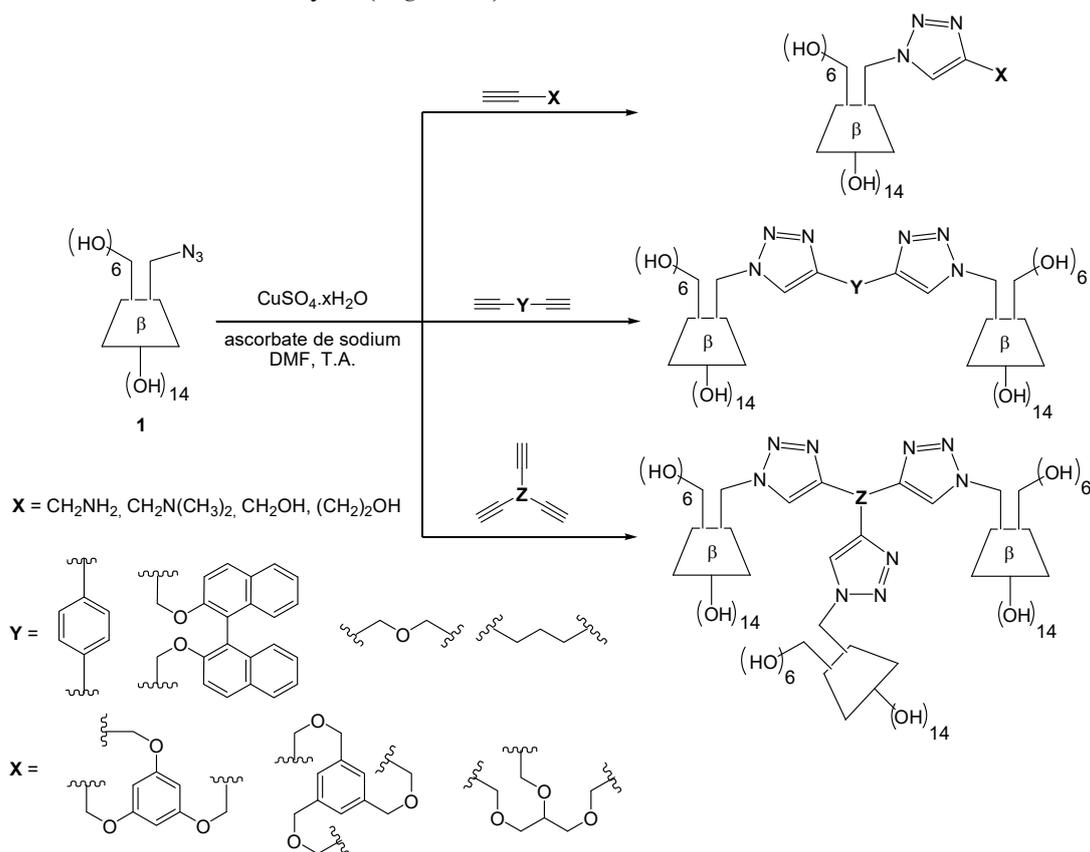


Figure III.2 : synthèse de cyclodextrines hydroxylées mono- et polytopiques

Le même genre de structure a également été développé avec une CD mono-azide partiellement méthylée (au hasard). Cette CD particulière est étudiée car elle présente une solubilité dans l'eau bien

meilleure que la CD native totalement hydroxylée¹⁵. La solubilité de **4** (Fig. III.2) est par exemple environ 30 fois supérieure à celle de la CD native **1** (Fig. III.3) (500 vs. 17 g.L⁻¹).

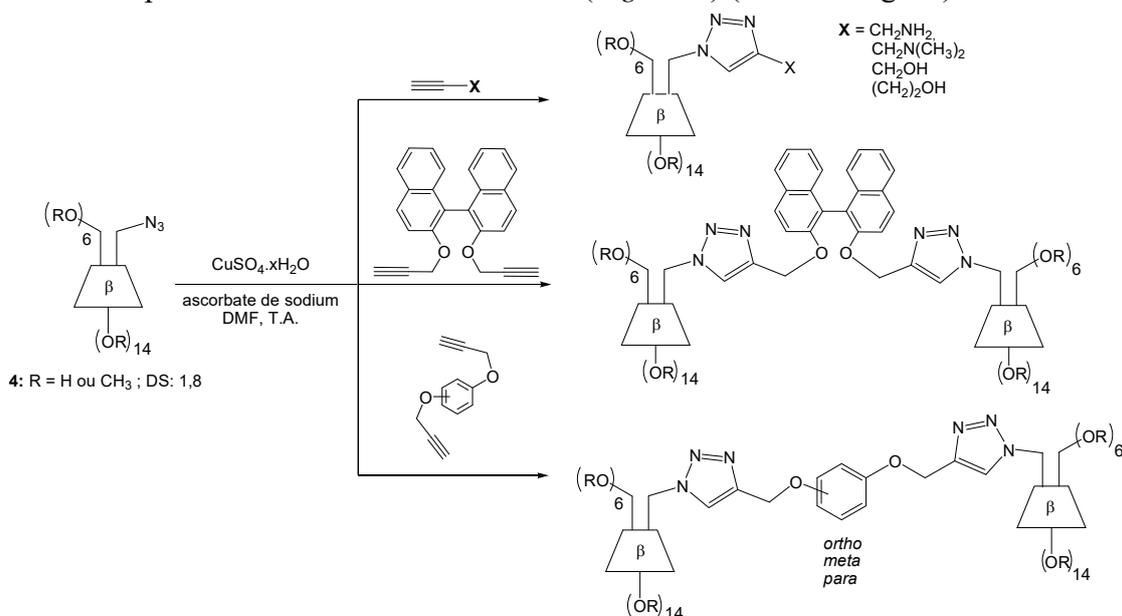


Figure III.3 : synthèse de cyclodextrines partiellement méthylées mono- et polytopiques

IV. Préambule aux travaux de Doctorat et de MCU

IV.1. Positionnement de mes travaux de recherche

Le fil conducteur de mon travail est le développement de molécules possédant des activités thérapeutiques. Mon arrivée au laboratoire en 2002 (en tant que doctorant) a été pour moi l'occasion de découvrir un domaine qui m'était quasiment inconnu, celui de la chimie des macrocycles et plus précisément des calixarènes. Ceux-ci, connus pour leur excellente capacité d'organisation spatiale de diverses fonctionnalités, font l'objet de plus en plus de travaux dans des domaines extrêmement variés (sensors ; catalyse ; sondes fluorescentes, complexation : molécules neutres, anions cations ; processus biologiques : anti-infectieux, biotechnologie (ex : transports transmembranaires), ciblage : protéines, peptides, acide nucléiques...). Aux sein de ces nombreux domaines d'applications, se trouvent les études orientées vers l'utilisation de ces plateformes en thérapeutiques (antiviraux, antibactériens, antifongiques, antituberculeux, anticancéreux...).¹⁶ Bien que ce domaine d'application ne représente pas la majorité des travaux associés à cette structure, il est néanmoins en augmentation constante. En ce qui nous concerne nous avons focalisé sur un domaine particulier connu de tous : celui de l'infectiologie. C'est à travers la chimie de synthèse de ces calixarènes et à destination de l'infectiologie que j'ai débuté ma carrière de chercheur et qui m'ont guidé jusqu'à aujourd'hui.

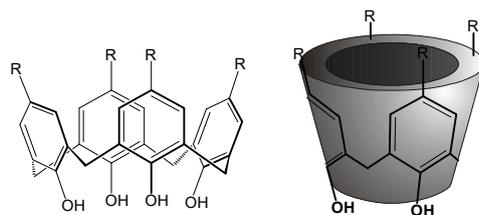
Ce domaine d'application est partie prenante d'une thématique de recherche menée au sein du laboratoire depuis une vingtaine d'années et qui en est le pionnier. Une des stratégies concerne la genèse de nouveaux composés actifs pensés et élaborés à partir d'une structure chimique centrale, organisatrice de groupements fonctionnels. Cette approche thérapeutique antibactérienne fait appel à l'utilisation de diverses plates-formes organisatrices que je vais présenter par la suite.

¹⁵ Monflier E., et al., *Curr. Org. Synth.*, **2008**, 5, 162-172

¹⁶ Ungaro R. et al, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 254-266 ; De Fátima A. et al. *Curr. Drug Discovery Technol.*, **2009**, 6, 151-170 ; Kim T. et al., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 366-386 ; Casnati A. et al, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 14140-14159. Dondoni A. et Marra A., *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 4949-4977 ; Naseer M. M. et al., *Chem. Biol. & Drug. Des.*, **2017**, 89, 243-256

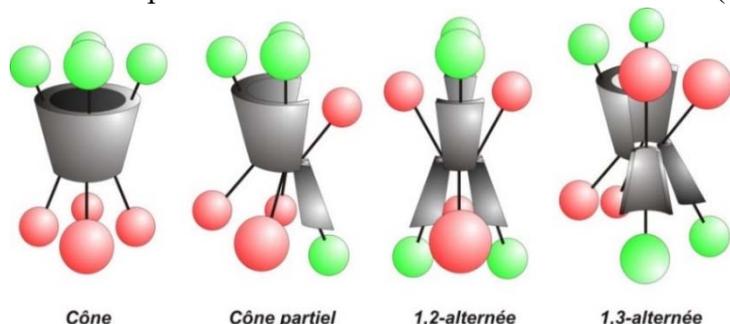
La structure organisatrice majeure de mes travaux est le calixarène : macrocycle (oligomère cyclique) constitué de n unités phénoliques *para*-substituées ou non et reliées entre elles par des ponts méthyléniques. Le calix[4]arène (Fig. IV.1) a été choisi plus particulièrement pour :

- Sa relative rigidité (beaucoup moins souple que les calixarènes de grande taille),
- Sa conformation cône stable (OH engagés dans un réseau de liaisons hydrogène),



(Figure IV.1) : le calix[4]arène

- La possibilité de substituer les deux couronnes (haute et basse),



- La possibilité de substituer sélectivement tout ou partie des OH ou des positions *para* : régiosélectivité,
- Et la possibilité d'accéder à différentes conformations, offrant l'accès à des orientations spatiales variées de diverses fonctionnalités (Fig. IV.2).

Figure IV.2 : structures conformationnelles du calix[4]arène

IV.2. Contexte et problématique de recherche

Un rapide survol sur la situation actuelle concernant l'utilisation des antibiotiques et la multiplication des résistances bactériennes associées, permet de dresser un état des lieux afin de replacer ces recherches dans leur contexte.

La recherche de traitements innovants des maladies infectieuses est un sujet de pleine actualité. L'émergence de pathologies virales sans traitement disponibles, **l'apparition de résistances et multirésistances bactériennes aux antibiotiques**, l'importance des infections nosocomiales¹⁷ (ou infections liées aux soins) génèrent, au-delà de la santé individuelle (complexité de la chimiothérapie anti-infectieuse), un véritable problème de santé publique, dont la prise en charge représente un coût important pour la société. Pour faire face à cette situation, il s'avère donc important de développer des thérapeutiques anti-infectieuses innovantes. Si les agents responsables d'infections nosocomiales peuvent être des virus ou des champignons, les bactéries en sont les plus souvent responsables.

Le processus de résistance développé par une bactérie est un phénomène tout à fait naturel et est à la base du spectre d'action de tel ou tel principe actif, il s'agit de la résistance naturelle. Mais la mise en contact répétée ou prolongée d'une souche bactérienne avec un même composé actif génère l'apparition de **résistances acquises**. Il s'agit de la **pression de sélection** qui va entraîner la sélection des uniques bactéries résistantes qui vont alors pouvoir transmettre leur patrimoine génétique « résistant » aux nouvelles générations :

→ La souche est devenue résistante à ce principe actif.

¹⁷ Données de l'Institut de Veille Sanitaire - Enquête RAISIN 2015

<http://invs.santepubliquefrance.fr/>

- Le **nombre limité de principes actifs à disposition** aujourd'hui entraîne, à présent, l'apparition de résistances à plusieurs composés :

→ **La souche est devenue multi-résistante**

Ce sont les Bactéries Multi-Résistantes (BMR).

- Il n'est, à l'heure actuelle, pas prouvé que ces BMR sont plus virulentes (aptitude à se multiplier) que les bactéries sensibles de la même espèce, mais le **faible arsenal thérapeutique** restant à disposition peut parfois s'avérer inefficace et entraîner de grandes difficultés de prise en charge des patients :

→ **Impasse thérapeutique**

Échecs de traitements par manque d'antibiotiques efficaces avec mise en jeu du pronostic vital. Ces BMR génèrent une morbidité et une mortalité associées de plus en plus importantes ainsi que des coûts de traitements ou d'hospitalisation en hausse.

- Le **nombre extrêmement faible de nouveaux antibiotiques développés et mis sur le marché** ces dernières années sont une cause non négligeable de l'apparition de ces résistances. En mai 2017 un total de 51 antibiotiques (de synthèse ou biologique (anticorps mono ou polyclonaux)), combinaisons incluses, étaient en développement dont 42 ciblent les organismes pathogènes prioritaires par l'OMS¹⁸. L'organisme estime qu'à peine 10 d'entre eux pourraient être mis sur le marché d'ici les 5 à 10 ans à venir. Ces nouveaux traitements apporteront peu à l'existant et ne permettront pas de faire face à la résistance bactérienne. Le mauvais usage des antibiotiques disponibles conduit à un cercle vicieux dans lequel la génération de résistances amène à l'utilisation d'antibiotiques à spectre d'action de plus en plus large → On commence ainsi à voir apparaître en France des **bactéries résistantes à la quasi-totalité des antibiotiques disponibles**.

La consommation globale d'antibiotiques (mondiale) a augmenté de 65% entre 2000 et 2015, avec une consommation globale estimée de 42,3 milliards de doses quotidiennes¹⁹. Si les choses perdurent il est estimé qu'en 2030 la consommation globale sera jusqu'à 200% plus importante que les 42 milliards de doses quotidiennes évaluées en 2015. La résistance aux antibiotiques pourraient entraîner 10 millions de décès par an d'ici 2050.²⁰

Respecter le « bon usage » des antibiotiques et plus largement le « moindre usage », afin de préserver leur efficacité et donc d'autant plus important que la perspective d'arrivée prochaine de nouveaux traitements est limitée. Cet effort est d'autant plus indispensable au niveau national que la France reste un des plus grands pays consommateurs d'antibiotiques en Europe.

- En parallèle, la mise au point de composés actifs, avec des mécanismes d'action originaux est donc essentielle afin de contourner les mécanismes de résistance actuels.

C'est dans ce contexte que l'essentiel de mes recherches prennent place.

Cette situation encourage des efforts constants dans la recherche et le développement de nouveaux agents antibactériens actifs sur les bactéries à Gram positif et/ou négatif. Une nouvelle molécule avec un mécanisme d'action innovant serait particulièrement attractive puisque moins

¹⁸ Antibacterial agents in clinical development, WHO, 2017

¹⁹ Klein E. Y. *et al.*, *PNAS*, 2018, 115 (15), E3463-E3470

²⁰ Review on Antimicrobial Resistance, May 2016

sensible aux mécanismes de résistance identifiés actuellement. Cette problématique des infections nosocomiales et de la lutte contre les BMR est devenu partie prenante d'un programme de recherche mené au sein du laboratoire envisageant une nouvelle famille de composés antibactériens de synthèse, actifs sur bactéries à Gram positif et/ou négatif, résistantes ou non aux antibiotiques utilisés en thérapeutique.

IV.3. Stratégie de Travail

Basé sur la structure calixarénique nous avons choisi les deux d'hypothèses suivantes :

- Notre première et principale hypothèse reposait sur le fait que la charge globale nette de surface des bactéries étant **négative** l'apport de contre-ions **positifs** de manière organisée *via* le squelette calixarénique, pourrait résulter en une **modification des propriétés ioniques de surface entraînant une désorganisation et conduisant à un effet délétère pour les cellules bactériennes** (Fig. IV.3). Notre stratégie est donc basée sur une pré-organisation rigidifiante de groupements cationiques à la périphérie de macrocycles calixaréniques, résultant en un oligomère polycationique cyclique.

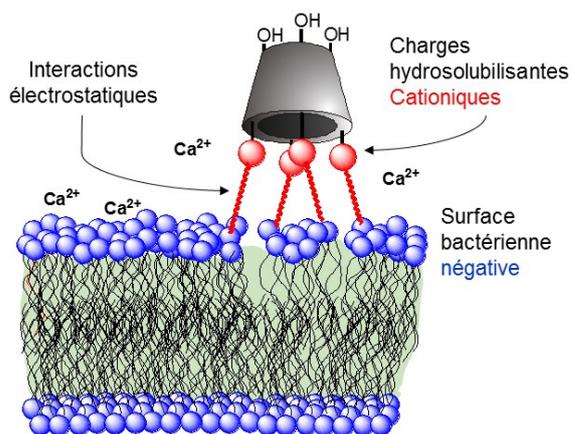
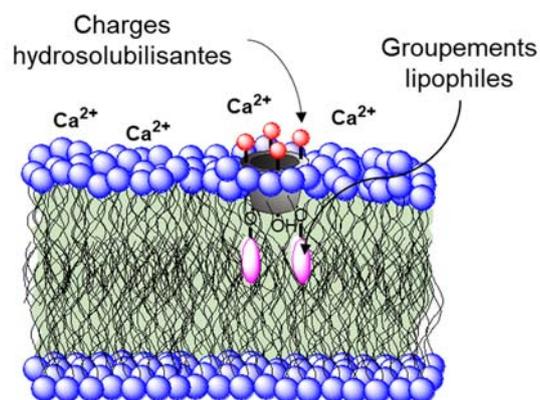


Figure IV.3 : hypothèse d'action reposant sur une pré-organisation rigidifiante de groupements cationiques sur le calix[4]arène

- Une seconde hypothèse reposait sur le fait que des composés **amphiphiles pourraient permettre une insertion désorganisante** dans la paroi bactérienne (Fig. IV.4)

Figure IV.4 : hypothèse d'action reposant sur l'amphiphilie du calixarène



Si notre stratégie repose entièrement sur la capacité organisatrice générée par le squelette calixarénique, il nous fallait bien entendu le démontrer. Nous avons donc, lors de ce travail, cherché à confirmer l'importance de l'organisation spatiale et contrainte de charge *via* la structure calixarénique. Nous nous sommes alors attachés à comparer les activités *in vitro* du cyclotétramère avec celles de son monomère constitutif. Le but étant de savoir si des charges portées par des entités monomériques totalement désorganisées pourraient, *via* une organisation spatiale apportée par la structure calixarénique, voir leurs activités augmenter : interactions beaucoup plus importantes et effets délétères supérieurs (Fig. IV.5). C'est en ce sens que nous avons, par la suite, insérer dès que possible les entités monomériques constitutives des calixarènes étudiés (porteuses des mêmes fonctionnalités).

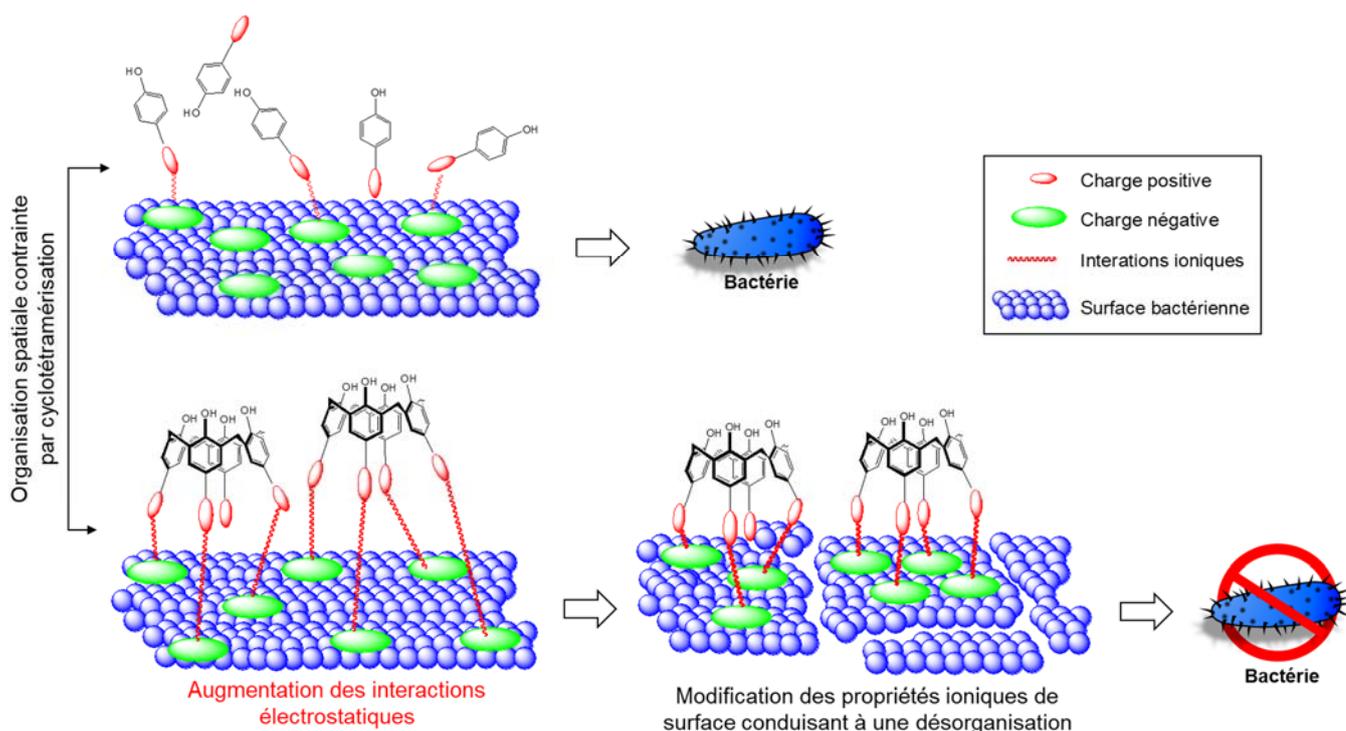


Figure IV.5 : principal mécanisme d'action envisagé : importance supposée de la cyclotétramérisation

V. Travaux de Doctorat & ATER

Mon arrivée au laboratoire a permis la poursuite d'un projet initié par J.-B. Regnouf de Vains et faisant l'objet du sujet de thèse de N. Psychogios reposant sur l'étude des propriétés antimicrobiennes de macrocycles de type calixarène porteurs d'unités chélatantes et de fonctions hydrosolubilisantes. Les domaines visés étant ceux très sensibles de la bactériologie et de la virologie. Domaines dans lesquels la recherche et la découverte de nouvelles voies thérapeutiques et de nouveaux principes actifs deviennent cruciales. La multiplication des affections virales (capacité de mutation des virus et acquisition de résistances) ainsi que l'importance des infections nosocomiales et l'apparition de bactéries multi-résistantes ont conduit au développement d'une approche thérapeutique antimicrobienne.

V.1. Thématique antivirale

Tetrahedron Letters **2006**, *47*, 1895-1899

Bioorganic and Medicinal Chemistry, **2010**, *18*, 36-45

Helvetica Chimica Acta; **2012**, *95*, 11373-1386

Antiviral Research, **2010**, *88*, 343-346

Ce travail a été initié par la Pr. J.-B. Regnouf de Vains à partir de l'analyse d'un brevet publié en 1994²¹ décrivant les propriétés antivirales du tétra-para-sulfonato-calix[4]arène sur des virus

²¹ K. M. Hwang, Y. M. Qi, S.-Y. Liu, W. Choy et J. Chen; Patent, WO 94/03164, **1994**: "Inhibition and treatment of infection by enveloped virus with calix(n)arene compounds"

enveloppés dont le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), le Virus de l'Hépatite B (VHB), le Virus Herpès Simplex (VHS-1 et -2) et les virus de la grippe (Influenza Virus). Le mode d'action supposé de ce composé reposerait sur la désorganisation de l'enveloppe virale, suite à une interaction avec les fonctions sulfonates; empêchant ainsi la reconnaissance du virus par les récepteurs membranaires des cellules cibles ou entraînant la destruction de la particule virale.

L'objectif de ce sujet était de transposer l'étude de composés porteurs de bis-hétérocycles, potentiellement complexant de cations métalliques, de la phase organique à la phase aqueuse pour en déterminer l'activité biologique. Outre les interactions avec les charges, les lipides (phospholipides), principaux constituant de l'enveloppe virale, pourraient être une des cibles potentielles de nos composés de par la présence des unités bis-hétérocyclique hydrophobes, faisant de ces composés des entités amphiphiles.

Familles de composés que j'ai développé dans le cadre de cette étude (Fig. V.1 et V.2) :

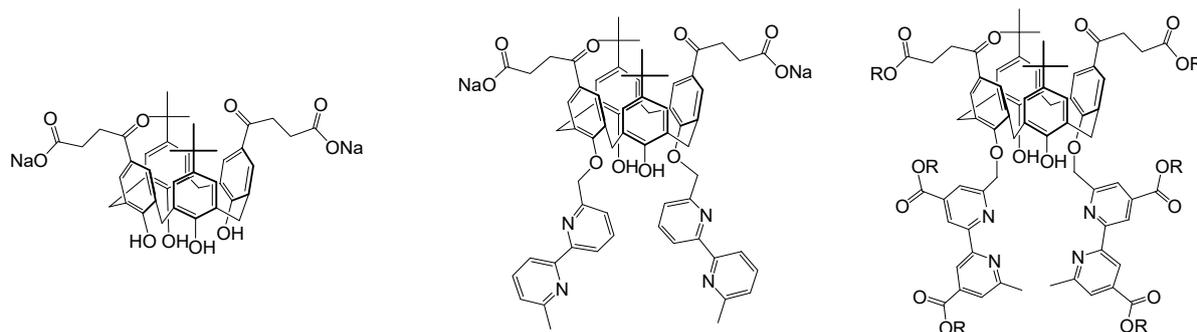


Figure V.1: Famille succinate : 14 nouveaux composés (finaux et intermédiaires)

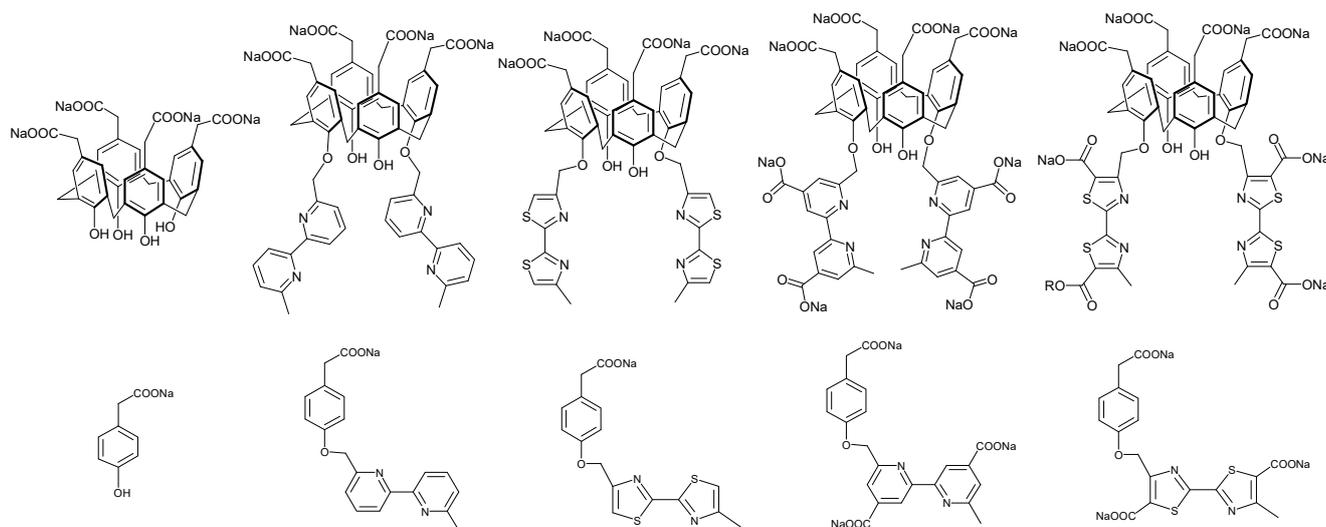


Figure V.2 : Famille carboxylate : 19 composés calixaréniques (finaux et intermédiaires) dont 9 originaux, 12 structures monomériques originales (finales et intermédiaires)

J'ai choisi de ne pas entrer dans le détail de cette partie de mon travail de thèse afin de me focaliser uniquement sur les activités anti-bactériennes. Ce que l'on retiendra simplement ici, est le fait que ces composés calixaréniques chargés possèdent d'excellentes activités anti-virales et notamment sur les virus HIV responsable du Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA). Un travail important en collaboration avec le Dr. A.-M. Aubertin (INSERM Strasbourg) a donné lieu à un article riche en résultats.

Neuf espèces calixaréniques anioniques hydrosolubles *via* des groupements sulfonate, carboxylate ou phosphonate, dont six incorporant deux sous-unités 2,2'-bithiazole en position 1,3-alternée en couronne basse (Fig V.3), ont été synthétisées et évaluées en tant qu'agents anti-VIH sur différentes souches du virus et lignées cellulaires lymphocytaires (VIH-1 III B / MT4, VIH-1 LAI / CEM-SS, VIH-1 Bal / PBMC), en utilisant l'AZT comme composé de référence. Une toxicité n'a été détecté que pour une minorité de composés sur les PBMC alors que pour les autres, aucune toxicité cellulaire n'a été observée à des concentrations allant jusqu'à 100 μ M. La plupart des composés ont une activité antivirale dans une fourchette de 10-50 μ M, et l'un d'eux, le sulfonyle **6** (fig V.3), présente une activité, quel que soit le tropisme du virus, à une concentration micromolaire (Tableau V.1)

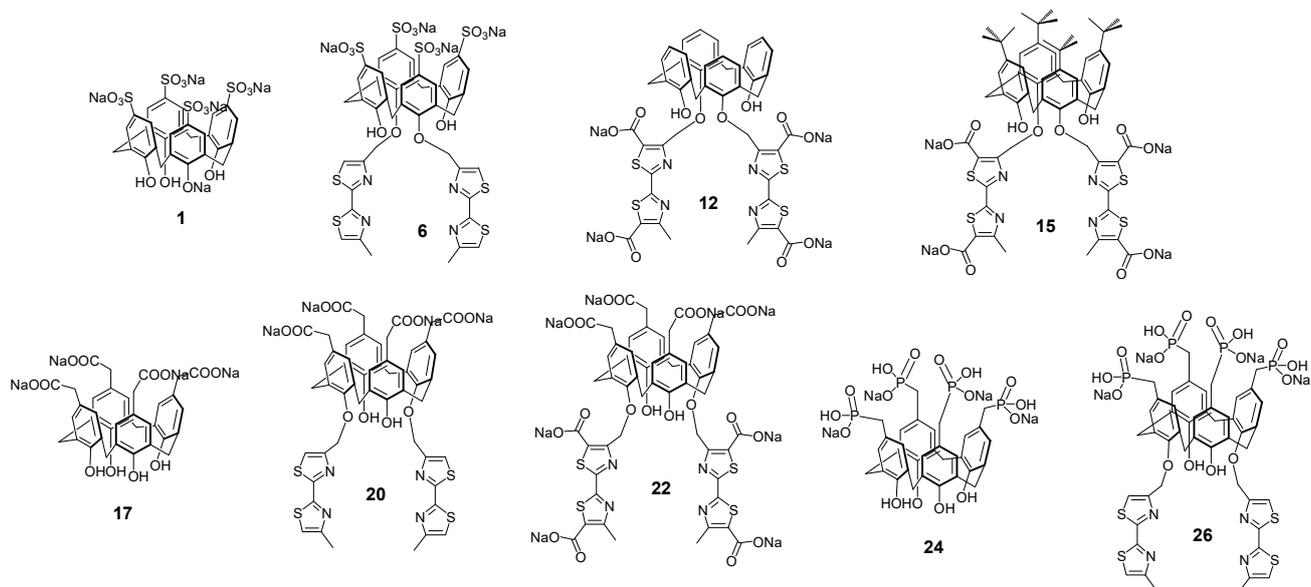


Figure V.3 : représentation des structures engagées dans cette étude sur les propriétés anti-VIH

Tableau V.1: activité antivirale (CI_{50} en μ M²²) et cytotoxicité (CC_{50} en μ M²³) des composés **1**, **6**, **12**, **15**, **17**, **20**, **22**, **24** et **26** déterminées sur diverses lignées cellulaires et avec différentes souches virales de VIH (souches X4: HIV-1 LAI et HIV-1 IIIB; souche R5 : HIV-1 Bal) et Indice de Sélectivité (IS)²⁴

		1	6	12	15	17	20	22	24	26	AZT
MT4 (HIV-1 III B)	CI_{50}^a	38	1,6	17	15	44	16,5	14	>100	14	0,01
	CC_{50}^b	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>1000	>100	>100	>100
	IS ^c	>2,6	>70	>6	>6,5	>2,3	>60	>7		>7	
CEM-SS (HIV-1 LAI)	CI_{50}^a	86	2,2	27	19,5	81	28	5,3	>100	15	0,0051
	CC_{50}^b	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>1000	>100	>100	>100
	IS ^c	>1,2	>45	>3,5	>5	>1,2	>36	>26		>6	
PBMC (HIV-1 Bal)	CI_{50}^a	45	1,5	12	14,5	9,5	27,7	>37	70	57	0,0077
	CC_{50}^b	>100	>100	>100	>100	100	230	37	78	92	75
	IS ^c	>2	>60	>8,5	>7	10,5	8,3	<1	>1	>1,7	

²² CI_{50} : concentration requise pour protéger 50% des cellules MT4 infectées par le virus contre la cytopathogénicité du virus ou concentration requise pour inhiber 50% de la réplication du virus par la mesure de l'activité de la transcriptase inverse sur des cellules CEM-SS et PMBC. Toutes les données représentent les valeurs moyennes pour au moins deux ou trois expériences distinctes. La variation de ces résultats selon les procédures standards sont inférieurs à \pm 10%.

²³ Concentration requise pour causer la mort de 50% des cellules non infectées.

²⁴ IS : CC_{50}/CI_{50}

V.2. Thématique antibactérienne

V.2.1. Synthèse du Cx1

Une des fonctions connues mais peu utilisée dans le domaine microbiologique est la fonction guanidine. C'est elle que nous nous sommes employés à introduire sur notre macrocycle. A notre connaissance, mis à part la streptomycine²⁵, aucun antibiotique de référence, utilisé en thérapeutique ou en cours de développement, n'est porteur de fonctions guanidiniums, excepté les calixarènes développés dans cette étude. Dans ce cadre, nous avons choisi comme références pour leur similitude de groupements fonctionnels l'**hexamidine** (Hexomédine®) et la **chlorhexidine** (septéal®) (Fig. V.4), antiseptiques cutanés très utilisés, et la **synthaline A** (Fig. V.4), molécule ancienne étudiée pour ses propriétés antiparasitaires et antidiabétiques.

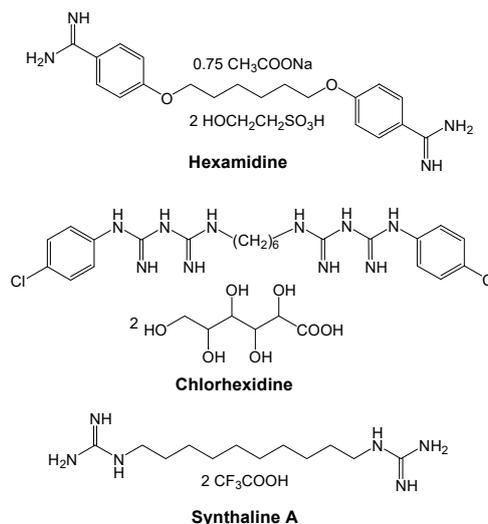


Figure V.4: structure des différentes références utilisées dans nos travaux : **Synthaline A**, **Hexamidine** (sel de diisethionate, Hexomédine®), **Chlorhexidine** (sel de digluconate, Septéal®)

Le développement de notre première structure chargée positivement, rapidement devenue notre leader, passe dans un premier temps par une réaction d'aminométhylation (Mannich) en couronne supérieure. La quaternarisation de l'azote à l'aide CH₃I permet la formation de l'ammonium aisément déplacé par un nitrile. Le dérivé tétra-cyano-méthylé ainsi obtenu est réduit selon une méthode adaptée de Gutsche *et al.*²⁶, à l'aide de BH₃. Selon les données de la littérature 32 équivalents de BH₃-THF sont nécessaires à la réduction de notre structure. Le coût non négligeable du complexe BH₃-THF, notamment lors de synthèse de quantité importante, nous a fait nous intéresser à la diminution des quantités de BH₃ engagées dans ces réductions. Travaillant en parallèle sur une série de composés carboxylés nous avons été interpellé par un article présentant la réduction d'acides carboxyliques par le borane en présence de triméthoxyborane (B(OMe)₃)²⁷. La seule justification de ce borane méthoxylé étant « une augmentation de réactivité et de sélectivité ». Les recherches bibliographiques concernant des réductions et engageant ces deux agents ayant été infructueuses nous avons engagé le dérivé nitrilé dans un mélange BH₃-THF / B(OMe)₃ équimolaire à raison d'un équivalent par fonction nitrile. Ceci implique une réduction d'un facteur 8 de la quantité de complexe borane-THF. Il s'est avéré que dans ces conditions nous obtenons des rendements tout à fait identiques à la méthode originelle tout en simplifiant l'étape de traitement.

²⁵ Streptomycine : aminoside à large spectre (perturbation de la synthèse protéique *via* fixation sur les ribosomes bactériens. Principe actif essentiel selon OMS. 20th Essential Medicines List, **2017**, WHO.

²⁶ Gutsche C. D., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6153-6162

²⁷ Zhou Y. et al., *Tet. Lett.*, **2008**, *49*, 3260–3263

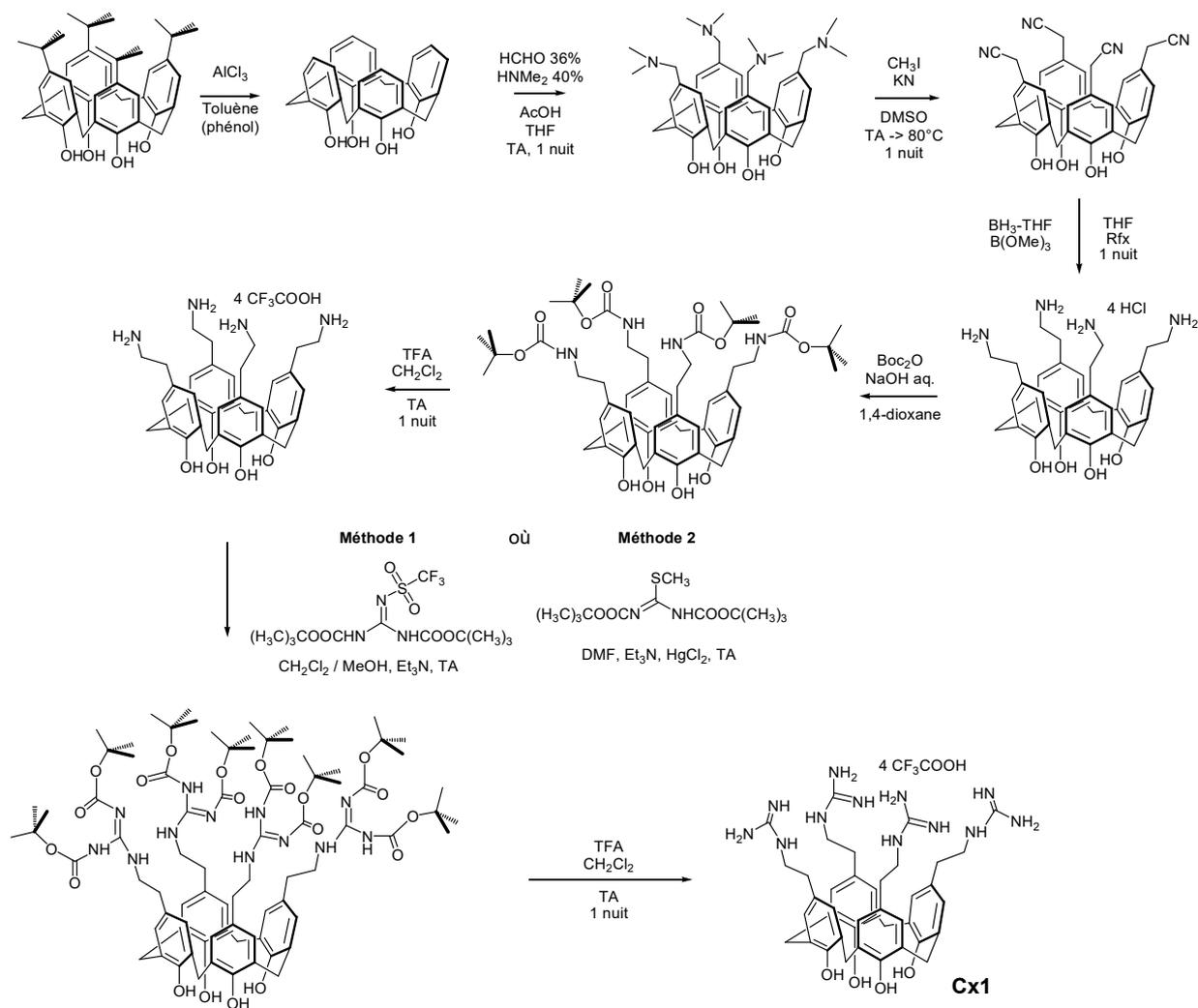


Figure V.5 : voie d'accès au composé leader *p*-tétraéthylguanidinium-calix[4]arène Cx1

Le tétra-ammonium obtenu est protégé sous forme de carbamate de manière à le purifier et à permettre une fonctionnalisation ultérieure en couronne basse (Fig. V.5). La suppression classique des groupements protecteurs est suivie de l'introduction de la fonction guanidine.

La suite de la réaction met en jeu un synthon dérivé de la guanidine à savoir la *N,N'*-di-boc-*N''*-thiométhylguanidine²⁸ (**méthode 2**, fig. V.5) ou la *N,N'*-di-boc-*N''*-triflylguanidine²⁹ (**méthode 1**, fig. V.5). Si les deux méthodes aboutissent au bon composé, la seconde bien plus propre engendre de meilleurs rendements et une purification aisée, tout en évitant l'utilisation de sel de mercure et de DMF. La mise en contact de cette triflylguanidine avec le calix[4]arène ammonium dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ conduit rapidement au produit attendu octaboqué. La simple déprotection en milieu acide permet alors l'obtention d'un nouveau calixarène *tétra*-guanidinium hydrosoluble que nous avons nommé **Cx1**. Un total de huit étapes est donc nécessaire pour l'obtention de ce nouveau dérivé. Ce dernier est devenu rapidement le composé sur lequel nous avons engagé le plus d'investigations concernant ses activités anti-infectieuses et sur son mode d'action présumé, il est ainsi devenu un des leaders de nos travaux.

²⁸ Commercial

²⁹ Obtenu selon : Baker T. J. *et al.*, *Org. Synth.*, **2000**, 78, 91-96

V.2.2. Résultats préliminaires (Cx1)

Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16, 2960-2963

Pathologie Biologie, 2006, 54, 470-476

Les premiers tests que nous avons réalisés sont les déterminations d'activités antibactériennes (Tableau V.2), à savoir Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sur des souches de référence³⁰ :

- Gram négatif : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*
- Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*

En parallèle à la détermination des CMI une étude de toxicité cellulaire³¹ (Concentration Inhibitrice à 50% ou CI₅₀) a été menée sur cellules eucaryotes (Tableau V.2) :

- MRC-5 : cellules pulmonaires embryonnaires humaines de type fibroblastique (*Rq* : seules les valeurs associées à cette souche seront présentées dans les résultats)
- HaCaT : lignée cellulaire développée à partir de kératinocyte humains.³²

L'ensemble de ces données permet un rapide calcul de l'indice de sélectivité IS (CI₅₀ à 24h / CMI). Plus la valeur de cet IS est élevée plus le composé sera potentiellement intéressant car possèdera une concentration cytotoxique éloignée des concentrations actives.

Tableau V.2 : CMI, CI₅₀ en µg/mL et IS vis-à-vis de souches de référence ATCC du **Cx1**, de son monomère **mCx1**, de l'Hexamidine **HX**, de la Chlohexidine **CHX** et de la **Synthaline A**. a : amoxicilline ; b : pénicilline G ; c : ampicilline ; d : ticarcilline ; nd : non déterminé

		Cx1	mCx1	HX	CHX	Synthaline	Antibiotiques de référence
	CI₅₀ 24h	> 256	> 256	32	16	128-256	nd
	CI₅₀ 48h	> 256	> 256	32	16	64	nd
	CI₅₀ 168h	256	32-64	8	8	< 1	nd
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	4	512	8	0.25	64	4 ^a
	IS	> 64	> 0.5	0,25	64	2-4	nd
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CMI	32	> 512	32	8	128	16 ^d
	IS	> 8	0.50	1	2	1-2	nd
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	8	512	4	0.5	64	< 1 ^b
	IS	> 32	> 0.5	8	32	2-4	nd
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	8	512	< 1	0.5	16	< 1 ^b
	IS	> 32	> 0.5	> 32	32	8-16	nd
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	32	> 512	2	2	256	< 1 ^c
	IS	> 8	0.5	16	8	0.5-1	nd

Les points importants à tirer de cette première étude :

- Importance du squelette calixarénique : de sa capacité à organiser dans l'espace et à contraindre nos fonctions guanidiniums. Le passage du monomère **mCx1** (totalement inactif CMI > 512

³⁰ CMI déterminées 3 fois, par méthode de dilution en milieu aqueux Mueller Hinton en plaque 96 puits.

³¹ Obtenue par test de viabilité cellulaire.

³² Ces cellules ont une morphologie de type kératinocyte de l'épiderme et correspondent à un modèle de lignée cellulaire *in vitro* pour l'étude des cancers humains de la peau

µg/mL) au cyclotétramère **Cx1** se traduit par un très fort gain d'activité sur l'ensemble des souches (4 à 32 µg/mL sur *E. coli* et *E. faecalis* respectivement).

- L'activité du **Cx1** très bonne sur bactéries à Gram positif et à Gram négatif, laisse présager un composé à large spectre.
- Des travaux complémentaires ont également montré que ce composé possède une activité bactéricide de type concentration-dépendant, rapide (dans les 2 à 4h de contact selon les souches). Il a été observé une concentration minimale bactéricide sur *E. coli* à 8 x CMI, sur *P. aeruginosa* à 4 x CMI et sur *S. aureus* à 4 x CMI.
- L'activité antibactérienne de ce calixarène est comparable à celle des deux antiseptiques hexamidine **HX** et chlorhexidine **CHX**, choisis comme référence pour leur proximité fonctionnelle.
- Meilleure activité du **Cx1** versus **synthaline A** (organisation linéaire de guanidinium)
- Absence de toxicité *in vitro* sur cellules eucaryotes³³ (> 256 µg/mL), toxicité nettement inférieure à celles des antiseptiques de référence. De plus il est important de noter que les toxicités, évaluées jusqu'à 168h de contact, restent largement supérieures à 256 µg/mL avec le **Cx1** alors qu'elles deviennent critiques pour les autres composés (4 µg/ml pour **HX** et < 1 µg/ml pour la **synthaline A** par exemples)
- Détermination d'excellents indices de sélectivité, largement supérieurs aux composés commerciaux de référence. Les bonnes activités de l'**HX** et de la **CHX** sont compensées par une toxicité relativement proche des domaines d'activité.

Une première conclusion montre donc la genèse d'une forte activité par cyclotétramérisation tout en conservant une non toxicité. Cette conclusion confirme l'hypothèse initiale de cette thématique de recherche. Ces premiers résultats extrêmement intéressants nous ont fortement incités à poursuivre nos études en ce sens, que ce soit sur cette structure (poursuite des investigations biologiques) ou sur d'autres structures dérivées afin d'affiner les données concernant les relations structures-activités.

V.2.3. Précision du spectre d'action du Cx1

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 60, 575-581

Clinical Microbiology and Infection, 2010, 16, 432-438

Une des premières études complémentaires à être menée a été la détermination des CMI sur des souches issues d'isolats cliniques³⁴. Ces derniers correspondent aux souches de références et ont été choisis car ils sont connus pour posséder des mécanismes de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques. Cette étude permet, du fait de la connaissance des mécanismes d'action de ces antibiotiques, de situer nos propres composés. En effet, si un composé possède une activité sur une souche de référence, et que son activité disparaît sur la souche résistante analogue, nous pourrions alors supposer pour notre drogue un mécanisme d'action proche ou analogue de l'antibiotique auquel cette souche est résistante.

Isolats cliniques utilisés :

³³ CI₅₀ pour les cellules MRC-5, des domaines de toxicité équivalents ont été déterminés pour les cellules HaCat

³⁴ Souches issues de prélèvements hospitaliers (hémoculture, cathéter, prélèvement rectal...)

- *E. coli* : productrice de pénicillinase, résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline.
- *S. aureus* : résistance à l'ensemble des β -lactamines (résistance à la méticilline et à la pénicilline) (SARM)
- *E. faecium* : résistance à la vancomycine.
- *E. faecalis* : résistance à la vancomycine et à la teicoplanine.
- *P. aeruginosa* : présentant une résistance par efflux (Mécanisme de transport actif membranaire s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques) à la ticarcilline et à l'aztréonam.

L'ensemble des données recueillies est présenté dans le tableau suivant (*Tableau V.3*)

Tableau V.3: CMI, CI₅₀ en $\mu\text{g/mL}$ et IS (CI₅₀ à 24h / CMI) vis-à-vis de souches de référence résistantes du **Cx1**, de son monomère **mCx1**, de l'Hexamidine **HX**, de la Chlohexidine **CHX** et de la **Synthaline A**. a : amoxicilline ; b : pénicilline G ; c : ampicilline ; d : ticarcilline ; nd : non déterminé

		Cx1	mCx1	HX	Synthaline	Antibiotiques de référence
	CI₅₀ 24h	> 256	> 256	16	128	nd
<i>E. coli</i>	CMI	2	512	8	64	> 256 ^a
	IS	> 128	< 0,5	2	2	-
	CMI	8	512	2	64	256 ^b
<i>S. aureus</i>	IS	> 32	< 2	8	2	-
	CMI	8	> 512	2	256	8 ^c
<i>E. faecium</i>	IS	> 32	< 0,5	8	0,5	-
	CMI	64	> 512	4	> 256	< 1 ^c
<i>E. faecalis</i>	IS	4	0,5	4	< 0,5	-
	CMI	64	> 512	64	256	64 ^d
<i>P. aeruginosa</i>	IS	4	0,5	0,25	0,5	-

- L'activité antibactérienne du **Cx1** est maintenue sur des isolats cliniques multirésistants aux antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique.
- Le mécanisme d'action supposé du **Cx1**, au niveau de la paroi bactérienne, reste valable puisque les mécanismes de résistance des isolats cliniques n'ont eu aucune incidence sur son activité.
- Une étude complémentaire a été menée sur une large série de BMR avec une conservation de l'activité dans la quasi-totalité des cas.
 - 39 BMR Gram-positif (comme *S. aureus* et autres staphylocoques résistants ou sensibles à la méticilline).
 - 30 BMR Gram-négatif (comme entérobactéries productrices ou non de β -lactamase³⁵)

En conclusion :

- Pour des fonctions guanidiniums « libres » (non liées entre elles) : pas d'activité (**mCx1**).
- L'organisation spatiale contrainte des guanidiniums (**Cx1**) génère de très bonnes activités (comparables aux composés commerciaux), conservées sur souches multirésistantes.
- La plate-forme calixarène semble éviter l'apparition de toxicité cellulaire, vs. **HX** et **CHX**.

³⁵ Exemple le plus rencontré *E. coli*

V.2.4. Vers la détermination du mode d'action supposé du Cx1

Par comparaison aux autres molécules étudiées, le **Cx1** est donc apparu comme le composé conjuguant l'activité antibactérienne la plus intéressante et une quasi-absence de cytotoxicité. Cette molécule présente ainsi un intérêt thérapeutique potentiel, nous menant à évaluer son mode d'action, sur la base de notre postulat initial lié à des interactions électrostatiques dénaturantes entre le calixarène et la surface bactérienne.

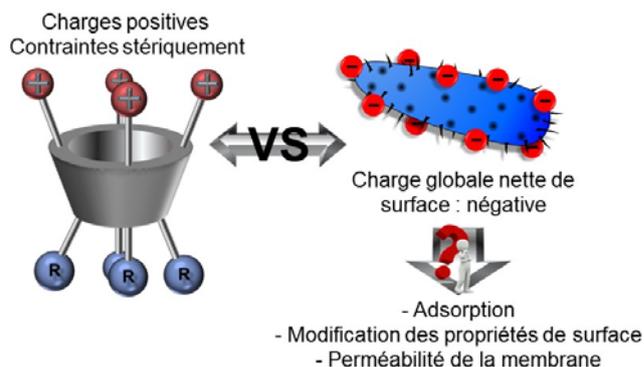


Figure V.6 : hypothèse principale de travail

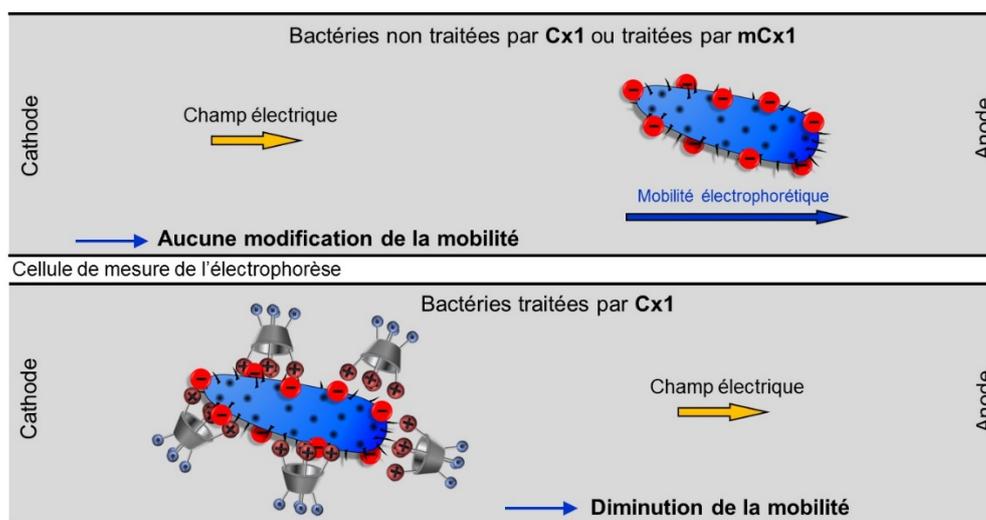
Etant donné que nous avons ciblé la paroi bactérienne, R. Duval initie une démarche permettant d'étudier les éventuels effets pariétaux de notre composé grâce à la micro-électrophorèse et à la microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy). Le couplage de ces deux méthodes permet d'obtenir une lecture macroscopique et nanométrique des propriétés de surface. Nous avons adapté ces deux techniques à notre étude, plus particulièrement sur *P. aeruginosa* ATCC 27853.

V.2.4.1. Microélectrophorèse

(En coll. avec LCPME³⁶ F. Gaboriaud / E. Dague)

Pathologie Biologie, 2007, 55, 465-477

Cette technique offre une évaluation globale des propriétés interfaciales des bactéries. La mobilité électrophorétique permet de renseigner sur des changements de perméabilité et/ou de densité de charges des structures externes des cellules. En effet la bactérie (de charge globale nette de surface négative) soumise à un champ électrique va se déplacer au sein d'un fluide pour rejoindre l'anode. Si la densité de charge à la surface de la cellule est modifiée alors sa vitesse de déplacement dans ce même champ s'en verra modifiée (Fig. V.7)



³⁶ Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement, UMR 7564, CNRS / Université de Lorraine

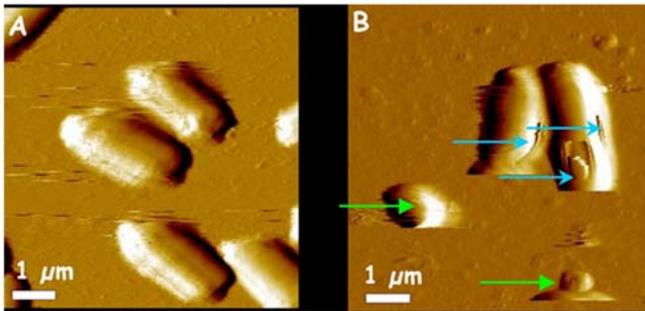
Ces expériences menées sur *P. aeruginosa* après 24h d'exposition à la drogue montrent une diminution significative de la mobilité électrophorétique, traduisant une forte augmentation du caractère perméable des parois et/ou une adsorption spécifique des calixarènes en surface → effet pariétal confirmé par cette technique.

V.2.4.2. Microscopie à Force Atomique

(En coll. avec LCPME, F. Gaboriaud / E. Dague puis avec le LAAS, E. Dague³⁷)

Pathologie Biologie, 2007, 55, 465-477

Scientific Reports, 2012, 2 : 575



Cette méthode peut permettre de visualiser les altérations des parois bactériennes suite au traitement par une drogue. Le principe de fonctionnement est basé sur la détection de forces intermoléculaires (capillaires, électrostatiques, Van der Waals, frictions...) s'exerçant entre une pointe et la surface de l'échantillon.

Figure V.8: images AFM obtenues en mode contact sur *P.*

aeruginosa.

A) non traitée ; B) traitée par Cx1 à 32 µg/mL pendant 24h

La 1^{ère} étude en AFM nous a apporté des informations complémentaires à celles obtenue en microélectrophorèse, grâce aux images enregistrées sur *P. aeruginosa* (Fig. V.8). Nous avons ainsi identifié des altérations de la paroi bactérienne après 24h de contact avec le Cx1 et une fragilité beaucoup plus importante au simple contact de la pointe AFM. Les cellules non traitées ou traitées par mCx1 ne présentent quant à elles aucune altération.

Dans un deuxième temps (*P. aeruginosa*³⁸), il a été réalisé une étude comparative entre ticarciline³⁹, tobramycine⁴⁰ (auxquels est résistante PaR3), et le Cx1. Une comparaison des effets causés par ces molécules à ceux causés par le Cx1, pourrait permettre de mieux comprendre son mécanisme d'action (Fig V.9)

Si l'aspect général des bactéries sensibles est bien modifié en présence de ticarcilline et tobramycine celui des résistantes ne l'est pas du tout. Par contre traitée par le Cx1 les deux souches présentent des altérations de la paroi (apparition de perforations et apparition d'inégalités de surface (passage de 0.2 ± 0.04 nm pour les bactéries non traitées à 1.0 ± 0.2 nm pour les cellules traitées par le Cx1)

³⁷ Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Toulouse

³⁸ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (souche de référence) PaR3 (souche multirésistante à la plupart des antibiotiques)

³⁹ Ticarciline (bêtalactamines) : groupe des carboxypénicillines. Inhibition de la synthèse du peptidoglycane. Actif sur *P. aeruginosa*.

⁴⁰ Tobramycine (aminosides) : inhibe la synthèse protéique par liaison à la sous-unité ribosomale 30S, altérant ainsi la perméabilité de la membrane cellulaire, entraînant la rupture progressive de l'enveloppe cellulaire.

Les résultats ont également montré que sur la souche résistante de *P. aeruginosa*, le **Cx1** avait un effet radical sur l'élasticité de la paroi, ce qui n'est pas le cas suite à un traitement par les antibiotiques de référence. Par exemple la souche résistante PaR3 voit son module d'élasticité passer de 520 ± 100 kPa à 300 ± 66 et 252 ± 61 kPa après traitement par la ticarcilline et la tobramycine respectivement. Si cette élasticité décroît de manière raisonnable avec ces deux principes actifs, elle chute de manière dramatique lors du traitement par le **Cx1** (76 ± 28 kPa)

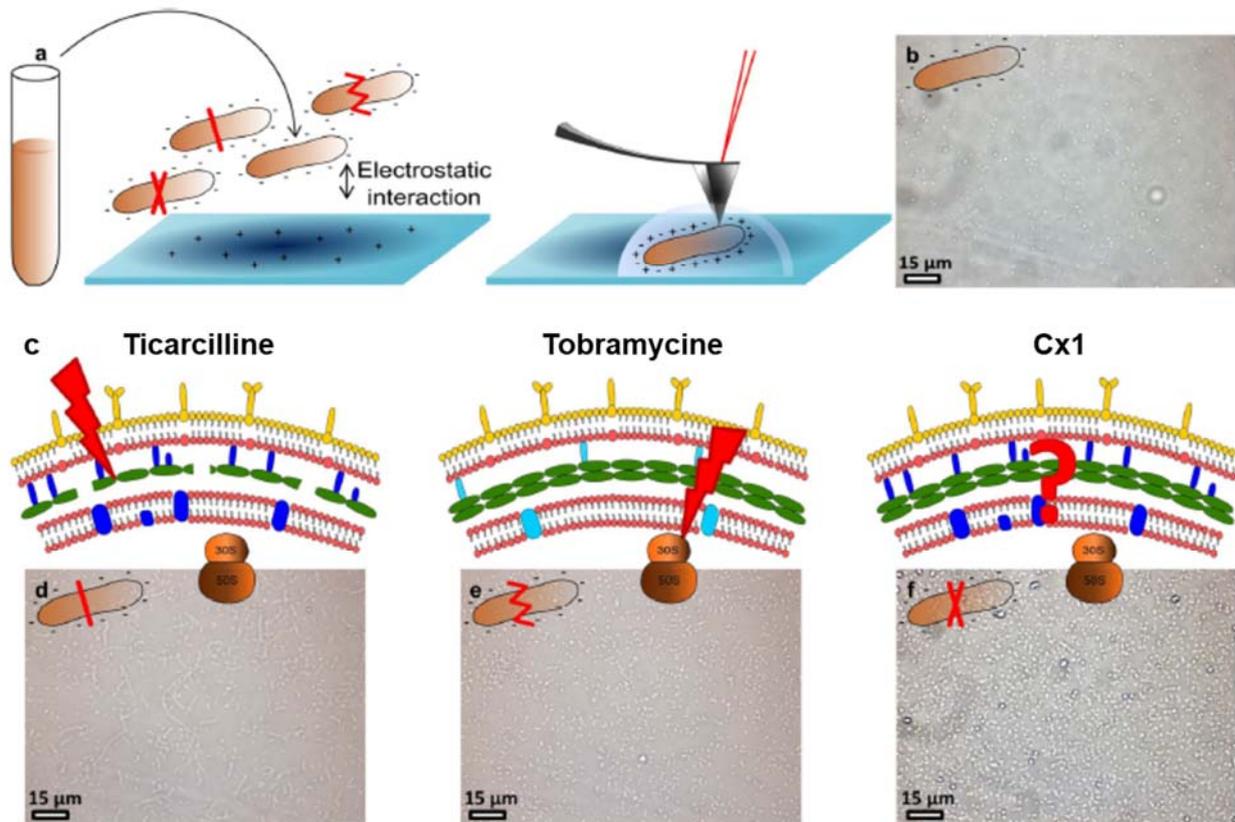


Figure V.9 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour étudier le mécanisme d'action du **Cx1**. a) cellules cultivées pendant 20h à 35°C et immobilisées sur lame fonctionnalisées avec du polyéthylémine. b) image optique de la surface de la lame immobilisée de *P. aeruginosa* (non traitées). c) Molécules utilisées dans cette étude. d) e) et f) images optiques de *P. aeruginosa* traitées respectivement par la ticarcilline (4 µg/mL), la tobramycine (0,25 µg/mL) et le **Cx1** (32 µg/mL). Reproduit depuis ⁴¹

Il y a donc bien déstabilisation de la paroi bactérienne. Pour aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'action, la paroi des cellules traitées a été sondée à l'aide d'une pointe AFM fonctionnalisée par de la concanavalline A⁴², une lectine qui se lie aux sucres présents à la surface. Cette expérience a révélé que la lectine était capable de déplier une molécule de 6 µm de long, et ce uniquement dans le cas de bactéries traitées par le **Cx1**.

D'autres expériences menées sur bicouches phospholipidiques ont montrées que notre structure créait des perforations dans ces dernières (0,5 à 1 µm de diamètre), rejoignant les observations faites sur les cellules traitées par le **Cx1**.

Le **Cx1** causerait ainsi une déstabilisation importante de la paroi des bactéries (diminution du module de d'élasticité, déploiement de longues molécules, perforations observées à la surface des

⁴¹ Dague E. et al., *Scientific Reports*, 2012, 2 : 575

⁴² Concanavalline A (ConA) : une glycoprotéine de la famille des lectines. Elle se lie spécifiquement par affinité au D-mannose et au D-glucose.

cellules), et est capable de perforer des membranes phospholipidiques de même composition que la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Ces perforations donnent alors accès à la pointe fonctionnalisée à une molécule longue située sous la membrane externe ; cette molécule peut possiblement être le peptidoglycane, ce qui pourrait expliquer le fait que cette molécule soit déployée sur de si longues distances.

Ces premières études montrent très clairement un effet sur la paroi bactérienne avec modifications des propriétés de surface, altération de la paroi avec perte de perméabilité.

V.2.4.3. Effets sur modèles de membranes et étude par simulation de dynamique moléculaire

Soft Matter, 2016, 12, 181-190

Nous avons récemment étudié le comportement du **Cx1** et de son monomère constitutif **mCx1** face à des modèles de membranes lipidiques (monocouches) par simulation de dynamique moléculaire et mesure de la pression de surface. Les études ont été menées sur monocouches formées avec DMPC⁴³ et DMPS⁴⁴ (Fig V.10). La DMPC zwitterionique et la DMPS chargée négativement ont été utilisées comme modèles lipidiques correspondant aux membranes de cellules eucaryotes et de cellules bactériennes respectivement.

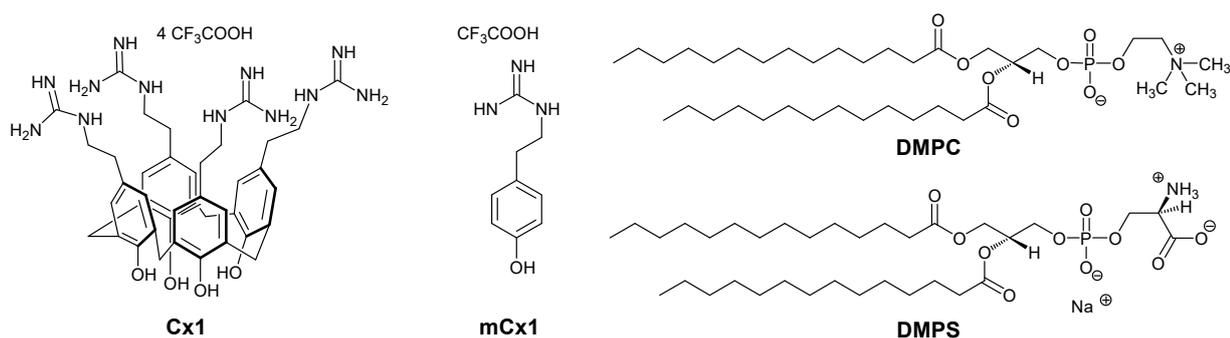


Figure V.10 : Structures des composés utilisés dans l'étude par simulation de dynamique moléculaire et mesure de pression de surface.

Concernant les études de pression de surface, les isothermes de compression montrent une nette différence entre les deux modèles de monocouche étudiés avec un impact significatif sur DMPS notamment pour le **Cx1** (Fig V.11). Les courbes d'isotherme sont tout à fait superposables dans le cas de DMPC. Un shift important de l'isotherme est observé dans le cas du **Cx1** face à la monocouche chargée négativement. De plus la transition Liquide Expansé (LE) – Liquide Compressée (LC) observée sur l'eau pure disparaît en présence de **Cx1**, ceci montre que le film lipidique anionique est moins stable qu'en présence d'eau pure ou de **mCx1**. La diminution des valeurs de pression de surface au point de collapse confirme bien une monocouche moins stable. Les valeurs tirées des isothermes de compression pourraient être dues à des interactions électrostatiques entre le **Cx1** chargé positivement et les lipides chargés négativement. Les interactions charges-charges sont responsables d'une adsorption et incorporation d'un grand nombre de molécule de **Cx1** dans la monocouche lipidique. Cet

⁴³ 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

⁴⁴ 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-L-sérine

effet pourrait être facilité par l'hydrophobicité de la couronne hydroxylée du calixarène (OH engagés dans un réseau de liaisons hydrogène). Ceci pourrait permettre au **Cx1** de pénétrer dans la monocouche *via* sa partie hydrophobe et d'y rester associé même à forte compression, justifié par l'augmentation de l'air moléculaire (plus de molécules par unité de surface). Dans les mêmes conditions le **mCx1** est expulsé de la bi-couche.

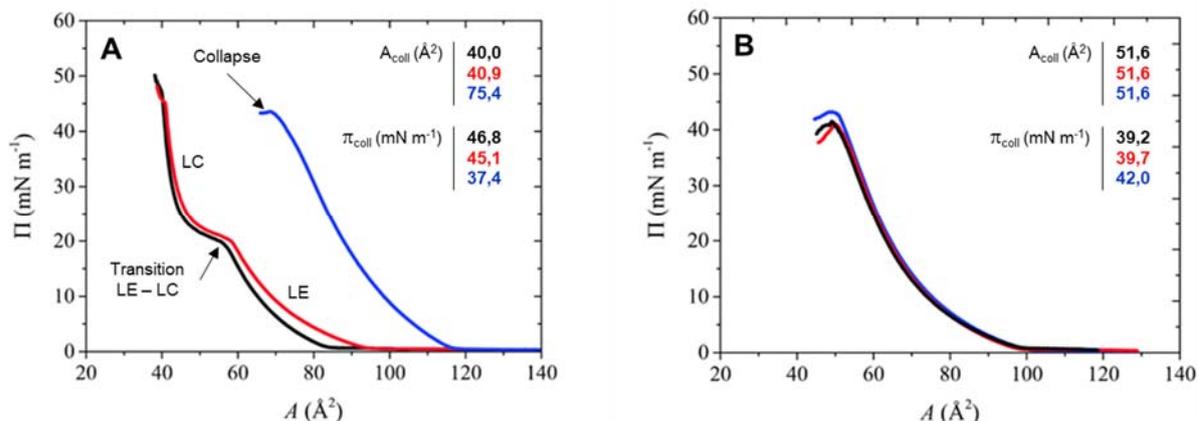


Fig V.11 : Isothermes de compression de monocouches de DMPS (A) et DMPC (B) déposées sur : eau pure (noire), solution de **Cx1** à 4 mg/L (bleue), solution de **mCx1** à 3,8 mg/L (rouge). $T = 37^\circ\text{C}$. Concentration molaire de **mCx1** 4 fois plus importante que celle de **Cx1**, de manière à obtenir la même concentration molaire en fonction guanidinium.

Concernant la simulation de dynamique moléculaire (Fig V.12) : **Cx1** et **mCx1** sont clairement accumulés au niveau de la monocouche de DPMS, sans doute grâce aux interactions électrostatiques (non observé dans le cas de DMPC). Ces études montrent également un retournement des molécules de **Cx1** pour une interaction supplémentaire de leur couronne hydroxylée hydrophobe avec la phase lipidique.

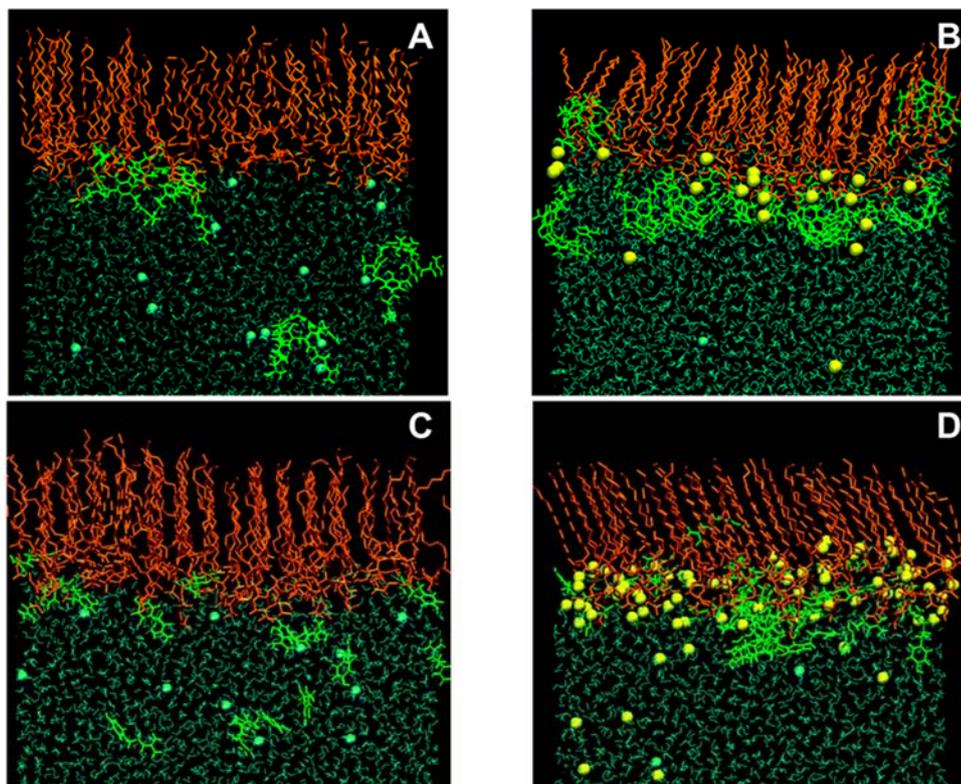


Fig V.12 : plan xy de DMPC (A-C) et DMPS (B-D) en monocouche sur solution de **Cx1** (A-B) et **mCx1** (C-D). Orange, vert, bleu et jaune représentent respectivement les phospholipides, le **Cx1** (ou **mCx1**), Cl⁻ et Na⁺.

En conclusion :

- AFM et Microélectrophorèse semblent nous conforter dans notre hypothèse de départ, à savoir une probable atteinte pariétale des bactéries mettant en jeux des interactions électrostatiques.
- Concernant les études de pressions de surface et de simulation de dynamique moléculaire ; bien qu'aucun effet n'ait été démontré sur le modèle (zwitterionique) de membrane de cellule eucaryote, le modèle (anionique) de membrane cellulaire bactérienne est significativement affecté en présence de **Cx1**. Au-delà du fait que les interactions charge-charge jouent un rôle important dans l'adsorption sur les têtes phospholipidiques chargées négativement, entraînant une accumulation de molécules à ce niveau, il semblerait que le **Cx1** pénètre également dans la partie hydrophobe de la monocouche, notamment *via* de son bord inférieur hydrophobe. Une inversion de l'orientation du *tétra*-guanidinium lors de la pénétration dans la couche lipidique, minimisant les interactions néfastes, pourrait également jouer un rôle dans l'activité antibactérienne démontrée.

V.2.5. Famille dérivé du Cx1

V.2.5.1. Synthèse des dérivés bis-hétérocycliques

Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2009, 17, 5496-5509

Nous avons dans cette famille de composés chargés positivement réalisé la synthèse de nouveaux composés hydrosolubles (cyclotétramères et monomères)

Le développement de cette nouvelle drogue (**Cx1**) et les résultats très positifs en découlant nous ont permis d'envisager l'ouverture vers des composés dérivés de cette dernière. Si notre première hypothèse semble vérifiée quand à une action au niveau de la paroi par effet (au moins) électrostatique, notre seconde hypothèse reposait sur le fait que des composés amphiphiles pourraient permettre une insertion désorganisant dans la paroi bactérienne. Nous avons ainsi en ce sens, très tôt dans notre programme, développé une première série de composés porteurs de groupement bis-hétérocycliques : bipyridine et bithiazole. Ces entités ont été choisies pour :

- Leur hydrophobie.
- Leur capacité complexante : (notamment bipyridine). En effet la couronne calixarénique permet d'orienter dans l'espace deux entités bis-hétérocycliques et offre un environnement idéal à différents métaux. Nous souhaitons ainsi utiliser la capacité de ces unités à complexer des ions métalliques nécessaires à la multiplication bactérienne (métalloenzymes) ou bien la genèse de complexes métallique toxiques pour la cellule bactérienne.
- Leur capacité de fluorescence : (notamment bithiazole⁴⁵).

En ce sens nous avons développé la famille de composés suivants (Fig. V.13) dérivés du leader **Cx1** et fonctionnalisés en position 1,3 sur la couronne basse à l'aide des synthons 6-bromométhyl-6'-

⁴⁵ $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 386 \text{ nm}$

méthyl-2,2'-bipyridine (bromo-**bpy- α**), 5-bromométhyl-5'-méthyl-2,2'-bipyridine (bromo-**bpy- β**) ou 4-bromométhyl-4'-méthyl-2,2'-bithiazole (bromo-**btz**).

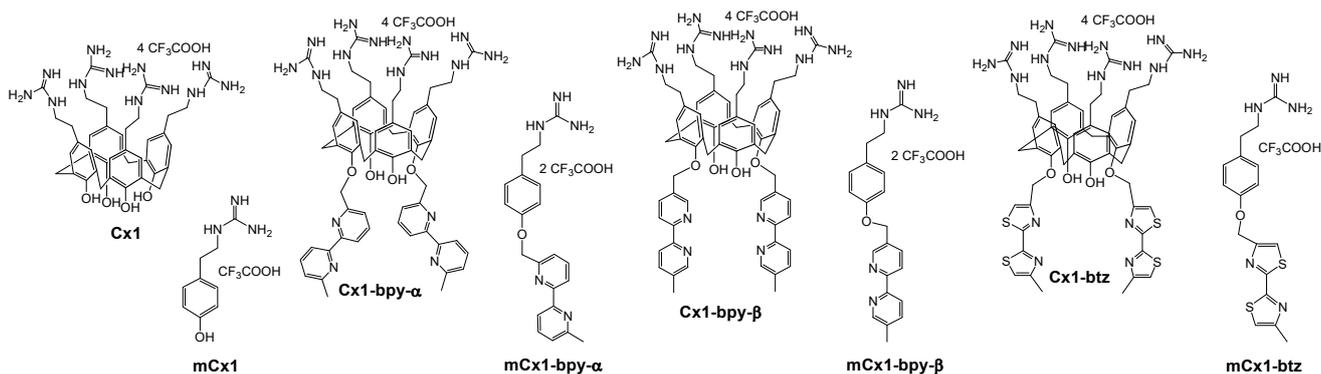


Figure V.13 : Principaux composés chargés positivement de cette étude : calixarènes et monomères analogues

Les essais de greffage direct sur la plate-forme **Cx1** protégée (octa-boc) se sont soldés par des échecs, certainement dû à une instabilité ou une réactivité particulière de la guanidine protégée face aux dérivés bromés engagés dans la réaction. Le greffage a donc été réalisé en amont sur la structure *tétra*-boc-amino-éthyle dans des conditions alcalines permettant la bis substitution en 1,3 (Fig. V.14). Nous obtenons ainsi les dérivés **bpy- α** , **bpy- β** et **btz**, lesquels sont convertis en composés guanidinium par : i. déprotection à l'aide de TFA ; ii. guanidilation à l'aide de triflyl-diboc-guanidine ; iii. déprotection finale dans des conditions acides conduisant aux dérivés **Cx1-bpy- α** , **Cx1-bpy- β** et **Cx1-btz** (Fig. V.14)

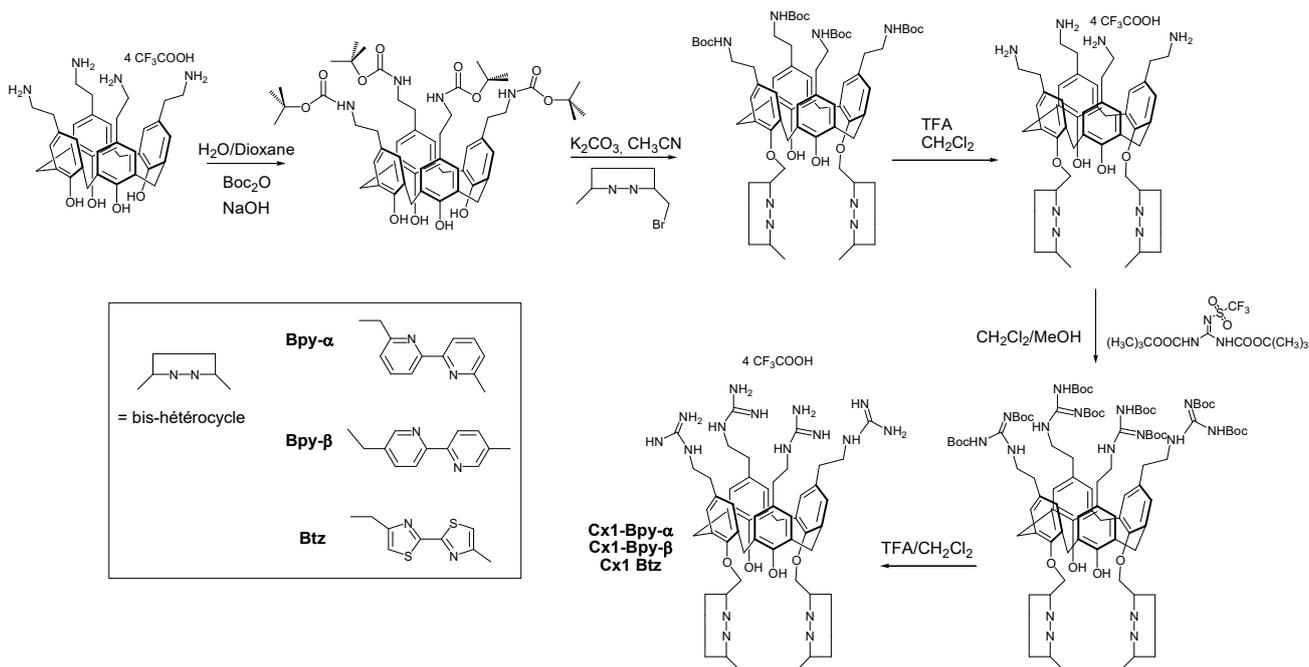


Figure V.14 : voie d'accès aux dérivés guanidiniums bis-hétérocycliques

Exactement de la même manière que précédemment nous avons dans cette famille développé les pendants monomériques afin de confirmer, là encore, l'intérêt du passage sur la plate-forme calixarène. Les trois nouvelles structures monomériques sont présentées *figure V.13*, et ont suivi une voie d'obtention similaire à celle décrite pour le macrocycle.

V.2.5.2. Résultats

A l'instar du dérivé **Cx1** nous avons effectué des déterminations de CMI sur souches standards (*Tableau V.4*), afin de vérifier notre hypothèse quant à une activité supplémentaire apportée par les groupements hydrophobes et complexants. La toxicité a également été mesurée en parallèle (*Tableau V.4*).

Tableau V.4 : CMI, CI₅₀ en µg/mL et IS (CI₅₀ à 24h / CMI) vis-à-vis de souches de référence ATCC du **Cx1**, **mCx1**, **Cx1-Bpy-α**, **mCx1-Bpy-α**, **Cx1-bpy-β**, **mCx1-bpy-β**, **Cx1-btz** et **mCx1-btz**.

		Cx1	mCx1	Cx1-bpy-α	mCx1-bpy-α	Cx1-bpy-β	mCx1-bpy-β	Cx1-btz	mCx1-btz
	CI₅₀ 24h	> 256	> 256	16-32	32-64	> 128	> 128	16-32	64-128
	CI₅₀ 48h	> 256	> 256	16-32	16-32	> 128	> 128	16-32	32-64
	CI₅₀ 48h	256	32-64	16-32	2-4	nd	nd	16-32	8-16
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	4	512	16	128	32	8	16	64
	IS	> 64	> 0.5	1-2	0.25-0.5	> 4	16	1-2	1-2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CMI	32	> 512	16	128	32	128	16	128
	IS	> 8	0.50	1-2	0.25-0.5	> 4	> 1	1-2	0.5-1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	8	512	16	16	8	8	8	16
	IS	> 32	> 0.5	1-2	2-4	> 16	> 16	2-4	4-8
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	8	512	16	8	8	4	16	8
	IS	> 32	> 0.5	1-2	4-8	> 16	> 32	1-2	8-16
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	32	> 512	16	64	8	64	8	64
	IS	> 8	0.5	1-2	0.5-1	> 16	> 2	2-4	1-2

- Les calixarènes bis-hétérocycliques conservent une activité de l'ordre du micromolaire, proche de celle du dérivé non substitué de référence.
- Malheureusement l'introduction de bras bipyridylés ou bithiazolés ne semble pas apporter une modification significative du comportement anti-bactérien.
- En parallèle, au niveau de la toxicité cellulaire il s'avère que l'apport des fonctions bis-hétérocycliques se solde par l'apparition d'une forte toxicité notamment pour les dérivés **Cx1-Bpy-α** et **Cx1-btz** avec des toxicités de l'ordre de 16 µg/ml, beaucoup trop proche du domaine d'activité. L'impact de ces composés sur les cellules eucaryotes est donc très proche de celui rencontré avec l'antiseptique de référence **hexamidine**.
- Par contre les entités monomériques, contrairement au monomère originel **mCx1**, changent drastiquement de comportement face aux souches bactériennes. En effet ceux-ci acquièrent une très bonne activité, parfois très intéressante, notamment sur *S. aureus* et sur *E. coli* ou l'on passe d'une CMI de 512 µg/mL pour le **mCx1** à 4 µg/mL pour le dérivé **mCx1-bpy-β** par exemple. Si le **mCx1** est dépourvu d'activité mais également de toxicité, les dérivés fonctionnalisés par les bis-hétérocycles acquièrent également une certaine toxicité, proche des entités calixaréniques correspondantes.
- Sur l'ensemble de cette nouvelle famille la détermination des indices de sélectivité n'est pas très positive car quasiment toujours inférieurs à 10. Le composé **Cx1-bpy-β** semble être le plus intéressant de la série.

En conclusion :

- L'insertion de groupements hydrophobes et complexant (bis-hétérocycles) sur la plateforme calixarénique ne se traduit pas par une augmentation d'activité antibactérienne.
- Pourtant elles confèrent aux dérivés monomériques de très bonnes activités (cible d'action ?).
- Ces mêmes groupements sont responsables de cytotoxicité à de faibles concentrations bien souvent proches des concentrations actives.

V.2.6. Développement des études d'activité : sur le bacille de la tuberculose

L'ensemble de nos travaux visant la tuberculose sont issus d'une collaboration avec les Dr. M. Daffé et P. Constant du Département Tuberculose & Biologie des Infections, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de l'UMR 5089 à l'Université de Toulouse.

Bioorganic and Medicinal Chemistry **2012**, 20 (6), 2035-2041

V.2.6.1. Contexte

Forts de nos résultats précédents nous avons entamé une étude de certains de ces composés sur une souche particulière : *Mycobacterium tuberculosis*.

La résurgence de la tuberculose (TB) à la fin du 20^{ème} siècle avec environ 10 millions de nouveaux cas en 2017, associé à environ 1,6 millions de morts, replace ce bacille en premier plan des infections à combattre⁴⁶. La propagation rapide des personnes immunodéficientes (infection par le HIV) et l'augmentation des risques de résistance aux drogues couramment utilisées font de *M. tuberculosis* un problème majeur de santé publique. En effet cette maladie infectieuse et contagieuse aéroportée est, après le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), la seconde cause de décès à travers le monde. Si comme pour les infections nosocomiales, des actions contre cette infection se font d'abord par des programmes de prévention et d'hygiène, elle requiert le développement de programmes de recherche dédiés. Pour tenter de faire face à la résistance (voir multi-résistance) du bacille tuberculeux aux substances actives de première intention (INH, rifampicine) nous avons choisi d'inclure certains de nos composés dans une investigation concernant leurs éventuelles activités antimycobactérienne.

Une première série de 17 composés a été testée sur souche H37Rv sensible à l'INH. Nous avons évalué l'activité de dérivés anioniques (9 produits, carboxylés, phosphonés ou sulfonés en couronne haute et pour chacun fonctionnalisés ou non par des bis-hétérocycles bipyridine ou bithiazole) (Fig. V.15)

⁴⁶ <http://www.who.int/tb/en/>; WHO Global Tuberculosis Report **2018**

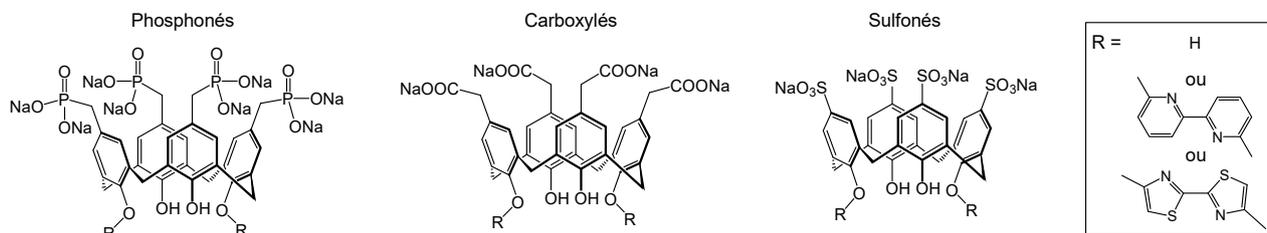


Figure V.15: famille de dérivés anioniques bis-hétérocycliques

Comme il l'a déjà été démontré au niveau des activités sur les souches de référence (Gram positive et négative), il s'avère que les composés chargés négativement ne possèdent que très peu d'activité (CMI > 50 μ M).

Une autre famille de 8 dérivés (Fig. V.16), cette fois-ci chargés positivement, a également été testée. Ce sont des composés ammoniums (Cx2 et dérivés figure V.16) et guanidiniums (Cx1 et dérivés figure V.16), chacun étant di-fonctionnalisé ou non en couronne basse (par des bis-hétérocycles).

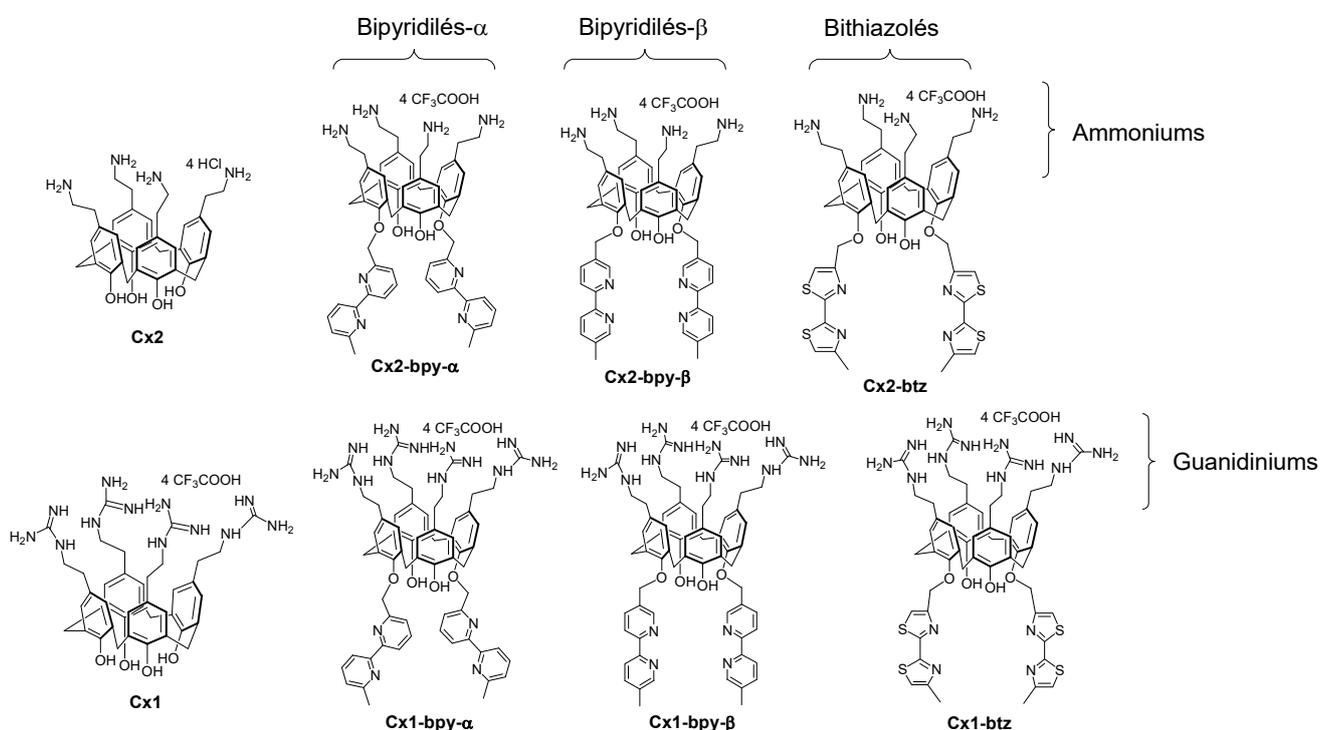


Figure V.16: Famille de dérivés cationiques bis-hétérocycliques

V.2.6.2. Résultats

Les premiers tests ont été réalisés sur la souche standard H37Rv (sensible à l'INH) et la souche MYC5165 (résistante à l'INH)

Dans un premier temps il a été déterminé le pourcentage d'inhibition (à 10 et 1 μ M) sur les dérivés anioniques non substitués et sur la totalité des cationiques. Nous en avons retiré :

- Dans la famille des anioniques : pas d'activités intéressantes.
- Dans la famille des ammoniums : les dérivés α -bipyridylés et bithiazolés présentent peu d'activité avec de faibles % d'inhibition (0 et 19% à 10 μ M respectivement). Le dérivé non

substitué présente une activité inhibitrice intéressante : 76% d'inhibition à 10 μM de concentration et 27% d'inhibition à 1 μM , tandis que le dérivé β -bipyridylé présente des propriétés inhibitrices élevées aux deux concentrations (*ca.* 81% à 10 μM et *ca.* 63% à 1 μM).

- Dans la famille des guanidiniums : un comportement similaire a été observé, avec un manque d'activité pour le dérivé α -bipyridylé qui affiche 10% à 10 μM . Le dérivé non substitué (**Cx1**) le bithiazolylé et le β -bipyridylé présentent tous une activité élevée à la concentration de 10 μM , avec *ca.* 90% à 98% d'activités inhibitrices.

Nous avons ensuite étudié plus précisément les dérivés présentant un intérêt avec la détermination des CMI (*Tableau V.5*)

Tableau V.5 : CMI, CI_{50} en $\mu\text{g}/\text{mL}$ et IS (CI_{50} à 24h / CMI) vis-à-vis de souches des référence H37Rv et MYC5165 pour les dérivés **Cx2**, **Cx1**, **Cx2-bpy- α** , **Cx1-bpy- α** , **Cx2-bpy- β** , **Cx1-bpy- β** , **Cx2-btz** et **Cx1-btz**.

		Cx2	Cx1	Cx2-bpy-α	Cx1-bpy-α	Cx2-bpy-β	Cx1-bpy-β	Cx2-btz	Cx1-btz
	CI_{50} 24h	> 256	> 256	16-32	32-64	> 128	> 128	16-32	64-128
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	CMI	2.58	1.0	nd	nd	1.34	1.51	nd	2.69
	IS	> 100	> 256	nd	nd	> 95	> 85	nd	> 24
<i>M. tuberculosis</i> MYC5165	CMI	2.6	1.0	nd	nd	2.7	0.75	nd	0.17
	IS	> 100	> 256	nd	nd	> 47	> 170	nd	> 375

- Les dérivés ammoniums, nu et bipyridylés, affichent des activités intéressantes avec des valeurs de CMI de 2,58 et 1,34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement pour **Cx2** et **Cx2-bpy- β** sur H37Rv.
- L'introduction des groupes guanidiniums augmente les CMI avec des valeurs de 1,0, 1,51, 2,69 et $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement pour **Cx1**, **Cx1-bpy- β** et **Cx1-btz** sur H37Rv. En comparaison les composés antimycobactériens commerciaux présentent des CMI de 0,08, 2,0 et 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour l'isoniazide, l'éthambutol et la streptomycine respectivement.

L'émergence de souches de *M. tuberculosis* multi-résistantes (TB-MR-isoniazide/INH et rifampicine) devient un problème sérieux. Pour cette raison, nous avons décidé de tester les dérivés les plus actifs contre la souche MYC5165 résistante à l'INH. Là encore ces cinq composés précédents présentent de très faibles valeurs de CMI, la plupart sub-micromolaires, tandis que INH est actif à 1,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En effet les composés guanidiniums nus **Cx1**, β -bipyridilés **Cx1-bpy- β** et bithiazolés **Cx1-btz** sont responsables de CMI remarquables de 1,0, 0,75 et 0,17 et $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement (*Tableau V.5*).

Outre le fait que nous confirmons l'absence d'activité suffisante concernant les dérivés chargés négativement, les dérivés cationiques bis-hétérocycliques correspondants se trouvent être très actif sur *M. tuberculosis*. La structure externe de cette souche particulière est très différente de celle des souches standards étudiées jusqu'à présent, il nous est donc, à l'heure actuelle, difficile d'émettre une hypothèse quant au mécanisme d'action. Même si seuls les dérivés chargés positivement semblent posséder une activité, une simple interaction électrostatique conduisant à un effet délétère, n'est sans doute pas si simple à envisager du fait que l'enveloppe externe est ici beaucoup plus complexes (présence par exemple d'acides mycoliques cireux (C_{60} environ)).

En conclusion :

- Sur ces souches particulières de *M. tuberculosis*, seuls les dérivés chargés positivement sont encore une fois actifs.
- Nous confirmons une importance particulière de la fonction guanidinium vs ammonium.
- De la même manière que sur les souches standards, l'apport de fonctions bis-hétérocycliques n'entraîne pas un gain d'activité significatif vs les plateformes actives non substituée.
- Néanmoins selon le type de bis-hétérocycle les résultats diffèrent :
Avec l' α -bipyridine : extinction de l'activité. A une concentration de 10 mM, le % inhibition passe de 76 à 0 pour les dérivés ammoniums et de 97 à 10 pour les guanidiniums. Alors que le % d'inhibition reste du même ordre avec la β -bipyridine.
- Le point capital est la conservation de l'activité de nos dérivés sur la souche résistante à l'IHN. Nous avons d'excellentes activités (sub-micromolaire) avec trois de nos dérivés.

V.2.7. Développement d'une famille de dérivés linéaires

Brevet : (PCT/FR2009/051388) et (WO/2010/004231)

V.2.7.1. Contexte

En parallèle au développement de ces familles calixaréniques, nous avons cherché à développer d'autres types de structures, permettant une orientation et une contrainte spatiale différente pour les fonctionnalités actives.

La stratégie de mise au point est restée basée sur les interactions électrostatiques entre des charges positives et la surface chargée négativement de la bactérie. Nous avons donc choisi l'incorporation du même type de fonctionnalité, à savoir guanidinium, les seules modifications que nous apportons se situent au niveau du squelette organisateur.

Lors de la détermination des activités de nos structures nous avons utilisé divers composés actifs de référence, notamment la chlorhexidine. Celle-ci est rencontrée dans diverses préparations pharmaceutiques et utilisée comme agent antiseptique/désinfectant. Nous avons choisi cette structure de par la présence des fonctions cationiques se rapprochant ainsi de nos dérivés. Nous avons donc tenté le développement de structures linéaires, comme l'est la chlorhexidine, et présentant en bout de chaîne des monomères de calixarène, à savoir le **mCx1**.

Si l'intérêt de cette démarche se trouve dans une augmentation de nos données en termes de relation structure-activité, elle est aussi dans la recherche de nouveaux dérivés antiseptiques et/ou désinfectants.

Pourquoi rechercher de nouveaux composés de ce type :

- Bien qu'il existe de nombreux composés possédant ce type de propriétés, l'émergence de phénomènes de résistances a déjà été observée.
- L'utilisation en quantité parfois importante d'antiseptique (lutte contre les IN ou traitement des grands brûlés) génère l'apparition de résistances croisées entre désinfectants/antiseptiques et antibiotiques et pourraient limiter encore plus l'utilisation de certains antibiotiques.

- Bien que la fréquence de résistance acquise des antiseptiques et désinfectants soit plus faible que celle des antibiotiques⁴⁷ ils requièrent tout de même une attention particulière et un champ de recherche dédié.
- La multiplication des BMR, en ville ou à l'hôpital, on l'a dit, est un problème majeur de santé publique. Si des programmes de soins et préventions sont mis en place, une des premières barrières de lutte est d'en limiter leur propagation. En première ligne des voies de dissémination des microorganismes nous pouvons bien entendu citer les surfaces vivantes et inertes. Et c'est là qu'interviennent respectivement les antiseptiques et les désinfectants.

En nous basant sur les résultats obtenus sur la thématique « calixarènes antibactériens » et plus particulièrement sur les principaux composés de référence que nous avons utilisés : synthaline, hexamidine, chlorhexidine..., nous avons été amené à considérer tout un ensemble de molécules « linéaires » de type « bis-guanidino-alkanes » (apparentés à la synthaline) et « bis-amidino-phenoxy-alkanes » (apparentés à l'hexamidine) (Fig. V.17); et ainsi élargir le champ de nos recherches à toute une famille d'analogues structuraux.

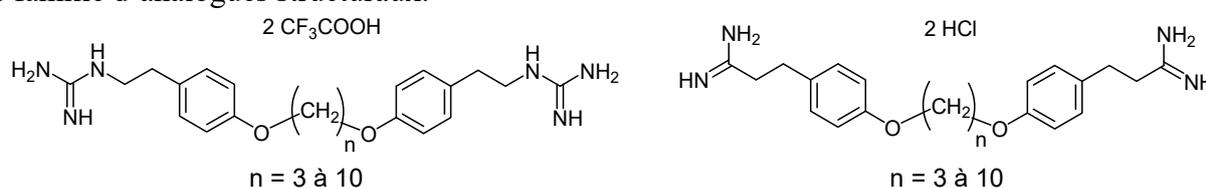


Figure V.17: Composés hydrosolubles développés pour cette étude

La synthèse de ces deux familles est résumée dans les schémas suivants (Fig. V.18 et V.19)

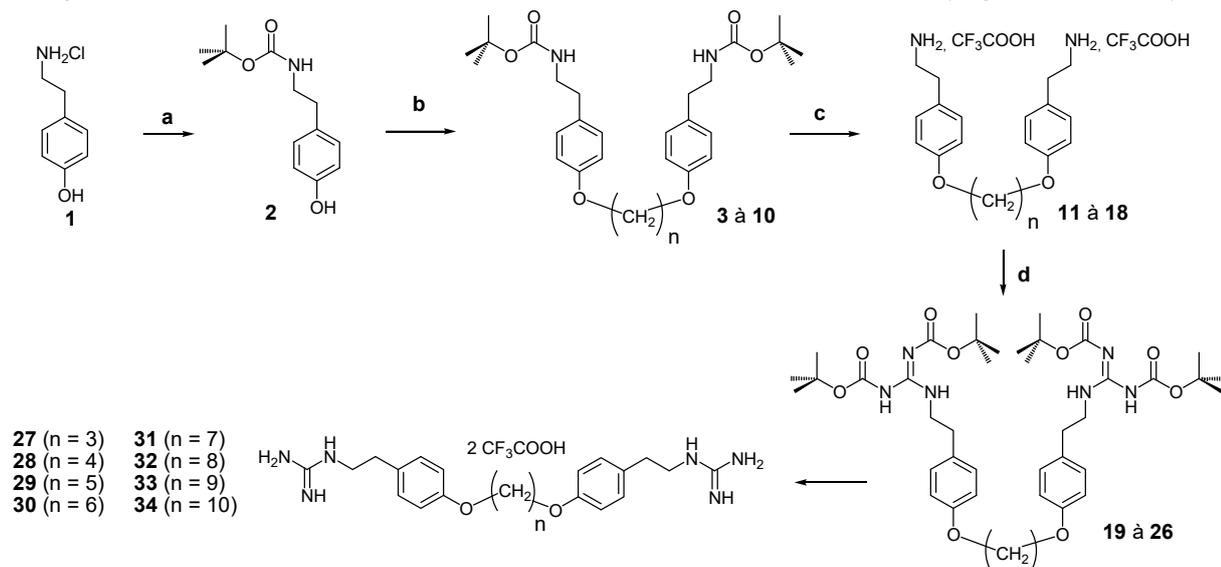


Figure V.18 : stratégie de synthèse des dérivés linéaires guanidiniums

- a)** (Boc)₂O, NaOH, H₂O, 35°C, ca 2 h; **b)** Br(CH₂)_nBr, K₂CO₃, MeCN, reflux, Ar, 48 h; **c)** CH₂Cl₂, TFA, rt, 3-4 h; **d)** N₁,N₂-(di-Boc)-N₃-triflylguanidine, NEt₃, CH₂Cl₂, MeOH, rt, 3-5 h; **e)** CH₂Cl₂, TFA, rt, 3-5 h.

⁴⁷ Du fait que les antiseptiques/désinfectants agissent souvent sur plusieurs cibles

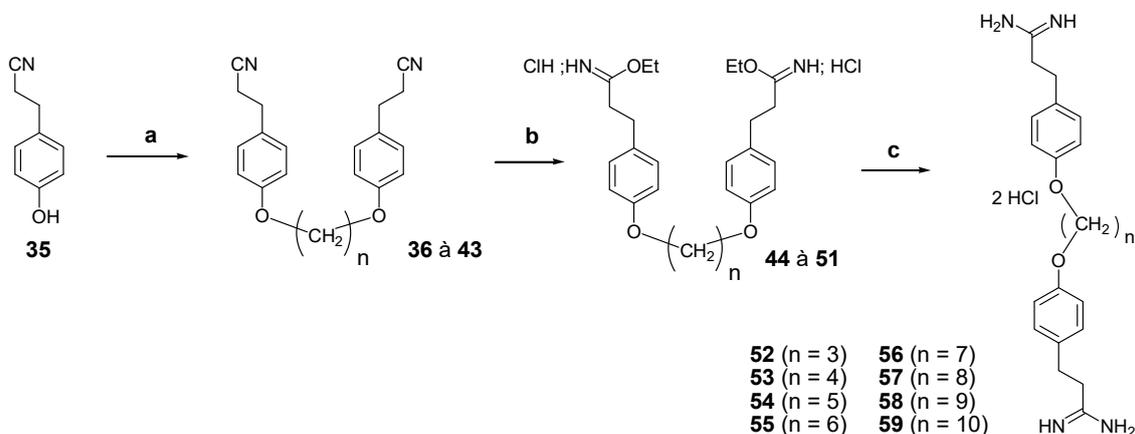


Figure V.19 : stratégie de synthèse des dérivés linéaires amidiniums
 a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{Br}$, K_2CO_3 , MeCN, reflux, Ar, 48 h; b) HCl_g , 2h, 0°C ; c) NH_3_g , 1,5h, reflux 6h.

L'obtention des dérivés guanidiniums (Fig. V.18) s'est fait simplement en utilisant un synthon déjà développé au laboratoire, le **mCx1** fixé de part et d'autre d'un chaînon alkyle. La tyramine commerciale est protégée sous forme de carbamate avant d'être, *via* substitution nucléophile, fixée sur les dérivés bis-halogènes. Les bis-éthers obtenus voient leurs fonctions amines déprotégées en milieu acide puis guanidilées à l'aide de la N_1, N_2 -(di-Boc)- N_3 -triflylguanidine. Un traitement acide final permet l'obtention de la série de dérivés linéaires guanidinium.

Les analogues amidiniums utilisent une stratégie relativement équivalente (Fig. V.19). La première étape implique le *para*-propionitrile phénol (Obtenu par mise en réaction de phénol, acrylonitrile, AlCl_3 et HCl_g) à la place du **mCx1**. Les bis-nitriles, par bullage de HCl dans l'éthanol, sont convertis en bis-imidates, lesquels par un traitement à l'ammoniac gazeux conduisent aux bis-amidinium attendus.

V.2.7.2. Résultats

L'ensemble des résultats obtenu en microbiologie est présenté dans les *tableaux* V.6 et V.7 pour les dérivés guanidiniums et amidiniums respectivement.

Tableau V.6 : CMI, CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$ et IS (CI_{50} à 24h / CMI) vis-à-vis de souches de référence ATCC des composés linéaires guanidiniums : 27: propyle; 28: butyle 29: pentyle; 30: hexyle; 31: heptyle; 32: octyle; 33: nonyle; 34: decyle.

		mCx1	27	28	29	30	31	32	33	34	CHX	HX
	CI₅₀ 24h	> 256	nd	nd	8	8	4	4	2	2	16	32
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	> 256	32	32	64	4	4	<1	1	<1	0.25	8
	IS	1	-	-	0,12	2	1	> 4	2	> 2	64	4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CMI	> 256	64	64	2	16	16	2	4	8	8	32
	IS	1	-	-	4	0,5	0,25	2	0,5	0,25	2	1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	> 256	4	2	<1	0.5	1	<1	0.25	<1	0.5	4
	IS	1	-	-	> 8	16	4	> 4	8	> 2	32	8
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	> 256	2	1	nd	0.25	1	nd	0.25	<1	0.5	<1
	IS	1	-	-	-	32	4	-	8	> 2	32	> 32
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	> 256	128	64	<1	8	8	<1	1	<1	2	2
	IS	1	-	-	> 8	1	0,5	> 4	2	> 2	8	16

Tableau V.7 : CMI, IC₅₀ en µg/mL et IS (CI₅₀ à 24h / CMI) vis-à-vis de souches de référence ATCC des composés linéaires amidiniums :52: propyle; 53: butyle 54: pentyle; 55: hexyle; 56: heptyle; 57: octyle; 58: nonyle; 59: decyle.

	mCx1	52	53	54	55	56	57	59	59	CHX	HX	
	CI ₅₀ 24h	> 256	nd	nd	nd	nd	4	2	2	16	32	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	> 256	128	64	128	32	64	32	4	4	0.25	8
	IS	1	-	-	-	-	0,12	0,5	0,5	64	4	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CMI	> 256	128	64	128	32	16	16	16	8	32	
	IS	1	-	-	-	-	0,25	0,12	0,12	2	1	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	> 256	32	2	<1	4	8	2	<1	1	0.5	4
	IS	1	-	-	-	-	2	> 2	2	32	8	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	> 256	32	2	nd	2	4	4	nd	<1	0.5	<1
	IS	1	-	-	-	-	1	-	> 2	32	> 8	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	> 256	> 256	256	256	64	32	8	8	<1	<2	2
	IS	1	-	-	-	-	0,5	0,25	> 2	> 8	16	

- Nous démontrons que le fait de relier deux unités monomériques (**mCx1**) totalement inactives (CMI >256 µg/mL) génère d'excellentes activités (< 1 µg/mL pour les longues chaînes carbonées)
- Nous avons également démontré, une relation étroite entre la longueur de la chaîne alkyle centrale et les propriétés antibactériennes des composés : un allongement de la chaîne carbonée permet une diminution des valeurs de CMI. Par exemple les composés possédant une chaîne à trois carbones, inactifs (> 128 mg/mL), acquièrent progressivement une excellente activité jusque à des valeurs inférieures au µg/mL sur *E. faecalis*. Cette tendance est équivalente sur la quasi-totalité des souches testées.
- Malheureusement il apparaît aussi très clairement que la toxicité de chacun des produits testés semble suivre la même progression. Si le monomère **mCx1** n'est pas toxique, son « jumelage » de manière linéaire avec un homologue se traduit par l'apparition d'une cytotoxicité allant jusqu'à 2 µg/mL pour les dérivés les plus longs.
- Au final il s'avère que les deux familles de composés présentent une activité antibactérienne, meilleure pour la famille des composés « bis-guanidino-phénoxy-alkanes » ; activité supérieure à celle obtenue pour l'hexamidine et comparable à celle obtenue pour la chlorhexidine.

Le fait que, sous condition qu'elles soient reliées entre elles, deux fonctions actives soient suffisantes pour générer une activité antibactérienne, rejoindrai la théorie du mode d'action des composés de ce type (cationique antiseptique). Cette action est envisagée par un relargage des cations bivalents (liant deux molécules de lipopolysaccharide adjacente) à la manière de la Chlorhexidine qui ferait des ponts entre des paires de phospholipides adjacents, chacun étant lié à un fragment biguanide.⁴⁸ La distance entre les têtes phospholipidiques est à peu près équivalente à la longueur d'un groupe hexaméthylène. Les composés bis-cationiques séparées par au moins une longueur équivalente à six atomes de carbone seraient capables de se lier à deux phospholipides. Ce fait a été démontré par Davies et al.⁴⁹, une telle liaison est critique pour les bis-biguanides dont l'activité est réduite de manière significative si les ponts polyméthylène sont inférieurs à six atomes de carbone.

Sans l'avoir encore démontré, l'amélioration significative des activités avec l'allongement des ponts polyméthylène pourrait être due à l'augmentation associée de la charge hydrophobe. Nous

⁴⁸ Moore et al, *Journal of Applied Microbiology* **2005**, 99, 703

⁴⁹ Davies et al., *J. Pharmacol.* **1954**, 9, 192

envisageons ici qu'une augmentation de la région hydrophobe pourrait permettre une interaction supplémentaire avec la partie hydrophobe des phospholipides préalablement perturbés par les interactions électrostatiques.

Ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet « français » en juillet 2008 (n°08/03940), avec une demande d'extension « internationale » (PCT/FR2009/051388) déposé en juillet 2009, et un dépôt « international » en janvier 2010 (WO/2010/004231).

Conclusion

- Deux fonctions cationiques seraient suffisantes pour générer une CMI proche du $\mu\text{g/ml}$ sur l'ensemble des souches de référence.
- La fonction guanidinium semble être plus active que la fonction amidinium, notamment sur *S. Aureus*.
- L'activité est très clairement dépendante de la distance séparant deux fonctions actives (excellente à partir d'une chaîne à 6 carbones)
- Une organisation moins contrainte des fonctions actives (linéaire vs **Cx1**) entrainerait l'apparition de toxicité (par exemple CI_{50} de 8 mg/mL pour le dérivé bis-guanidinium possédant une chaîne à 6 carbones).

VI. Travaux effectués depuis mon recrutement

IV.1. Famille des partiellement substitués

*Travaux de thèse de Hugues Massimba-Dibama*⁵⁰

Le travail engagé sur les familles de composés linéaires nous apporte quelques éléments importants en terme de RSA :

- Linéaire vs monomère : 2 fonctions guanidinium suffisent pour générer une bonne activité antibactérienne (proche de 4 $\mu\text{g/mL}$) à partir du moment où ces deux dernières sont reliées entre elles par une structure centrale suffisamment longue (ou souple ?).
- Linéaire vs calixarène : importance cruciale de la structure organisatrice, les deux apportant une excellente activité mais la première générant une toxicité cellulaire importante.

Afin de vérifier que seulement deux fonctions guanidinium peuvent être suffisantes et que la structure calixarénique permet d'éviter la toxicité cellulaire, une partie du travail de thèse du Dr. Massimba-Dibama a été dédié à l'obtention de calixarènes partiellement guanidilés en couronne haute pour comparaison avec le leader perguanidilé **Cx1**. Quelques-uns des dérivés développés sont présentés ci-dessous (Fig. VI.1).

⁵⁰ Le manuscrit de thèse est disponible à l'adresse suivante : http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCD_T_2010_0123_MASSIMBA_DIBAMA.pdf

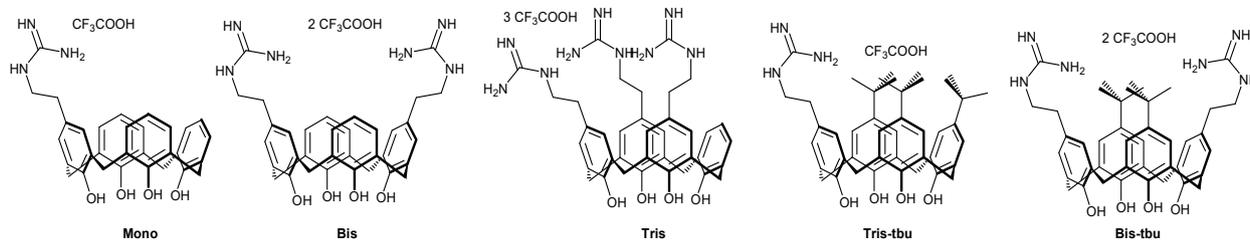


Figure VI.1: Famille de dérivés partiellement guanidilés en couronne haute

Ce travail, en cours de publication, nous apporte les informations préliminaires suivantes (*Tableau VI.1*) :

Tableau VI.1 : CMI en $\mu\text{g/mL}$ vis-à-vis de souches de référence ATCC

	Tris-tbu	Bis-tbu	Mono	Bis	Tris	Cx1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	8	> 256	256	32	4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	64	64	> 256	32	16	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	64	2	> 256	16	16	8
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	64	2	> 256	8	16	8
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	64	4	> 256	32	64	32

- Le dérivé mono ne présente aucune activité sur l'ensemble des souches testées (CMI > 256 $\mu\text{g/mL}$)
- Le premier point important de cette étude est le fait que 4 fonctions guanidiniums ne paraissent effectivement pas nécessaires pour générer une activité intéressante : **Cx1** vs **Bis-tbu**, avec même de meilleures activités pour le second sur les souches Gram + (*S. aureus* et *E. faecalis*, 8 $\mu\text{g/mL}$ pour le **Cx1** contre 2 $\mu\text{g/mL}$ pour le dérivé **Bis-TBu**). Cette observation rejoint donc les résultats obtenus au niveau des composés linéaires et nous conforte dans l'hypothèse de travail à la base de cette étude.
- Le dérivé **Tris-tbu**, outre sa moindre hydrosolubilité, présente une activité modeste sur l'ensemble des souches (64 $\mu\text{g/mL}$), néanmoins plus importante que sont analogue non tertibutylé **Mono** (inactif, CMI > 256 $\mu\text{g/mL}$). Ces données sont importantes et semblent nous montrer l'importance d'une certaine charge lipophile pour l'activité de ces structures.
- L'importance d'une charge lipophile se retrouve également si l'on compare les deux dérivés bis-guanidilés **Bis-tbu** et **Bis** où le second (sans tertibutyle) perd nettement en activité, par exemple de 8 à 256 $\mu\text{g/mL}$ sur *E. coli* ou de 4 à 32 $\mu\text{g/mL}$ sur *E. faecalis*.

En conclusion :

- Nous confirmons que seules deux fonctions actives semblent suffire pour générer de très bonnes activités.
- Nous confirmons qu'une fonction seule, non liée à une autre *via* une plate-forme (calix ou autre), est dépourvue d'activité intéressante.
- Une charge lipophile augmente dans une certaine mesure les capacités anti-bactériennes.

VI.2. Famille des étoilés

Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2014, 24, 4791-4793

Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2015, 23 (17), 5410-5418

Travaux de thèse de Hugues Massimba-Dibama⁵¹

Toujours dans le but d'augmenter nos données concernant les relations structure-activité de nos différents composés nous avons tenté une fois encore de diminuer les contraintes stériques associées au squelette calixarénique en offrant un peu plus de degrés de liberté aux fonctions guanidinium actives. Si la structure calixarénique est très clairement une plate-forme qui organise dans un espace à 3 dimensions, nous avons choisi d'aller vers une structure que l'on peut considérer comme étant « à 2 dimensions », correspondant approximativement à un calixarène « aplati ». (*Fig. VI.2*)

Pour ce faire nous avons choisi d'organiser des monomères de **Cx1** autour d'un noyau benzénique, offrant une possibilité d'accès à de multiples structures plus ou moins fonctionnalisées et ce sur des positions variables du cycle aromatique central.

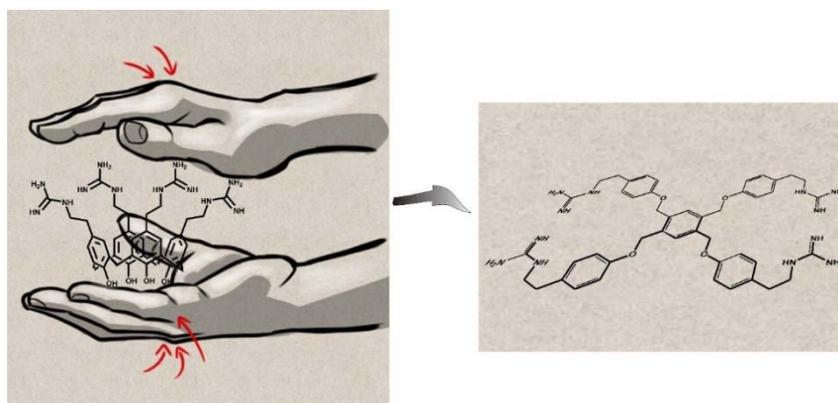


Figure VI.2: contraintes 3D à contraintes 2D

Voici les différentes combinaisons de dérivés que nous avons fabriqués à travers ce travail ; ils représentent la famille de composés étoilés (*Fig. VI.3*), à savoir : le mono-substitué (**mono**) les bis-substitué ortho (**bis-ortho**), méta (**bis-méta**) et para (**bis-para**), le tris-substitué (**tris**), le tétra-substitué (**tétra**) et l'hexa-substitué (**hexa**).

⁵¹ Le manuscrit de thèse est disponible à l'adresse suivante : http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCD_T_2010_0123_MASSIMBA_DIBAMA.pdf

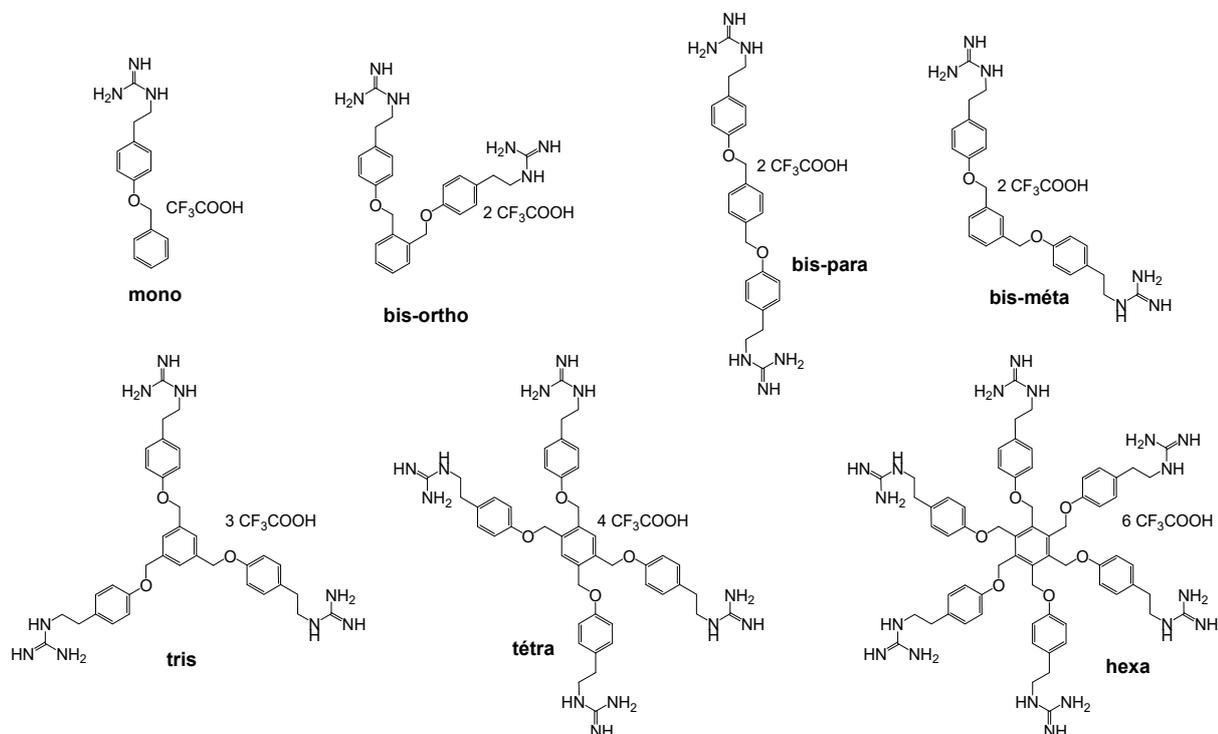


Figure VI.3: famille des composés étoilés

VI.2.1. Synthèse

Le développement de cette famille de composés repose sur un mode opératoire identique à celui développé pour la famille de dérivés linéaires guanidiniums. La boc-tyramine est mise en présence des différents dérivés aromatiques bromométhylés dans des conditions basiques. Puis la guanidine est insérée de manière classique à l'aide de la diboc-triflylguanidine (Fig. VI.4)

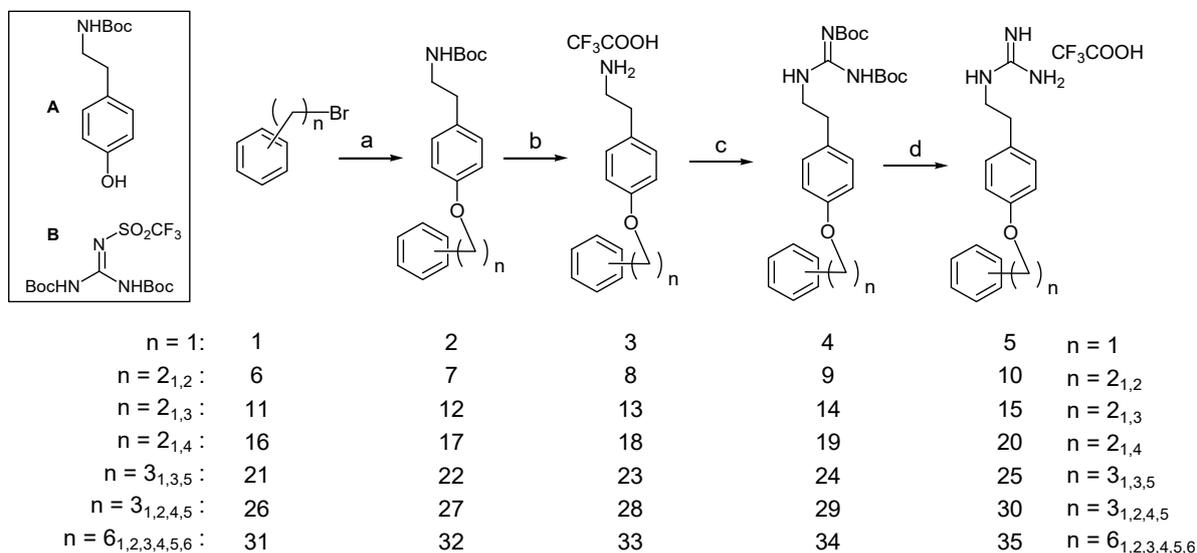


Figure VI.4 : synthèse des composés étoilés : a) **A**, K₂CO₃, MeCN, reflux ; b) CH₂Cl₂, TFA 85 :15, TA ; c) **B**, NEt₃, CH₂Cl₂/MeOH ; d) CH₂Cl₂, TFA, 85 :15, TA

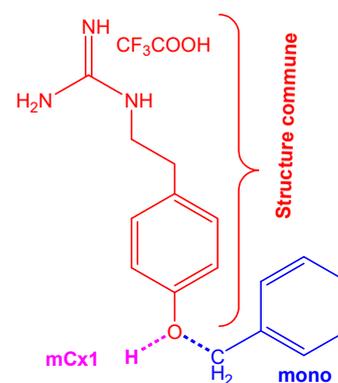
VI.2.2. Résultats

La première étude en microbiologie a été la détermination de l'activité antibactérienne sur les souches standards et de la toxicité sur cellules MRC5. (Tableau VI.2)

Tableau VI.2 : CMI, CI₅₀ en µg/mL et IS (CI₅₀ à 24h / CMI) vis-à-vis de souches de référence ATCC

		mono	Bis-ortho	Bis-méta	Bis-para	tris	tétra	hexa	Cx1
	CI ₅₀ 24h	26	100	34.5	21	39.5	49.0	26.0	> 256
	CI ₅₀ 48h	19.0	41.0	29.7	12.7	30.0	38.5	30.0	> 256
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	32	8	16	4	< 1	4	16	4
	IS	0.8	12.5	2.0	5.25	> 39.5	12	1.5	> 64
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CMI	64	16	32	4	16	8	16	32
	IS	0.4	6.2	1.0	5.25	2.5	6.0	1.5	< 8
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	16	< 1	< 1	1	< 1	2	8	8
	IS	1.5	> 100	> 34.5	21	> 39.5	24.5	3.0	> 32.0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	8	< 1	3	1	< 1	< 1	8	8
	IS	3.0	> 100	17	21	> 39.5	> 49	3.0	> 32.0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	128	8	16	2	8	4	8	32
	IS	0.2	12.5	2.0	10.5	5.0	12.25	3.0	> 8

- Le premier point de comparaison concerne le dérivé **Cx1** avec son équivalent « aplati » **tétra**. Il s'avère que ce dernier possède de meilleures activités sur la quasi-totalité des souches. Néanmoins cette structure plus « souple » possède une concentration toxique supérieure à la structure calixarénique équivalente.
- L'ensemble de ces nouveaux résultats nous confirme une fois de plus le rôle important joué par l'organisation spatiale apportée par une structure centrale. Comme nous l'avons démontré sur les familles de dérivés linaires et calixarènes partiellement guanidilés, nous confirmons qu'un minimum de deux fonctions actives (guanidinium) est nécessaire pour obtenir une activité intéressante, à partir du moment où celles-ci sont obligatoirement liées l'une à l'autre. Exemple : les composés **bis** qui possèdent une CMI de 1 µg/mL sur *S. aureus*, alors que le monomère constitutif **mCx1** est inactif⁵⁸.
- Il semble important de noter que le composé **mono**, équivalent O-benzylé du **mCx1** présente par rapport à ce dernier une bonne activité antibactérienne⁵², par exemple 8 µg/mL sur *S. aureus*. Ceci soulève la question : importance de l'entité lipophile (benzyle) ou importance de la suppression de l'hydroxyle ?
- Il apparaît sur cette série que mis à part le dérivé **mono**, l'ensemble des guanidiniums présente de très bonnes activités avec des CMI souvent inférieures à 16 µg/mL.
- Gram - : *P. aeruginosa* semble légèrement moins sensible à cette série que *E. coli*.
- Gram + : différence un peu plus marquée avec une sensibilité supérieure de *S. aureus*.
- La toxicité cellulaire (sur cellule MRC-5) est par contre supérieure à celle observée pour le dérivé modèle **Cx1** avec des concentrations toxiques inférieures à 100 µg/mL. Même si légèrement supérieures aux concentrations actives, elles pourraient être un frein pour le développement de nouvelles drogues. D'une manière générale il semblerait que cette série possède une spécificité plus importante envers les souches de *S. aureus*, sur lesquelles nous



⁵² Pour rappel : **mCx1** CMI > 256 µg/mL sur l'ensemble des souches de référence et toxicité 24h > 256 µg/mL

obtenons les meilleurs indices de sélectivité, par exemples $IS > 100$ et > 40 pour les dérivés **bis** et **tétra**.

- La comparaison des dérivés **bis-1,2**, **bis-1,3** et **bis-1,4** en terme de CMI les présente relativement équivalents, si ce n'est une activité légèrement inférieure du dérivé **bis-1,3**. Par contre la toxicité est croissante lorsque l'on « linéarise » la structure avec une CI_{50} de 100, 35 et 20 $\mu\text{g/mL}$ pour les composés **bis-1,2**, **bis-1,3** et **bis-1,4** respectivement. Rejoignant ainsi les toxicités observées pour les familles de linéaires précédemment développées (Cf. § V.2.7).
- Augmenter le nombre de substituants « actifs » (4 ou 6 par exemples) ne semble pas s'accompagner d'une augmentation significative d'activité.

La seconde étude en microbiologie s'est faite sur le bacille de la tuberculose. L'ensemble de ces nouveaux dérivés présente également de très bonnes activités, que ce soit sur la souche H₃₇R_V (sensible à INH) ou sur la souche résistante. Le dérivé **mono** présente là encore une activité non négligeable, mais néanmoins inférieure aux dérivés multi-fonctionnels. Le dérivé **hexa** est le moins actif de la série (12,5 $\mu\text{g/mL}$ sur H₃₇R_V). L'ensemble des autres composés **bis**, **tris** et **tétra** présentent d'excellentes activités avec des CMI de 3 à 0,8 $\mu\text{g/mL}$ sur la souche sensible et jusqu'à 0,1 $\mu\text{g/mL}$ pour le **tris** sur la souche résistante, soit presque 20 fois plus actif que l'INH.

En conclusion :

- Nous confirmons l'importance de posséder au moins deux fonctions guanidiniums pour générer de très bonnes activités.
- Augmenter le nombre de fonctions guanidiniums, par exemple ici, 4 ou 6 fonctions guanidiniums ne permet pas d'abaisser significativement les CMI, celles-ci étant même légèrement supérieures.
- Une contrainte stérique moindre que celle apportée par une couronne calixarénique se traduit là encore par de la toxicité cellulaire.
- Nous confirmons l'intérêt de la plateforme calixarénique pour la non toxicité cellulaire et l'obtention des meilleurs indices de sélectivités (sous réserve d'un mode d'action similaire)
- La comparaison du dérivé **mono** de cette famille avec le monomère de **Cx1**, soit nous confirme d'une charge lipophile pour augmenter l'activité, soit un intérêt à supprimer les hydroxyles libres de nos composés.

VI.3. Transposition d'activité sur supports

Travaux de thèse de Frédéric Lemée⁵³

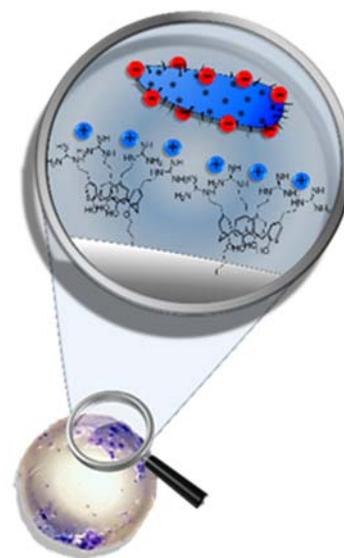
Après avoir développé une chimiothèque de composés et montré leurs très bonnes activités antibactériennes (en solution), associé à une non toxicité *in vitro* et/ou cutanée nous avons envisagés de mettre en place une nouvelle voie d'utilisation de ces derniers. En effet nous avons cherché à développer des polymères possédant des activités anti-infectieuses. A l'heure actuelle l'incorporation d'un composé antibactérien à un textile se fait principalement par dépôt, par dissolution, fusion ou micro-encapsulation, permettant une libération plus ou moins progressive des composés actifs et résistant plus ou moins bien aux cycles de lavage. Mais il est également possible de faire de la fonctionnalisation *via* des liaisons chimiques covalentes. Contrairement à un matériel imprégné d'un composé biocide, le greffage de manière covalente sur polymère est permanent, les surfaces décontaminées sont exemptes de produit après traitement et aucune molécule n'est rejetée dans l'environnement. Cette conception de nouveaux matériaux (textile par exemple), possédant des propriétés anti-microbiennes serait susceptibles de trouver des applications en tant que :

- Décontaminant de surfaces (lingette...) ou de fluides (par filtration de gaz ou de liquide),
- Antiseptiques de contact pour application en topique (lingettes antibactériennes par exemple),
- Textiles à caractère professionnels notamment en milieu hospitalier ou leurs propriétés pourraient participer à assainir l'environnement du patient et du personnel médical (linge de toilette, draps, blouses...) en évitant le développement de micro-organismes à leur niveau et évitant ainsi d'en faire des supports « réservoir » et de favoriser les contaminations.

La problématique de l'apparition des infections nosocomiales dans le domaine hospitalier, et plus particulièrement de la dissémination de microorganismes renforcent la nécessité d'une meilleure prévention du risque de contamination. La mise au point de textile antibactériens serait donc une solution efficace de lutte contre la dissémination.

Conscient que nos composés actifs pourraient perdre de leur efficacité par rapport à leur utilisation en solution car en effet leur immobilisation sur une surface ou au sein d'une fibre pourraient en limiter leur disponibilité et se traduire par une baisse d'activité. C'est pour cela que dans le développement de ce projet, nous sommes dans un premier temps resté relativement prudent, en cherchant à développer des matériaux « bactériophiles » sans envisager directement de propriétés bactéricides ou bactériostatiques. De plus les tests de propriétés antibactériennes sur solides étant plus difficiles à mettre en place que les essais en solution, nous nous sommes tournés vers une techniques analytique par électrophorèse capillaire (EC).

Notre but est donc de créer un matériau permettant une rétention des bactéries par effets électrostatiques, les éventuelles capacités bactéricides ou bactériophiles pourront être étudiées dans un second temps.

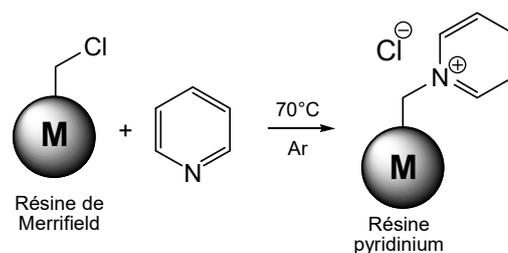


⁵³ Le manuscrit de thèse de F. Lemée est disponible à l'adresse suivante : http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2015_0047_LEMEE.pdf

VI.3.1. Résine pyridinium modèle

New Journal of Chemistry, 2015, 39, 2123-2129

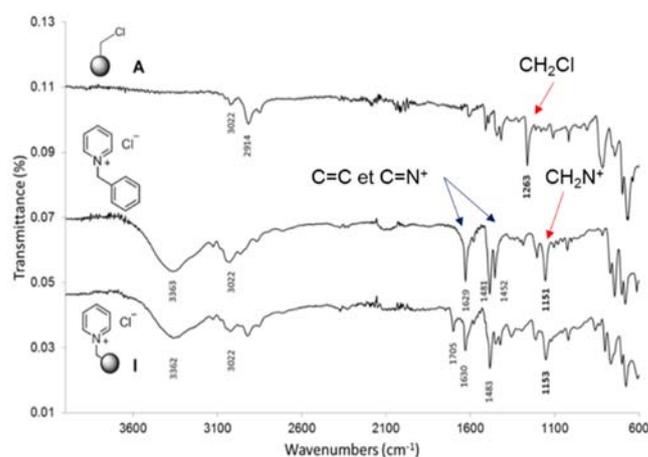
Nous avons choisi dans un premier temps l'utilisation d'un polymère de synthèse : la résine de Merrifield (résine polystyrène). Dans la recherche de voie de greffage rapide de nos dérivés actifs sur ce type de support nous avons mis au point une méthode passant par la formation de lien pyridinium. Nous avons préparé un « blanc » par réaction de la pyridine en présence de résine de Merrifield.⁵⁴ Cette résine pyridinium n'ayant jamais été décrite dans des recherches en biologie nous avons choisi de l'utiliser pour développer la méthode analytique qui pourrait nous permettre de mesurer la capacité de séquestration de nos futurs matériaux.



Etude par IR et analyse élémentaire

Une caractérisation par IR (Fig. VI.5) et analyse élémentaire permet de caractériser nos résines et ainsi pouvoir par la suite mettre en relation la quantité de bactéries séquestrées et le nombre de charges disponibles sur la résine.

Figure VI.5 : Spectre IR (ATR) de la résine pyridinium (bas), de la résine de Merrifield (haut) et du modèle « discret » (centre)



Etude par MEB

Nous avons en parallèle étudié la morphologie de nos billes de résine par microscopie électronique à balayage (MEB), donnant une idée sur la taille des billes et leur état de surface. La résine de Merrifield vierge semble être instable et mal supporter la tension de 3 kV avec une attaque visible de la surface (a fig. VI.6), contrairement à la résine pyridinium (b fig. VI.6) qui ne présente aucune dégradation suite au balayage d'électrons, et ce, même sous un faisceau de 10 kV (c Fig. VI.6). Le passage à la forme pyridinium semble donc stabiliser les billes avec une sensibilité moins importante que les motifs chlorométhylés.

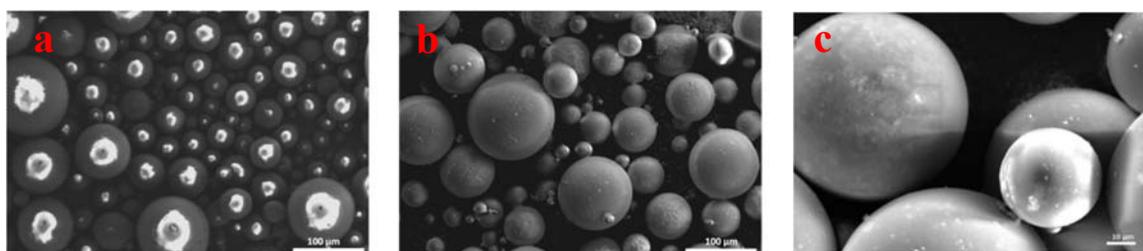


Figure VI.6 : Microscopie électronique à balayage : a) résine de Merrifield à 3 kV ; b) résine pyridinium à 3 kV ; c) résine pyridinium à 10 kV

⁵⁴ Réaction initialement développée par Merrifield dans le but de quantifier la quantité de chlore dans ses polymères *via* titration

Démonstration par électrophorèse capillaire :

L'étude préliminaire de cinétique de séquestration a été menée sur 24 h entre la résine pyridinium et une suspension de *Escherichia coli* (choisi comme modèle de par sa nature commensale potentiellement pathogène). La concentration en bactéries résiduelles a été évaluée par électrophorèse capillaire (Fig VI.7). Il apparaît une décroissance forte du pourcentage de *E. coli* résiduelle avec une perte d'environ 40% dans les premières minutes de contact. Un plateau aux alentours de 10% (90% capturé) apparaît après 3 à 4h. Le témoin restant stable dans les mêmes conditions.

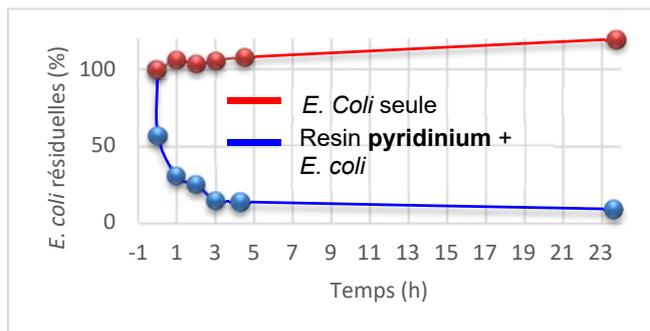
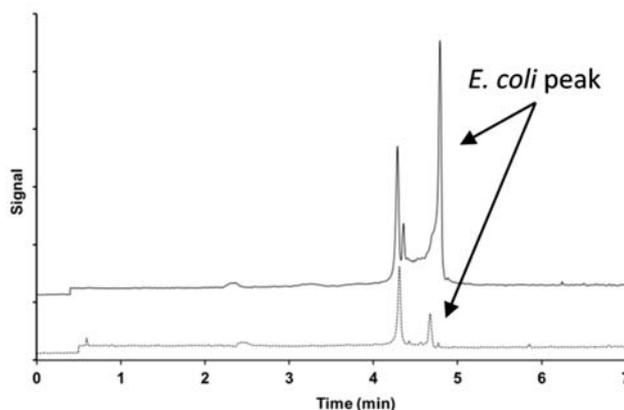


Figure VI.7 : Quantification de la suspension d'*E. coli* avec et sans résine pyridinium pendant 24h

Une comparaison des électrophorégrammes des deux échantillons pyridinium et témoin est présentée figure VI.8.

Figure VI.8 : Electrophorégrammes de la suspension bactérienne après 3h de contact avec (trait pointillé) et sans (trait plein) ajout de résine pyridinium.⁵⁵



Démonstration par microscopie confocale

Afin de vérifier si, et comment, les bactéries sont associées aux billes de résine nous avons mené une étude par microscopie de fluorescence (coloration au Sybr Green II®). Les images ci-dessous obtenues au microscope confocal montrent très clairement la séquestration des bactéries à la surface des billes de résine (Fig. VI.9).

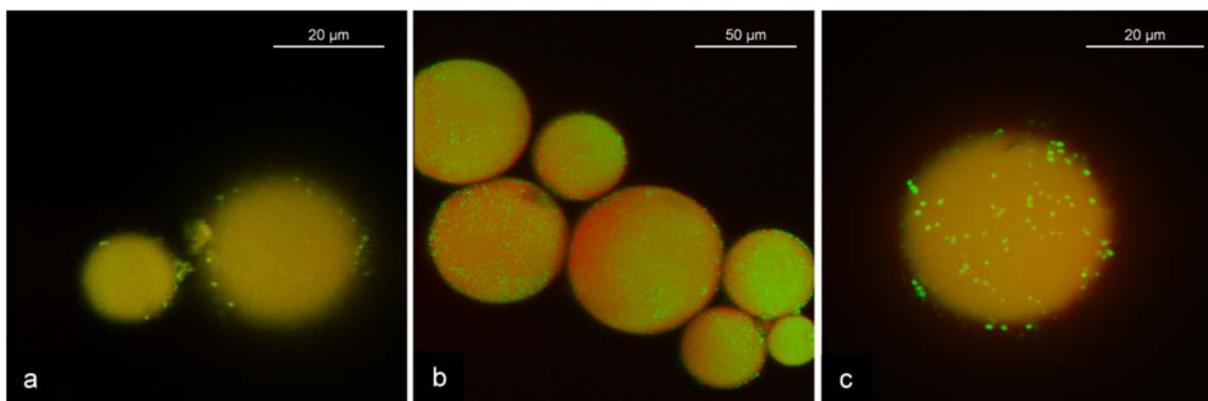


Figure VI.9 : Microscopie confocale : adduit *E. coli* / résine pyridinium. a) Visualisation directe de la périphérie de deux billes voisines ; b) Visualisation tomographique d'un groupe de billes ; c) Visualisation tomographique de la calotte (18,1 µm de diamètre pour 6,3 µm de hauteur) d'une bille de 27,35 µm de diamètre.

⁵⁵ Le premier pic à 4,2 min correspond sans doute à des résidus bactériens dû au processus de lyophilisation

La photo **a** montre la présence de cellules sous la forme de petites structures vertes. La photo **b** par tomographie présente un groupe de billes qui montre, que quelle que soit leur taille, chacune est engagée dans un processus de rétention. Enfin la photo **c** présente une tomographie (16 coupes de 0,410 μm) de la calotte d'une bille (rayon : 27,35 μm ; surface : 9400 μm^2). La tomographie nous présente une calotte ($r = 18,1 \mu\text{m}$, $h = 6,3 \mu\text{m}$) sur laquelle 70 bactéries bien définies ont été comptabilisées. Une extrapolation à la sphère totale nous donne environ 610 cellules, soit une capacité de capture de $6,41 \cdot 10^{10}$ bactérie/ m^2 .

En conclusion :

- Cette première résine « test » semble être très concluante en tant que matériau bactériophile.
- Elle nous confirme le potentiel de la fonction pyridine pour le greffage sur résine de Merrifield.
- Elle nous a permis de mettre au point la technique d'électrophorèse capillaire pour évaluer la capacité de rétention.
- La microscopie confocale nous a permis de mettre en évidence de façon extrêmement claire la séquestration des bactéries à la surface des billes.

VI.3.2. Mise au point de résines fonctionnalisées par nos calixarènes actifs

New Journal of Chemistry, 2016, 40, 8239-8250

Si la résine pyridinium est un matériau très intéressant au niveau de ses capacités de capture de bactéries, notre objectif initial était bien de transposer les activités de notre composé leader rencontrées en solution sur un support solide. Le travail de thèse de F. Lemée a donc en partie été investi sur cet objectif, dans le but d'obtenir des polymères fonctionnalisés équivalent de celui présenté *figure VI.10* et d'en étudier dans un premier temps les capacités de séquestration. Le choix s'est porté sur l'introduction de notre leader **Cx1** et de l'un de ses intermédiaires, le dérivé *tétra*-éthylammonium, et ce en utilisant si possible un motif pyridinium pour l'encrage sur la résine.

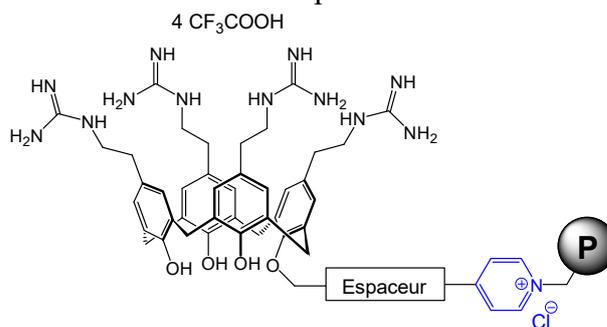


Figure VI.10: polymère calixarénique cible

Je présente ici quelques exemples des différentes résines obtenues lors de ce travail. Elles ont été synthétisées par l'introduction de motifs calixaréniques *tétra*-ammonium ou *tétra*-guanidinium dont l'obtention est décrite dans les figures suivantes (*Fig. VI.11* et *VI.12*). Les résine de Merrifield (vue précédemment : fonctions chlorométhyles) et de Wang benzaldéhyde (fonctions benzaldéhydes) ont été utilisées pour cette étude.

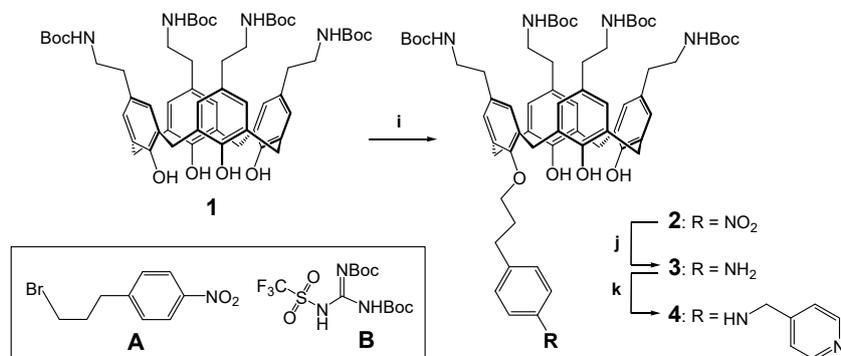


Figure VI.11 : Obtentions des calixarènes fonctionnalisés avant leur introduction sur les polymères
i) A, NaHCO₃, KI, MeCN, reflux 20 h ; 37%. **j)** méthode 1 : 10% Pd/C, EtOH, H₂, TA, 1 h, 43% ; méthode 2 : 10%Pd/C, EtOH, N₂H₄.H₂O, 85°C, 15 min, 75%. **k)** 1) pyridine-4-CHO, mortier, 5 min. ; 2) EtOH, NaBH₄, TA, Ar, 2 h, 78%.

La synthèse des calixarènes *tétra*-boc-aminoéthyles porteurs en couronne basse d'une fonction amine (composé **3** fig. VI.11) ou pyridine (composé **4** fig. VI.11) permettent respectivement une fonctionnalisation sur les résines de Wang benzaldéhyde (Toluène, 70°C, 48h : formation d'imine) et de Merrifield (MeCN, 80°C, 5 j : pyridinum). Les matériaux obtenus suivent ensuite le processus classique de formation de la fonction guanidine (déprotection amine, introduction de la bocguanidine et déprotection finale) pour donner les résines finales ammonium **5**, guanidinium **7** sur Merrifield et ammonium **6**, guanidinium **8** sur Wang (Fig. VI.12).

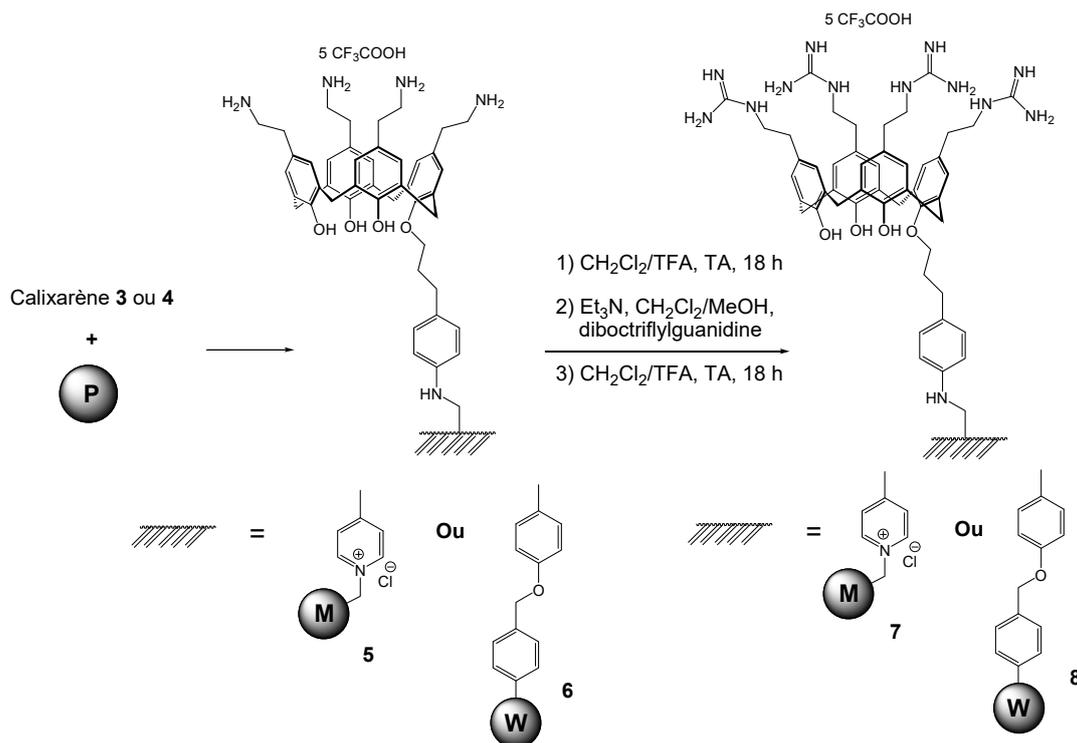


Figure VI.12 : synthèses des résines calix-ammonium **5**, **6** et calix-guanidinium **7**, **8**

Résultats :

L'ensemble des résines a été caractérisé par variations de masses et analyses élémentaires notamment par la proportion d'azote. Toujours en considérant les bactéries comme des objets

moléculaires chargés négativement nous avons fait des analyses par électrophorèse capillaire (EC)⁵⁶, en comparaison à la résine pyridinium (**Pyr**) décrite précédemment. Les principales données sont présentées dans le tableau VI.3 suivant :

Tableau VI.3 : données analytiques et calculs relatifs à la séquestration de bactéries par les résines **5**, **6**, **7**, **8** et **Pyr**

Résine ^{a)}	Pyr (M)	7 (M)	8 (W)	5 (M)	6 (W)
Type de cation ^{b)}	pyr	Cx1	Cx1	Cx2	Cx2
% N	4.69	0.72	0.91	0.64	0.94
Entité cationique greffée (mmol/g)	2.96	3.67 10 ⁻²	5.00 10 ⁻²	7.62 10 ⁻²	1.34 10 ⁻¹
Cation greffé (mmol/g)	2.96	1.84 10 ⁻¹	2.50 10 ⁻¹	3.81 10 ⁻¹	6.70 10 ⁻¹
W = Masse résine (mg)	2.3	2.2	2.5	2.6	1.8
Moles charges cationiques disponibles	6.81 10 ⁻⁶	4.04 10 ⁻⁷	6.25 10 ⁻⁷	9.91 10 ⁻⁷	1.20 10 ⁻⁶
Masse résiduelle de bactéries (M _i , µg) ^{c)}	4.68 (23,4%)	11.66 (58,3%)	13.16 (65,8%)	18.00 (90%)	15.82 (79,1%)
Masse de bactéries captée (M _c , µg)	15.32 (76,6%)	8.34 (41,7%)	6.84 (34,2%)	2.00 (10%)	4.18 (20,9%)

^{a)} M: résine de Merrifield; W: résine de Wang

^{b)} pyr : pyridinium; Cx1 : guanidinium; Cx2 : ammonium

^{c)} A partir d'une masse initiale de 20 µg (M₀)

- Il apparaît très clairement un taux de greffage moins important dans le cas des composés calixaréniques quel qu'ils soient par rapport à la résine pyridinium **Pyr**.

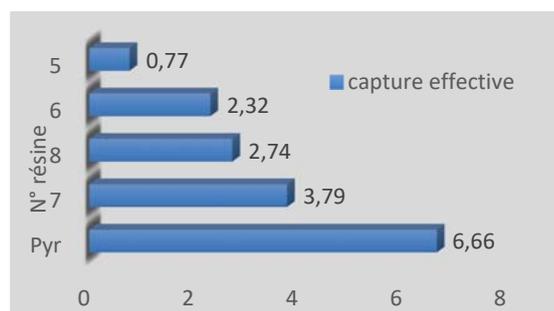


Figure VI.13 : capture effective de *E. coli* (µg/mg)

Le rapport de la masse de bactérie captée sur la masse de résine conduit à la valeur de **capture effective** (µg/mg)⁵⁷. Concernant les résines calixaréniques : à l'exception de la résine **5** (ammonium intermédiaire de la résine **14**) qui présente la plus faible efficacité de capture (0,77 µg/mg), toutes les résines présentent une efficacité de capture entre 2 et 4 µg/mg. Parmi ces dernières, la résine **6**, une autre résine ammonium, (Wang) et précurseur de résine de guanidinium **8**, présente une capture efficace du même ordre de grandeur, néanmoins à mettre en corrélation avec le fait qu'elle soit environ 2,5 fois plus chargée en cations (6,70 10⁻¹ contre 2,50 10⁻¹ mmol/g).

- La résine guanidinium **7** (Merrifield) semblent être le meilleur candidat parmi les résines greffées par les calixarènes (efficacité de capture à 3,79 µg de bactérie/mg de résine).
- En parallèle la résine pyridinium **Pyr** la plus chargée avec 2,69 mmol de pyridine/g de résine présente l'efficacité la plus importante à 6,66 µg de bactérie par mg de résine.

⁵⁶ Chaque expérience de capture a été faite avec n = 3, en parallèle à un blanc bactérie afin de corriger les résultats de titration par le développement naturel de ces dernières. Temps de contact de 3 h entre 20 µg de bactérie et environ 2 mg de résine.

⁵⁷ capture effective = $\frac{\text{masse de bactérie captée}}{\text{masse de résine}}$

- Rappporter les valeurs de captures effectives (en mg/g) au nombre d'entités (molécules) chargées disponibles (en mmol/g) ou au nombre de charges cationiques disponibles permet d'obtenir respectivement l'**efficacité 2** et l'**efficacité 1** de nos résines⁵⁸ (Fig. VI.14 et VI.15).

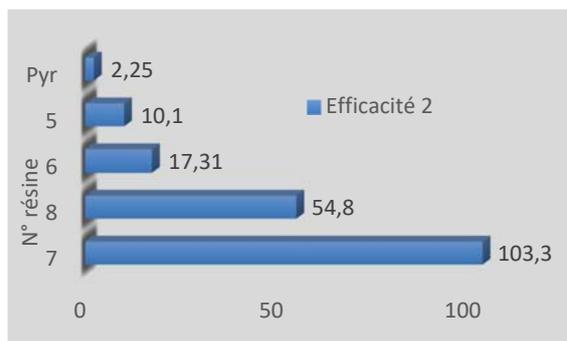


Figure VI.14: efficacité 2 (mg/mmol)

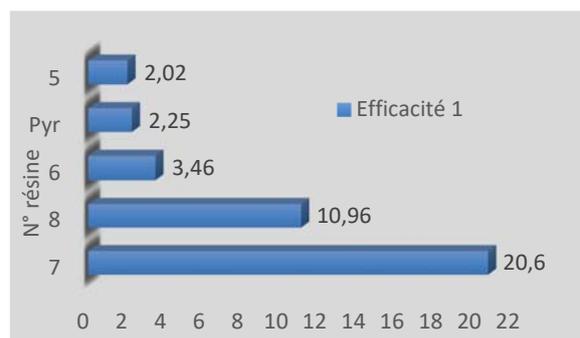


Figure VI.15 : efficacité 1 (mg/mmol)

La résine pyridinium **Pyr**, la plus fortement greffée se retrouve comme étant la moins efficace de toute la série (2,25 mg de bactérie / mmol de pyridine), c'est-à-dire la plus faible capacité de capture par « molécule greffée ». Les résines **5** et **6** du fait de leur charge « moléculaire » plus élevées se retrouvent avec une efficacité moindre. La résine **7**, la moins fonctionnalisée ($1,84 \cdot 10^{-1}$ mmol de calix par g de résine) se trouve être en fait la plus efficace pour séquestrer les bactéries.

A ce stade, les résultats obtenus montrent que les résines calixaréniques sont plus efficaces que la résine pyridinium simple pourtant bien plus fonctionnalisée, ce qui suggère comme nous l'avons envisagé, que seule la densité surfacique de charges participe à la capture bactérienne. Les pyridines certainement greffées plus en profondeur que les calixarènes se trouvent au final être inaccessibles aux bactéries.

Lors de nos travaux sur la résine pyridinium **Pyr** nous avons effectué une étude en microscopie confocale (cf. §VI.3.1.). Cette technique bien que très efficace est un peu lourde à mener pour une évaluation rapide de la séquestration. Jean-Bernard Regnouf de Vains a alors développé une méthode plus simple, consistant à colorer les bactéries présentes à l'aide d'un colorant de membrane et à observer les billes au microscope optique (transmission ou réflexion). Les photos **a** et **b** ci-dessous présentent les billes de résine pyridinium **Pyr** après trois heures de contact avec une suspension de *E. Coli*, rinçage et coloration par le bleu de méthylène (2 à 5 min), rincée et observée.

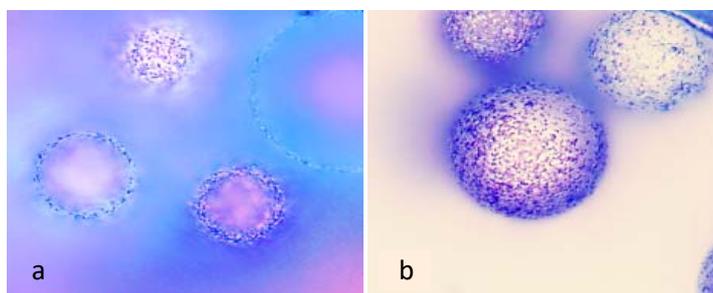


Figure VI.16 : démonstration de la capture de bactéries par la résine **Pyr** suite à une coloration au bleu de méthylène

La photo **a** montre trois niveaux d'observations en fonction de la taille des billes : la vue d'une calotte montre les bactéries en bleu réparties de manière homogène à la surface ; le milieu et le bas de deux vues de la circonférence, montrent également des grains bleus, caractéristiques de la présence des bactéries. La photo **b** montre l'intensité de la capacité de billes pour retenir *E. coli*.

⁵⁸ efficacité 1 = $\frac{\text{capture effective } (\mu\text{g}/\text{mg})}{\text{cations greffés (mmol/g)}}$; efficacité 2 = $\frac{\text{capture effective } (\mu\text{g}/\text{mg})}{\text{molécules greffées (mmol/g)}}$

Le même traitement avec la résine greffée par le calixarène **Cx1** donne les résultats suivants (photo a et b *figure VI.17*).

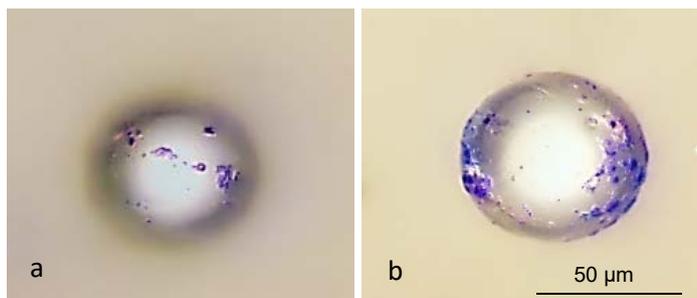


Figure VI.17: démonstration de la capture de bactéries par la résine 7 suite à une coloration au bleu de méthylène

Il apparaît très nettement des objets bleus mais bien moins défini que dans le cas de la résine précédente, mais plutôt des amas que des objets différenciés. Un processus plus doux notamment lors des lavages n'a pas entraîné d'améliorations significatives, nous laissant penser à un effet délétère de l'entité calixarénique après sequestration. Le processus a été modifié avec un temps de contact réduit à 30 secondes et a permis d'obtenir les photos présentées ici.

En conclusion :

- L'utilisation d'une pyridine comme élément de fixation à la résine chlorométhylée est une excellente alternative.
- Un fort taux de greffage n'est pas obligatoirement synonyme d'une grande efficacité (seules fonctions de surface interagissent).
- Aux vues des colorations effectuées au bleu de méthylène, les résines guanidiniums (calix) et pyridiniums séquestrent bien les bactéries, mais avec des comportements tout à fait différents :
 - Répartition homogène pour la pyridinium avec des entités bien différenciées.
 - Répartition hétérogène pour la guanidinium avec la présence d'amas, probablement effet bactériolytique des résidus calixaréniques.
- Ceci laissant penser à un effet délétère des guanidiniums contrairement aux pyridiniums.

VI.4. Etude conformationnelle

ChemBioChem - A European Journal of Chemical Biology, 2019, 20, 911-921

J'ai poursuivi les travaux pour affiner les relations structures-activités des composés actifs organisant dans l'espace les fonctions guanidiniums.

Toujours basé sur notre principale hypothèse reposant majoritairement sur les interactions électrostatiques entre drogue et surface bactérienne, nous nous sommes intéressés à l'introduction de groupements hydrophobes. Sur le dérivé **Cx1** c'est la couronne de groupes hydroxyles, engagés dans un réseau de liaison hydrogènes, qui présente le caractère hydrophobe.

Nous avons, dans ce travail, envisagé une plus grande amphiphilie par l'introduction de groupes lipophiles afin d'engendrer une interaction supplémentaire avec les constituants membranaires hydrophobes (phospholipides). Ces derniers pourraient être accessibles suite à l'action perturbatrice *via* interactions électrostatiques. Nous pourrions donc envisager une aide à la désorganisation par des interactions hydrophobes.

Nous avons choisi dans cette étude, d'utiliser la couronne supérieure tertiobutylée du calixarène natif comme partie hydrophobe. Les fonctions cationiques seront introduites par un bras propylguanidinium sur la couronne inférieure *via* une liaison éther.

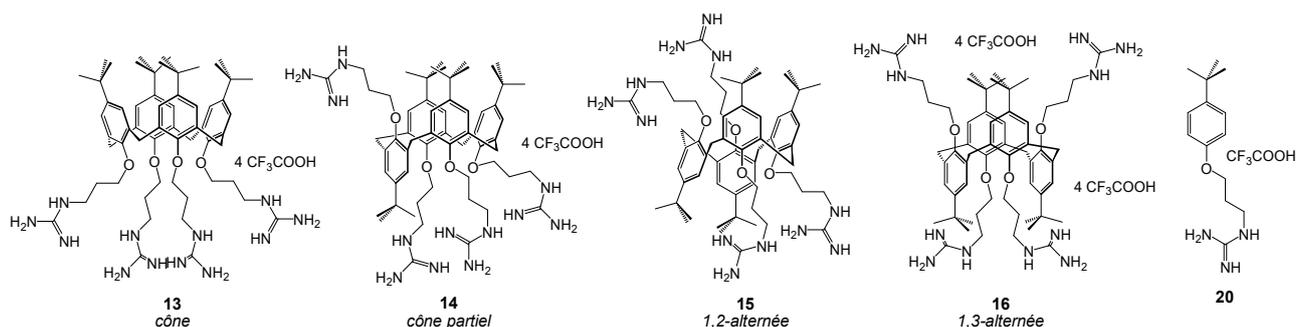


Figure VI.18: les 5 nouveaux composés de cette étude

Dans la conformation conique, le dérivé **13** (Fig. VI.18) devrait présenter un caractère amphiphile, ce qui entraînerait une forte orientation de la tête cationique vers la surface bactérienne, en laissant les fonctionnalités hydrophobes orientées à l'extérieur ou à l'intérieur (*via* retournement) pour d'autres interactions. Dans le même temps, pour approfondir notre connaissance de la relation structure-activité nous avons proposé pour ce dérivé **13** une déclinaison dans ses différentes conformations possibles : *cône partiel* (**14**), *1,2-alternée* (**15**) et *1,3-alternée* (**16**) (Fig. VI.18).

Ceci devrait nous permettre de modifier les différentes régions hydrophiles et hydrophobes, respectivement générées par les charges ioniques et les groupes tertiobutyles. En effet, il est possible d'accéder à des zones avec soit le caractère totalement ionique dans la couronne supérieure et totalement hydrophobe à l'opposé, soit avec un rapport de charges / tertiobutyles variable selon l'une des conformations du calixarène. Nous pouvons ainsi passer d'un caractère amphiphile (composé **13** fig. VI.18) à un composé bolaamphiphile (composé **16** fig. VI.18) L'orientation à la surface bactérienne de ces régions de différentes constitutions pourrait avoir une conséquence sur l'activité antibactérienne particulièrement face aux phospholipides.

VI.4.1. Synthèse (Fig. VI.19)

Le point de départ de synthèse de cette famille de conformères est basé sur une procédure adaptée de Böhmer *et al.*⁵⁹ rapportant le développement de différents calixarènes 1,3-alternés sélectivement fonctionnalisés par des groupements azotés. Le *tetra*-tBu-calix[4]arène natif est placé à reflux dans le THF en présence de Cs₂CO₃ et de bromopropylphthalimide. Un traitement *via* chromatographie ou *via* plusieurs cristallisations permet d'isoler les 3 conformères *1,3-alt*, *1,2-alt* et *cône partiel* en proportion variables. Le composé conique analogue est obtenu simplement en milieu basique (directement⁶⁰ ou *via* le bis-fonctionnalisé). Un clivage du groupement phthalimide suivi de l'introduction de la guanidine selon les procédures standards permet la formation des quatre conformères attendus. Une étude RMN 1D et 2D permet d'identifier très clairement les différentes conformations.

⁵⁹ V. Böhmer *et al.*, *Org. Biomol. Chem*, **2005**, 3, 172-184

⁶⁰ F. Sansone *et al.*, *Organic Letters*, **2008**, 10, 3953-3956

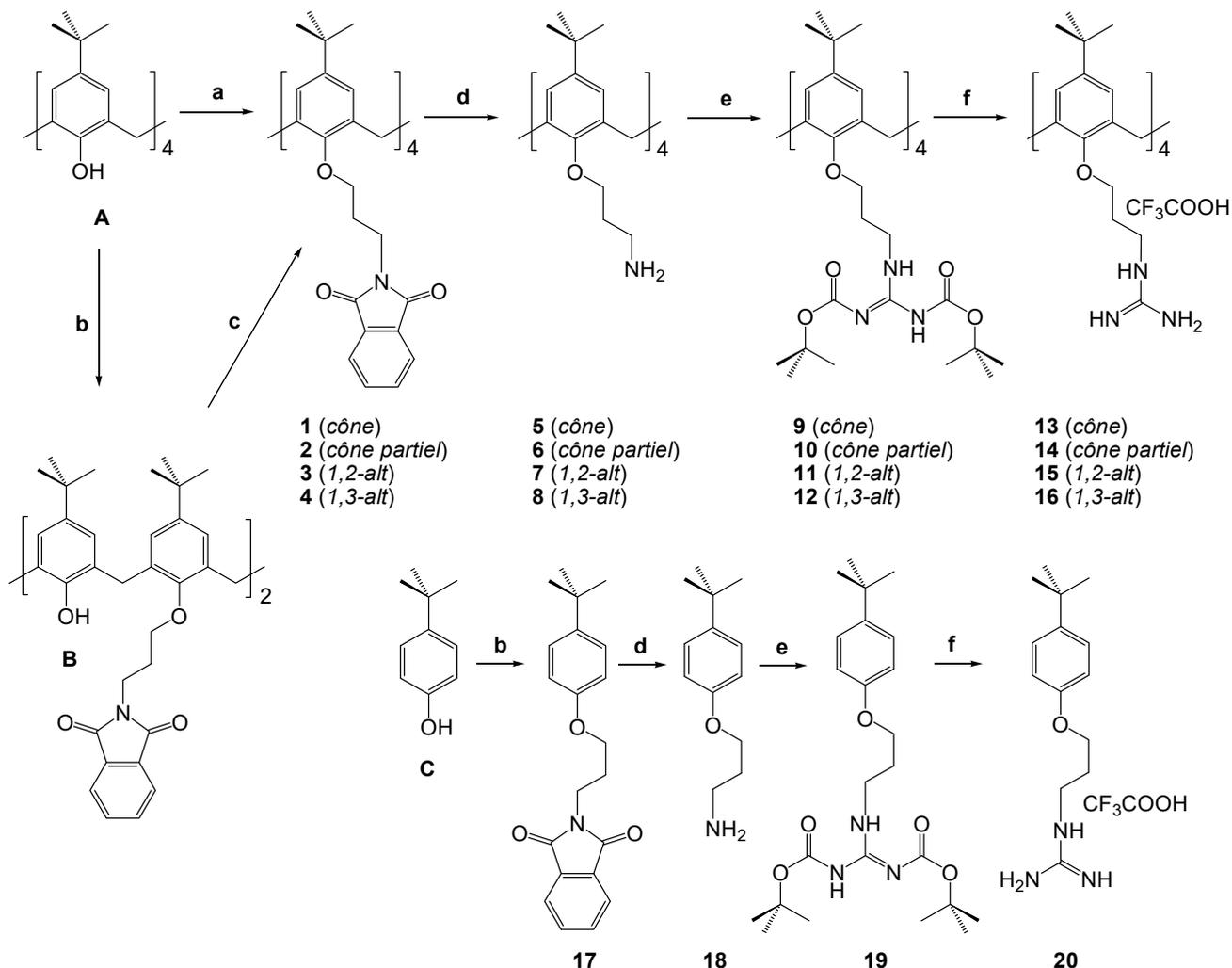


Figure VI.19 : Synthèses des différents conformères tertibutylés : réactifs et conditions :

a) Cs_2CO_3 , THF, reflux, 7j b) K_2CO_3 , CH_3CN , reflux, 18h c) NaH, toluène/ CH_3CN , Reflux, 18h d) $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$, H_2O , éthanol, reflux, 6h e) N_1, N_2 -(di-Boc)- N_3 -triflylguanidine, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, TA, 18h f) CH_2Cl_2 , TFA, TA, 18h.

VI.4.2. Résultats

Les tests microbiologiques ont été les suivants :

- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur les 5 souches standards (Gram + et Gram -)
- Déterminations des CMI sur les *mycobacterium tuberculosis* souche sensible (H37Rv) et résistante (MYC5165) à INH
- Détermination de la toxicité cellulaire (CI_{50}) sur MRC-5

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (Tableau VI.4) :

Tableau VI.4 : CMI, CI₅₀ en µg/mL et IS (CI₅₀ à 24h / CMI) vis-à-vis de souches de référence ATCC du **Cx1**, cône **13**, cône-partiel **14**, 1,2-alt. **15**, 1,3-alt **16** et monomère **20**

		cône	cône partiel	1,2-alt	1,3-alt	monomère
	CI₅₀	139,3	69.8	57.6	>256	6.1
	CI₅₀ 48h	>256	28.0	28.6	201.1	23.6
	CI₅₀ 168h	>256	9.7	7.9	6.2	1.5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	64	8	8	4	64
	IS	2.2	8.7	7.2	> 64	0.1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CMI	128	8	16	16	128
	IS	1.0	8.7	3.6	> 16	< 0.1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	32	2	4	< 1	32
	IS	4.4	34.9	7.2	> 32	< 0.1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	32	4	8	8	32
	IS	4.3	14.5	7.2	> 32	< 0.1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	8	4	8	8	128
	IS	1.1	8.7	3.6	> 16	< 0.1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	CMI	78.5	38.43	38.8	4.97	9.08
	IS	1.8	1.8	1.5	51.5	0.7
<i>M. tuberculosis</i> MYC5165 Résistant à INH	CMI	6.2	1.6	2.5	0.8	50
	IS	22.5	43.6	23.0	320.0	0.1

Note: CMI INH: 0.16 and 20 µg/mL against H34Rv et INH-resistant MYC5165 respectivement.

Le rapport concentration toxique/concentration active nous permet, là encore, le calcul de l'indice de sélectivité utile à un classement rapide de nos différents composés face à un intérêt thérapeutique potentiel.

Sans essayer de comparer les souches standard (Gram + et Gram-) avec le bacille de la tuberculose, nous pouvons extraire une tendance générale de ces composés, sur la base de la relation entre leur géométrie spatiale et l'activité globale qu'ils exhibent contre les divers micro-organismes utilisés dans cette étude.

- Le composé conique amphiphile **13** présente l'activité la plus faible avec une CMI de 8 à 128 µg/mL sur les souches standards et 78 mg/mL sur *M. tuberculosis*, mais présente néanmoins une faible toxicité (environ 140 µg/mL)

- Une augmentation significative de l'activité sur l'ensemble des souches apparaît dès le retournement d'un seul cycle (cône partiel **14**) de la couronne calixarénique (Par exemple CMI de 128 à 8 $\mu\text{g/mL}$ sur *E. coli* respectivement pour le cône et le cône partiel, mais également une CMI divisée par 4 sur *M. tuberculosis* résistant à INH pour les mêmes composés).
- Le passage à la conformation *1,3-alternée* bolaamphiphile **16** s'avère être le plus profitable et permet d'obtenir les meilleures CMI de la série, notamment sur *M. tuberculosis* (5 et 0.8 $\mu\text{g/mL}$ sur H₃₇Rv et MYC5165 resp.). Une structure étirée idéalisée devrait correspondre à $\sim 16\text{-}18\text{\AA}$, près de l'épaisseur de la bicouche lipidique (25-30 \AA) et permettre des interactions des cations opposés avec les anions des deux couches lipidiques.
- En termes de toxicité il apparaît que le retournement de cycle dans le cas des dérivés cône partiel et *1,2-alt* entraîne l'apparition d'une certaine toxicité 2 à 2,5 fois plus importante respectivement que sur le dérivé conique. Ceci conduit à des IS compris entre 7 et 35 sur souches standards et de 2 à 44 sur *M. tuberculosis*.
- Par contre le dérivé *1,3-alt* apparaît comme étant le moins toxique de la série ($> 256 \mu\text{g/mL}$). Il présente ainsi des IS >16 sur *P. aeruginosa* jusque >320 sur *M. tuberculosis* résistant à INH.

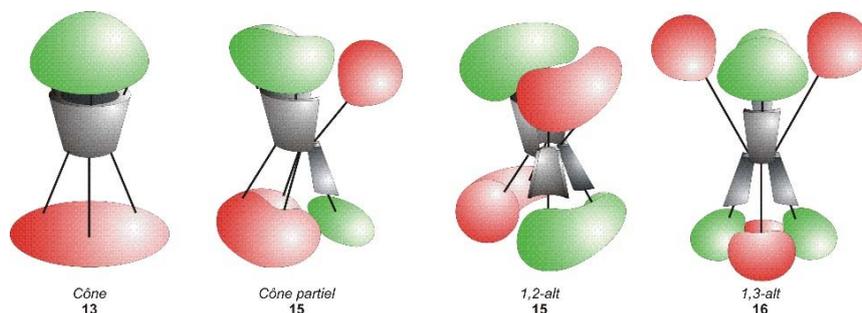
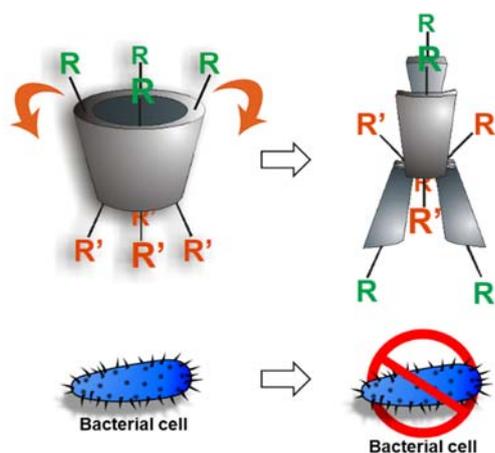


Figure VI.20 : répartition des régions hydrophiles (rouge) et hydrophobes (vert) des 4 conformères **13**, **14**, **15** and **16**

Il semble vraiment important de prendre en considération la participation des deux caractères, ionique et hydrophobe, dans le mécanisme générant l'activité (antibactérienne ou toxique). Si les 3 conformères **14**, **15** et **16** ont quasiment les mêmes CMI (souches standards) il apparaît un gap par rapport à la toxicité. Les cône partiel et *1,2-alterné* sont au moins 4 fois plus toxique que le *1,3-alterné*.

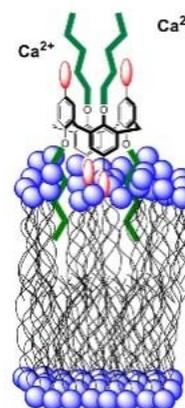
Contrairement aux bactéries, la membrane des cellules eucaryotes contient principalement des phospholipides zwitterioniques conférant une charge de surface neutre. Si les seules charges cationiques peuvent difficilement être impliquées dans la toxicité cellulaire (Cx1), on peut alors envisager un rôle des parties hydrophobes des calixarènes **14** et **15**, seuls ou en combinaison avec les guanidiniums. Les régions hydrophobes probablement plus marquées dans le cas des dérivés cône partiel et *1,2-alt* pourraient être responsable du caractère cytotoxique de ces derniers. En ce qui concerne le *1,3-alt*, une alternance de chaque côté du noyau calixarénique, de groupes guanidiniums et de groupes tertiobutyles, annule la présence d'une région hydrophobe marquée. Cette configuration serait moins délétère pour les membranes cellulaires.

En conclusion :

- Très nettes différences d'activités selon la géométrie des 4 conformères.
- La conformation cône amphiphile apparaît comme étant la moins active
- Le renversement d'au moins un cycle de la couronne, résulte en une réelle augmentation de l'activité antibactérienne avec des CMI inférieures à 10 µg/mL.
- La structure *1,3-alternée* bolaamphiphile acquiert une non-toxicité.
- Cette première étude permet de confirmer qu'une variation de la balance hydrophilie/lipophilie grâce à diverses fonctions greffées sur la calixarène permet d'en modifier l'activité *in-vitro*. En effet le conformère *1,3-alt* avec le caractère ionique le moins marqué de par l'alternance guanidiniums/tertiobutyles sur chaque couronne calixarénique, semble être le meilleur compromis pour une bonne activité et une faible toxicité.
- Les composés de cette famille, en particulier le *1,3-alterné*, ont montré une activité très prometteuse sur les sept souches testées et notamment contre *M. tuberculosis* et en particulier sur souche résistante à INH.

VI.5. Développement de conformères du Cx1

Fort des résultats obtenus précédemment (importance de la conformation *1,3-alternée* et de la présence de groupements lipophiles) nous avons envisagé une modification de notre composé leader **Cx1** en imaginant ses homologues en conformation *1,3-alternée* et en y apportant des groupements alkyles de longueur variables.



VI.5.1. Synthèse

La voie de synthèse choisie est la suivante (Fig. VI.22) :

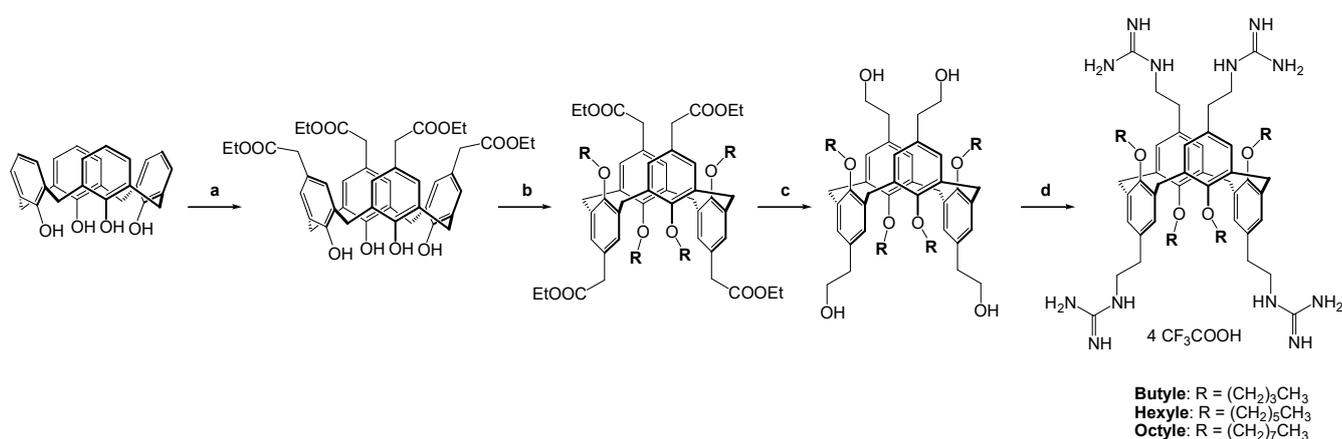


Figure VI.21 : voie de synthèse des analogues *1,3-alternés* du **Cx1**

- a)** i. Me_2NH , HCHO , AcOH , THF, TA, 18 h; ii. CH_3I , KCN, DMSO, 80°C , 7 h; iii. $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$, 125°C , 7 h; iv. H_2SO_4 , ETOH, reflux, 7 h; **b)** K_2CO_3 , bromoalkyle, CH_3CN , reflux, 24 h; **c)** LiAlH_4 , THF, reflux, 6 h; **d)** i. DIAD, PPh_3 , THF, phthalimide, TA, 18 h; ii. $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$, H_2O , éthanol, reflux, 6 h; iii. N_1, N_2 -(di-Boc)- N_3 -triflylguanidine, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, TA, 18 h; iv. CH_2Cl_2 , TFA, TA, 18 h

Le point de départ est le calixarène *tetra-para*-éthylacétate déjà utilisé sur d'autres travaux concernant les dérivés anioniques et dont la synthèse suit des protocoles adaptés de la littérature. L'étape suivante consiste à mettre en présence ce calixarène *tétra*-ester avec le dérivé alkyl bromé choisi et K₂CO₃. Les fonctions esters sont ensuite réduites en présence de LiAlH₄ pour donner les alcools correspondants. Ces derniers subissent alors une réaction de Mitsunobu en présence de DiIsopropyleAzoDicarboxylate (DIAD), de PPh₃ et de phtalimide comme nucléophile. Les dérivés tétra-aminés, après clivage des phtalimides en présence d'hydrazine, sont convertis en guanidiniums selon la procédure standard.

VI.5.2. Résultats

Le tableau VI.5 présente les résultats préliminaires obtenus sur cette série de dérivés.

Tableau VI.5: CMI, IC₅₀ en µg/mL et IS (CI₅₀ à 24h / CMI) vis-à-vis de souches de référence ATCC de **Cx1, 214, 216 et 218**

		Cx1	214	216	218
	CI₅₀ 24h	>256	64	8	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	4	1	2	128
	IS	> 64	64	4	0,06
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CMI	32	1	4	128
	IS	> 8	64	2	0,06
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	8	1	< 1	16
	IS	> 32	64	> 1	0,5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	8	1	nd	nd
	IS	> 32	64	nd	nd
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	32	1	< 1	8
	IS	> 8	64	> 1	1

Une étude préliminaire classique en microbiologie a été menée sur ces trois premières structures afin de déterminer une CMI sur les 5 souches standards ainsi qu'une détermination de la cytotoxicité. Il apparaît ainsi une différence d'activité antibactérienne qui semble être en relation avec la longueur des chaînes grasses introduites :

- Le dérivé **butyle** apporte un gain d'activité notable. Ce dernier présente une activité de 1 µg/mL sur l'ensemble des souches, alors que le composé de référence **Cx1** présente une activité comprise entre 4 et 32 µg/mL.
- Le dérivé **hexyle** perd légèrement en activité sur Gram - (*E. coli* et *P. aeruginosa*) est passe en dessous du µg/mL sur Gram + (*S. aureus* et *E. faecalis*).
- Le dérivé **octyle** quant à lui voit son activité fortement diminuée, notamment sur Gram - avec des CMI à 128 µg/mL. Augmentation des CMI également sur Gram + mais nettement moins marquée, avec un passage à 16 et 8 µg/mL sur *S. aureus* et *E. faecalis* respectivement.

Au niveau de la cytotoxicité, quelle que soit la longueur des chaînes grasses introduites, les dérivés développés ici, présentent une toxicité bien plus importante que celle de l'analogue **Cx1**. De > 256 µg/mL nous descendons à 64 µg/mL pour le **butyle** et 8 µg/mL pour les chaînes à 6 et 8 carbones.

Sur Gram - les IS deviennent ainsi mauvais (4) à très défavorable (0,05), là où les valeurs de cytotoxicité sont largement passées en dessous des domaines d'activité.

En parallèle les Gram + semblent posséder une sensibilité supérieure, le dérivé **octyle** conduisant encore à des CMI de 8 et 16 µg/mL sur *S. aureus* et *E. faecalis* respectivement.

L'augmentation de la toxicité avec l'allongement de la longueur de chaîne carbonée ne nous a pas incité à introduire des chaînes carbonées supérieures à huit carbones.

En conclusion :

- L'apport de groupements hydrophobes est plutôt positif en terme d'activité antibactérienne. Cette influence positive s'estompe avec la longueur de chaîne jusqu'à devenir néfaste à l'activité, plus particulièrement sur Gram - (*E. coli* et *P. aeruginosa*).
- L'effet délétère est conservé sur Gram + lorsque la charge lipophile augmente.
- La longueur de chaîne carbonée est en relation directe avec une toxicité croissante qui semble devenir vite rédhibitoire.

VI.6. Famille *para*-guanidinium

A ce stade nous avons clairement démontré que le fait d'organiser dans l'espace au moins deux fonctions actives (guanidiniums) permet la genèse d'une activité antibactérienne très appréciable, avec ou non une certaine toxicité (selon les structures organisatrices). Dans ce travail récent je me suis intéressé à modifier une fois de plus la structure **Cx1**, avec :

- Suppression des degrés de liberté offerts aux fonctions actives en couronne haute *via* suppression de la chaîne éthyle (reliant guanidine et cycle aromatique) (*Fig. VI.22*) pour aller vers une augmentation de la contrainte stérique.

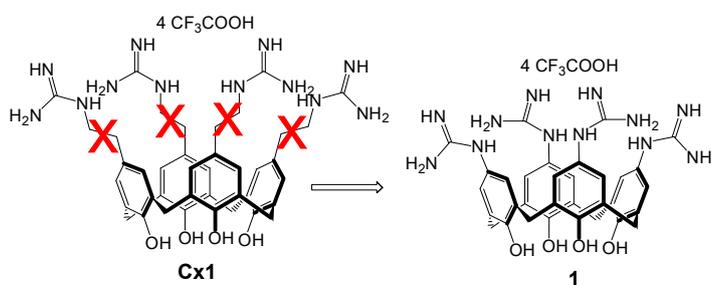


Figure VI.22 : augmentation de la contrainte stérique

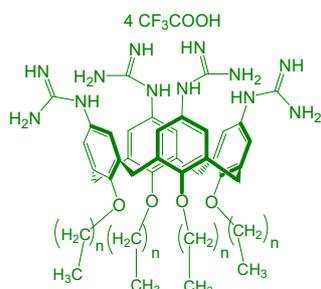
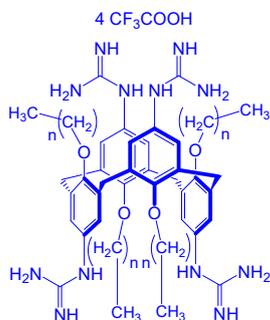


Figure VI.23: introduction de chaînes lipophiles

- Introduction de chaînes lipophiles de longueurs variables en couronne basse (*Fig. VI.23*) dans le but de confirmer les résultats obtenus précédemment (charge lipophile linéaire importante mais jusqu'à une certaine longueur).



- Comparaison de deux familles de conformères : *cône* (Fig. VI.23) et *1,3-alterné* (Fig. VI.24), dans le but de confirmer également l'importance de la conformation dans ce type de structures.

Figure VI.24 : conformation cône de cette nouvelle famille

VI.6.1. Synthèse

La synthèse du composé de référence **1** de cette nouvelle famille consiste dans un premier temps en la formation du dérivé *tétra-para*-aminé (Fig. VI.25). Pour l'obtenir j'ai choisi le passage par réaction de couplage diazoïque suivi d'une réduction. Préparation du chlorure de diazonium en *para* de l'acide benzoïque, est mise en contact avec le calixarène pour une SEAr en position *para* du noyau phénolique conduisant au motif diazoïque attendu.

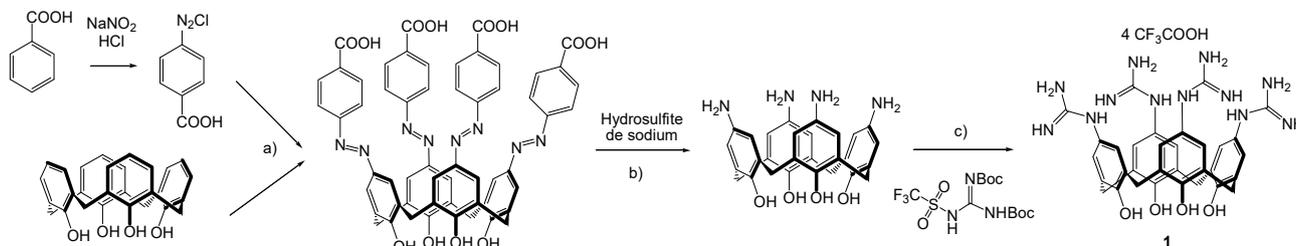


Figure VI.25 : synthèse du composé **1** a) NaNO₂, HCl, DMF, 2h, b) NaOH 1%, Na₂S₂O₄, 90°C, 2h ; c) N₁,N₂-(di-Boc)-N₃-triflylguanidine, CH₂Cl₂/MeOH, TA, 18 h, puis CH₂Cl₂, TFA, TA, 18 h.

La synthèse des dérivés alkylés de conformation *cône* débute par la *per*-alkylation de la couronne basse en présence de NaH et du dérivé bromé (Fig. VI.27). Une *ipso*-nitration en présence d'acide nitrique fumant et d'acide acétique permet l'obtention des dérivés *tétra-para*-nitrés, lesquels sont réduits par le chlorure d'étain puis guanidilés à l'aide de diboc-thiométhylguanidine en présence de chlorure de mercure. Une déprotection finale donne les dérivés guanidiniums *cône prop* à *cône oct*.

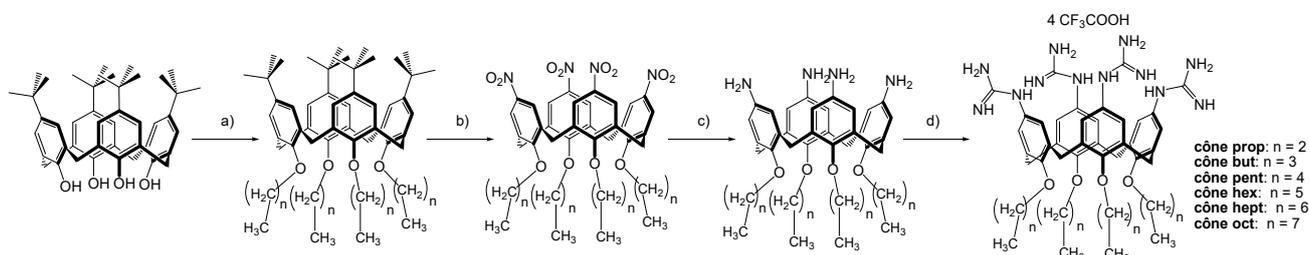


Figure VI.27 : voie de synthèse des dérivés alkylés coniques *cône prop* à *cône oct*

- a)** bromo-alkane, NaH, DMF, 85°C; **b)** HNO₃ fumant, AcOH, CH₂Cl₂, TA, une nuit; **c)** SnCl₂, 2H₂O, EtOH, reflux, 1 nuit; **d) i.** N₁,N₂-(di-Boc)-N₃-thiométhylguanidine, HgCl₂, DMF, TA; **ii.** CH₂Cl₂, TFA, TA, 18 h.

La synthèse des analogues en conformation *1,3-alternée* utilise le même schéma réactionnel (Fig. VI.28) mais nécessite une étape supplémentaire. Dans un premier temps la bis-alkylation en couronne basse, puis la *per*-alkylation menée en présence de carbonate de césium permet l'obtention

des dérivés *1,3-alternés*. Ces derniers suivent le même processus que précédemment et conduisent aux sels de guanidinium **1,3-alt prop** à **1,3-alt oct**.

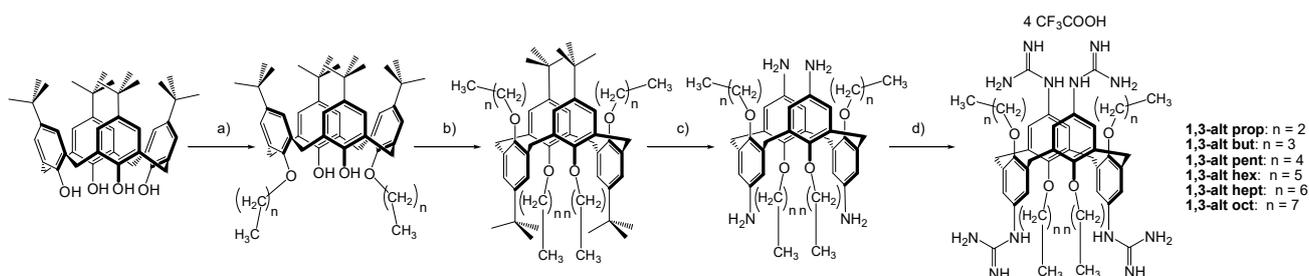


Figure VI.28 : voie de synthèse des dérivés alkylés *1,3-alternés* **1,3-alt prop** à **1,3-alt oct**

a) bromo-alkane, K_2CO_3 , CH_3CN , reflux; **b)** bromo-alkane, Cs_2CO_3 , DMF, $50^\circ C$, 7j; **c)** **i.** HNO_3 fumant, AcOH, CH_2Cl_2 , TA, une nuit; **ii.** $SnCl_2$, $2H_2O$, EtOH, reflux, 1 nuit; **d)** **i.** N_1, N_2 -(di-Boc)- N_3 -thiométhylguanidine, $HgCl_2$, DMF, TA; **ii.** CH_2Cl_2 , TFA, TA, 18 h.

VI.6.2. Résultats

Les premiers résultats concernent les activités antibactériennes sur les souches standards Gram + et – sont donnés dans les tableaux suivants : tableaux VI.6 et VI.7 pour les dérivés coniques et *1,3-alternés* respectivement.

Tableau VI.6 : CMI en $\mu g/mL$ vis-à-vis de souches de référence ATCC des composés **coniques**

		1	Cône prop	Cône but	Cône pent	Cône hex	Cône hept	Cône ocy	Cx1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	1	16	128	256	256	> 256	256	4
<i>Pseudo</i> ATCC 27853	CMI	1	32	64	128	256	256	256	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	1	16	128	256	256	> 256	256	8
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	1	8	64	nd	nd	nd	256	8
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	8	2	32	8	16	16	128	32

Tableau VI.7 : CMI en $\mu g/mL$ vis-à-vis de souches de référence ATCC des composés **1,3-alternés**

		1	1,3-alt prop	1,3-alt but	1,3-alt pent	1,3-alt hex	1,3-alt hept	1,3-alt oct	Cx1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CMI	1	1	nd	nd	8	256	> 256	4
<i>Pseudo</i> ATCC 27853	CMI	1	2	nd	nd	2	8	128	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CMI	1	1	nd	nd	1	nd	nd	8
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CMI	1	16	nd	nd	16	256	128	8
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CMI	8	4	nd	nd	1	2	32	32

- Composé **1**, analogue du **Cx1** mais beaucoup plus contraint quant aux fonctions guanidiniums, présente de très bonnes activités, par exemple 4 à 32 fois meilleures que le **Cx1** sur *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement (CMI de $1 \mu g/mL$ sur la quasi-totalité des souches). Ceci conforte une fois de plus notre hypothèse initiale sur l'importance d'une contrainte stérique apportée aux fonctions positives pour une meilleure interaction avec la surface bactérienne.

- L'apport de chaîne grasse n'implique pas d'augmentation d'activité par rapport au dérivé nu **1**. Une augmentation croissante de la longueur de chaîne entraîne une perte proportionnelle d'activité, confirmant nos premières conclusions lors de l'étude sur les dérivés 1,3-alternés du **Cx1** et porteur de chaînes grasses (Cf. § V.5.).
- Par contre différence très forte entre les deux familles de conformères. Si dans les deux cas l'augmentation de la taille de la chaîne grasse se traduit par une diminution de l'activité, celle-ci est bien moins importante dans le cas des dérivés 1,3-alternés. Par exemple le composé possédant des chaînes hexyle en 1,3-alterné reste encore très actif sur toutes les souches (jusqu'à 1 µg/mL) alors que l'analogue conique a déjà perdu quasiment toute son activité avec des CMI de 256 µg/mL.
- Dans les deux cas il semble y avoir une certaine spécificité face à *E. faecalis*, très marquée dans le cas des dérivés coniques avec encore une CMI de 16 µg/mL pour la chaîne grasse à 7 carbones alors que les autres souches ne sont plus sensibles depuis le composé possédant 4 carbones en chaîne alkyle.

En conclusion

- Le fait de restreindre plus encore les degrés de liberté de nos fonctions actives sur la plateforme calixarénique engendre de meilleures activités.
- Encore une fois il semble que les composés amphiphiles à chaînes grasses linéaires, ne soient pas les meilleurs candidats. Nous montrons que la conformation *1,3-alternée* reste bien plus active.
- Ces résultats sont à mettre en relation avec la toxicité cellulaire.

Projet de Recherche

Le projet de recherche que je souhaite développer s'appuie sur l'ensemble des compétences techniques et scientifiques que j'ai acquises jusqu'à présent, et découle naturellement de mes recherches passées.

Sur le modèle du calix[4]arène offrant un excellent contrôle conformationnel, seront élaborées de nouvelles plateformes multifonctionnelles intégrant sur les bords du macrocycle :

- un ou plusieurs groupes hydrosolubilisants et/ou actifs
- un ou plusieurs principes actifs anti-infectieux ou cytotoxiques, libérable(s) *in vivo*
- un modèle de peptide d'adhésion RGD pour l'adressage.
- un système d'ancrage pour un couplage rapide de radiomarqueur ;

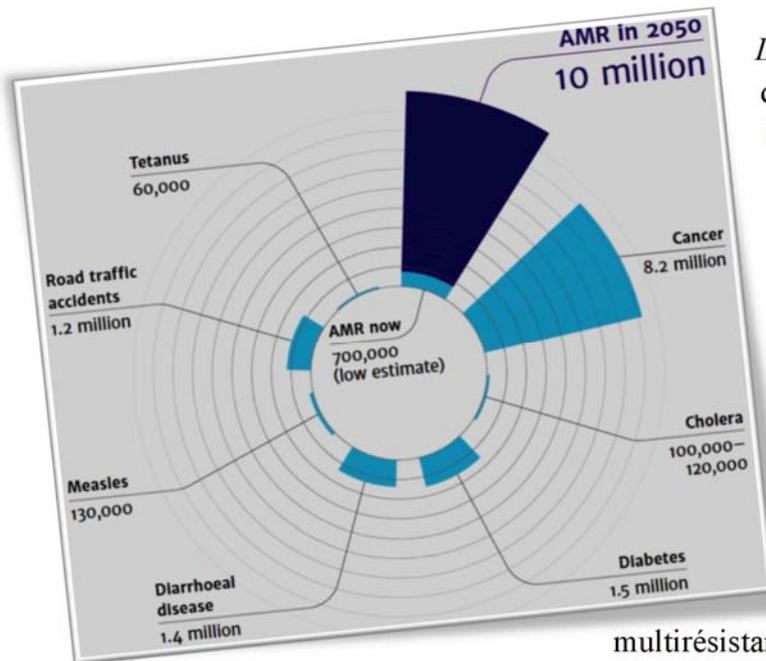
Sur la base de l'état de l'art actuel du laboratoire, riche en termes de méthodologies de fonctionnalisation des calixarènes et applications biologiques (infectiologie), je souhaite développer de nouvelles stratégies de multifonctionnalisation dirigée des calixarènes, ainsi que de nouvelles méthodes de fonctionnalisation impliquant notamment les couplages peptidiques, les réactions « click », et une nouvelle méthode d'ancrage rapide et univoque mise au point récemment au laboratoire⁶¹. Ce projet concerne deux grands axes avec des taux d'implication différents.

I. Axe I : Activité Antibactérienne

Recherche de nouveaux composés actifs afin de continuer à participer à la recherche cruciale de nouveaux principes actifs pour lutter contre les BMR, de plus en plus inquiétantes au fil des années. Le but est d'élargir l'arsenal thérapeutique qui a tendance, ces dernières années, à se restreindre toujours davantage, du fait de l'apparition d'un très grand nombre de micro-organismes de plus en plus résistants vis-à-vis des antibiotiques connus.

Contexte : Multiplication des résistances voire multi-résistances bactériennes associée à de trop faibles investissements en R&D dans ce secteur risque de conduire d'ici quelques dizaines d'années à voir passer les infections bactériennes en tête de liste des maladies mortelles.

⁶¹ Lemée, F. et al., *New J Chem.*, **2016**, 40, 8239-8250



D'une part : L'augmentation et la dissémination de la résistance aux anti-infectieux à travers la planète sont telles que l'OMS a identifié la résistance aux antibiotiques comme l'une des « plus grandes menaces pour la santé mondiale »⁶². Même si l'acquisition de mécanismes de résistance est un phénomène naturel il est maintenant largement démontré et connu que la sur-utilisation et la mauvaise utilisation des antibactériens, favorisent ce phénomène. L'émergence de bactéries multirésistantes est fortement ressentie en milieu

hospitalier et provoque une augmentation inquiétante :

- De morbidité et de mortalité
- Des coûts des soins de santé directement attribués à ces infections ou engagés dans des programmes de prévention
- Du risque croissant de se diriger vers une impasse thérapeutique...

D'autre part : la tuberculose (TB), qui reste aujourd'hui encore l'une des 10 premières causes de mortalité dans le monde. En 2017, 10 millions de personnes ont contracté cette maladie et 1,6 million en sont mortes (dont 300.000 séropositives pour le VIH).⁶³ Il est important de faire face à cette infection et à l'apparition de résistances aux principes actifs de première intention (INH, rifampicine), actuellement polyantibiothérapie systématique (bi- ou tri-thérapie voire plus). En 2017 environ 560.000 personnes ont contracté une forme de TB résistante à la rifampicine (TB-RR), principe actif le plus efficace et parmi elle 82% étaient atteintes de TB multi-résistante (TB-MR) (rifampicine et INH). L'ensemble de nos résultats déjà obtenus *in vitro* sur les souches du bacille de la tuberculose (souche sensible et résistante à INH) m'incite fortement à poursuivre mes recherches à destination de cette infection. Les chiffres toujours inquiétants associés à cette infection et le faible arsenal thérapeutique dédié laissent présager l'apparition grandissante de souches résistantes aux principes actifs utilisés couramment.

La recherche et le développement de nouveaux antibactériens sont donc primordiales pour faire face aux résistances et pour pallier la pénurie de nouveaux principes actifs. Par exemple seulement un composé jugé comme innovants et actif pour lutter contre les bactéries jugées prioritaires (*P. aeruginosa* carbapenem-resistant par ex.) est en cours de développement et cinq molécules (une seule en phase 3) pour lutter contre *M. tuberculosis*.⁶⁴ L'approche innovante développée au laboratoire

⁶² <http://www.who.int/drugresistance/en/>; Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance 2015

⁶³ Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde, 2018, OMS

⁶⁴ Antibacterial agents in clinical development, WHO, 2017

depuis quelques années, basée sur des interactions électrostatiques entre des composés hautement organisés et la surface bactérienne a fait ses preuves sur un grand nombre de souches bactériennes et il est, je pense, important de poursuivre les efforts en ce sens.

Objectifs : Poursuivre le développement de cette famille d'agents antibactériens novateurs pour être en mesure de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour faire face aux bactéries multi-résistantes. Rechercher de nouvelles molécules plus actives, moins toxiques, plus sélectives.

Collaborations :

- En chimie avec Jean Bernard Regnouf de Vains
- En interne avec les biologistes de l'UMR et la plateforme ABC
- Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS – Toulouse)

Méthodologie générale : j'utiliserais toutes nos données concernant les relations structures-activités afin d'orienter le développement des nouvelles structures. La capacité multifonctionnelle de nos plateformes sera largement mise à profit avec l'utilisation de tous types de ligations permettant l'orthogonalité pour : 1) pour l'accroches des diverses fonctionnalités : 2) l'accès à des liaisons hydrolysables.

I.1. Calixarènes phosphoniums :

Utilisation, en lieu et place des fonctions guanidiniums, de sels de phosphoniums

Résultats attendus :

Une chose certaine est le fait que, jusqu'à présent, la structure calixarénique est indispensable à la non toxicité de nos entités (par rapport aux différentes entités dérivées que nous avons pu synthétiser). De plus il est très clair que l'apport d'au moins deux fonctions cationiques est également essentielle à une activité antibactérienne. Jusqu'à présent nous avons développé des structures possédant essentiellement des fonctions guanidiniums qui se sont avérées être les plus actives, notamment face aux ammoniums équivalent présentant peu d'activité.

Le développement que j'envisage se fera *via* l'utilisation de fonctions phosphoniums.

Les domaines d'application des sels de phosphoniums quaternaires sont assez larges. Ils sont utilisés par exemple comme catalyseurs en synthèses énantiosélectives⁶⁵, catalyseurs de transfert de phase⁶⁶, liquides ioniques⁶⁷. Mais ils présentent également des propriétés thérapeutiques : antiprolifératif⁶⁸, antibactériens⁶⁹ ou antiparasitaire⁷⁰.

⁶⁵ Ma J.-A. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5869–5872 ; Fujioka H. *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12232–12235

⁶⁶ ZhaO G. *et al.*, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 5972-5974

⁶⁷ Dias A.M.A. *et al.*, *Acta Biomaterialia*, **2012**, *8*, 1366–1379 ; Tindale J.J. et Rogogna P.J., *Journal of Molecular Liquids*, **2010**, *152*, 14–18

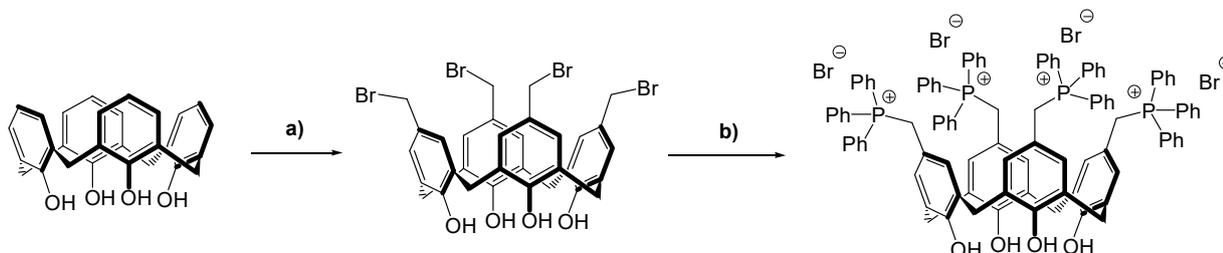
⁶⁸ Kalyanaraman B. *et al.*, *Cancer Biol. Ther.*, **2011**, *12*, 707-717 ; Kataev V. E. *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1300–1308 ; Kalyanaraman B. *et al.*, *Cancer Res.*, **2012**, *10*, 2634-2644

⁶⁹ Shtyrlyn Y. G. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 4388–4395 ; Xiao H. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 3626-3655 ; Shtyrlyn Y. G. *et al.*, *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **2016**, *65*, 537–545 ; Mironov F. K. *et al.*, *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 8493-8501 ; Stobykina A. S. *et al.*, *Mendeleev Commun.*, **2017**, *27*, 134-136 ; Zhao Z. *et al.*, *RSC adv.* **2017**, *7*, 13244-13249

⁷⁰ Dardonville C ; *et al.* *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 2606–2622

Ils restent néanmoins relativement peu utilisés dans la recherche d'activités antimicrobiennes. Certains travaux sont plutôt liés à l'obtention de matériaux antibactériens. Concernant les molécules discrètes quelques articles relatent l'étude de divers phosphoniums, présentant parfois de bonnes à très bonnes activités sur diverses souches de références. Malheureusement la toxicité cellulaire associée n'est pas toujours déterminée ou bien parfois proche du domaine d'activité (par ex. un composé di-phosphonium de CMI 5 µg/mL sur *E. coli* pour une cytotoxicité de 160 µg/mL sur fibroblastes cutanés humain.⁶⁵)

Le but est de développer des plateformes calixaréniques poly-phosphonium, toujours dans l'optique de contraindre stériquement ces charges positives et d'en étudier leur impact sur la paroi bactérienne.



Synthèses du composé *tétra*-triphénylphosphonium bromure : réactifs et conditions :
a) HBr 33%/AcOH, HCHO, reflux, 1 nuit ; b) P(Ph)₃, CH₂Cl₂ ; T.A. 10 min.

Une première molécule a déjà été développée en ce sens (Fig. ci-dessous) et testée sur 5 souches bactériennes résistantes⁷¹ : les premiers résultats sont extrêmement prometteurs en ce qui concerne ce genre de structures même si les l'évaluations cytotoxiques n'ont pas encore été réalisées. Ce composé présente des CMI de l'ordre de 1 µg/mL sur les 5 souches résistantes testées (Tableau ci-dessous). A travers une méthode originale de brométhylation nous obtenons très rapidement et simplement le calixarène *tétra*-bromométhylé, lequel est substitué quasiment instantanément par la triphénylphosphine.

CMI en µg/mL vis-à-vis de souches résistante du composé 260

Souches	ECR1	EFR1	EFR2	SAR1	PAR1
CMI	2	1	1	2	1

Les prochains composés devront comporter de 2 à 4 fonctions phosphonium, elles-mêmes constituées de divers groupements carbonés (phényl ou alkyl de longueur variable) afin d'établir une nouvelle échelle de relation structure activité.

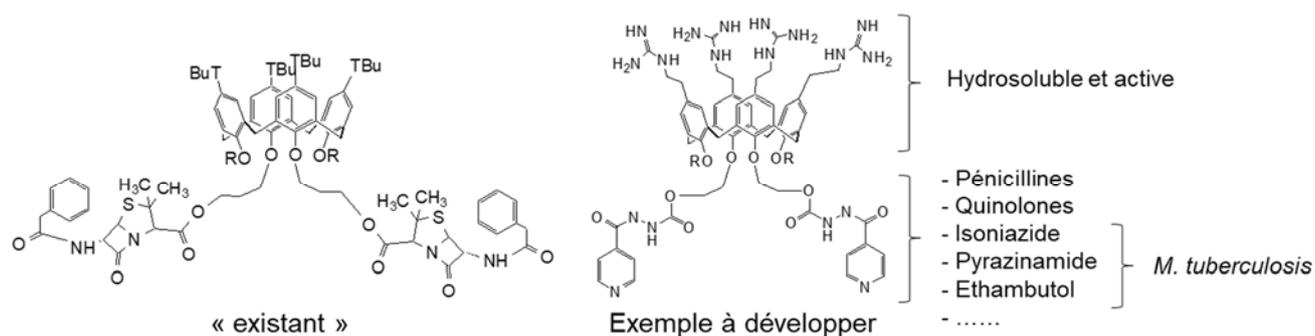
I.2. Calixarènes prodrogues

Je souhaite, sur la base de travaux précédemment décrit au laboratoire⁷², développer de nouvelles structures porteuses de principe actif (P.A.), pouvant être libérée *in vivo*. Profitant ainsi de

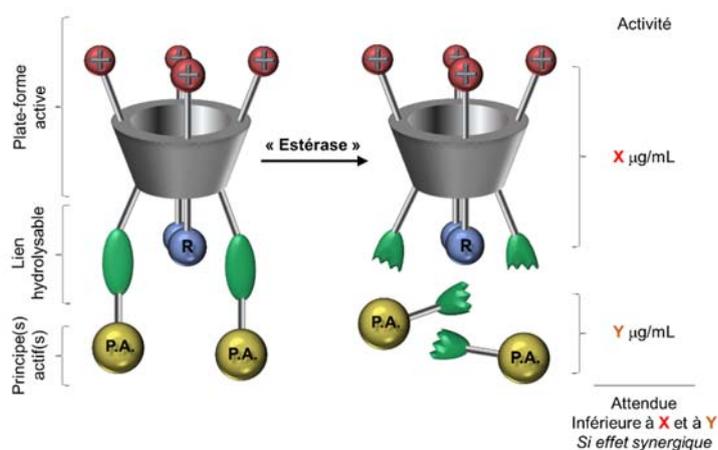
⁷¹ *E. coli* : productrice de pénicillinase, résistante à l'amoxicilline et à la ticarcilline ; *S. aureus* : SARM résistance à l'ensemble des β-lactamines (mécicilline et à la pénicilline) ; *E. faecium* : résistance à la vancomycine ; *E. Faecalis* : résistance à la vancomycine et à la teicoplanine ; *P. Aeruginosa* : présentant une résistance par efflux, résistance à la ticarcilline et à l'aztréonam

⁷² Ex : Regnouf-de-Vains *and coll.*, *Tet. Lett.*, **2001**, 42, 7033-7036 ; *Tet. Lett.*, **2003**, 44, 6769-6771 ; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 2679-2682 ; *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 7534-7540 ; *New J. Chem.*, **2012**, 36, 2060-2069

l'activité propre de la plateforme choisi et de celle du P.A. pour conduire à un effet synergique, et espérer à des valeurs faibles de CMI.



Prodrogue organosoluble de pénicilline développée au laboratoire (droite) et exemple de structure cible à visée antimycobactérienne (gauche).



L'utilisation d'une plateforme dont nous connaissons l'activité, sur laquelle seront greffés un ou plusieurs principes actifs connus (identiques ou non) de telle manière qu'ils puissent être libérés sous processus enzymatique (hydrolyse par exemple). Une fois fixée à la bactérie *via* la plateforme le (ou les) PA(s) pourra(ont) aller agir à sa (leur) cible(s).

Le lien labile utilisé sera en relation avec le type de libération recherchée et le type de fonctionnalité disponible sur le principe actif choisi. Il est également possible de disposer d'un lien espaceur entre la plateforme et le P.A. De longueur variable, celui-ci nous permettra sans doute de mettre en place une relation structure activité essentielle dans la recherche de tels composés.

Résultats attendus :

- Apport d'un effet synergique entre la plateforme active de base et le (ou les) PA(s) introduit(s).
- Nous envisageons ainsi une diminution de la dose active et donc une limitation des éventuels effets toxiques.
- Une diminution de cette dose active pourrait également être corrélée à une diminution du risque de développement de résistances.

La structure de base utilisée sera dans un premier temps un calixarène *bis-* ou *tetra-p-*guanidinium, dont l'activité antibactérienne est maintenant certaine.

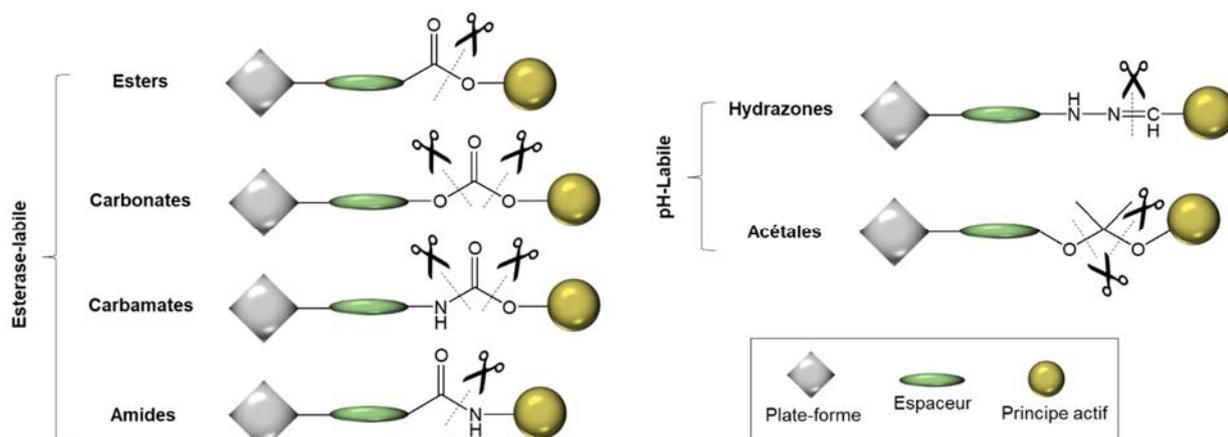
Défini comme étant un composé inactif à peu actif, une prodrogue contient le principe actif natif, qui devra être libéré par une biotransformation *in vivo* (coupure chimique ou biologique) pour pouvoir exercer son action.⁷³

⁷³ Huttunen K. *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, **2011**, 63, 750–771

Pour être plus précis il serait plus juste de parler de « prodrogue mutuelle »⁷⁴ étant donné qu'à la fois la plateforme et le P.A. libéré possèdent une activité propre.

Largement employée, la stratégie « prodrogue » permet entre autre pour un principe actif : - d'en masquer le goût ou l'odeur – d'en modifier la solubilité – d'en améliorer la stabilité chimique – d'en changer la forme physique – d'en améliorer la biodisponibilité – d'en réduire la toxicité – d'en augmenter le temps d'action – ou de le conduire à un cible spécifique....

Les exemples de liens les plus fréquemment rencontrés :



Liens labile communément employés en stratégie prodrogues

- Esters (prodrogues de fonctions carboxyles, hydroxyles ou thiols)
Une des ligations les plus utilisées, généralement facile à fabriquer il nécessite l'utilisation de fonction hydroxyle et carboxylique très présentes sur une large gamme de composés. Les estérases sont présentes un peu partout dans l'organisme et l'hydrolyse peut se faire facilement dans le sang, le foie...conduisant à la libération du principe actif⁷⁵ à des vitesses dépendantes de la structure du composé.
- Carbonates et carbamates (prodrogues de fonctions carboxyles, hydroxyles ou amines)
Ils diffèrent des esters par la présence d'un O ou d'un N de part et d'autre de la fonction carbonyle. Ils sont souvent plus stables face à des processus enzymatiques, mais deviennent plus sensibles à l'hydrolyse que des amides.
- Amides (prodrogues de fonctions carboxyles et amines)
Ils sont plus stables que les esters correspondant. Ils sont en général utilisés pour être clivables par une enzyme spécifique et permettre un ciblage plus précis.
- Hydrazones⁷⁶ (prodrogues de fonction hydrazines et carbonyles) : ce type de lien devient sensible au pH (intracellulaire par exemple au niveau des cellules cancéreuses)
- Acétales (prodrogues de fonctions éther vinylique et hydroxyle)⁷⁷. Ils sont sensibles au pH également.

⁷⁴ Ex : Dhaneshwar S. *et al.*, *Indian J. Pharm. Sci.*, **2006**, 68, 286-294 ; Ohlan *et al.*, *Int. J. Pharm. Sc. & Res.*, **2011**, 2(4), 719-729

⁷⁵ Bianca M. *et al.*, *J. Pharma. Sc.*, **2006**, 95, 1177-1195

⁷⁶ Ex : Tang H. *et al.*, *Int. J. Polym. Mater.*, **2016**, 65, 789-796 ; Zhang X.-Z. *et al.*, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 11852-11855

⁷⁷ Ex : Wei S. *et al.*, *Polymers*, **2017**, 9, 698 ; Zhao Y. *et al.*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2016**, 140, 11–18 ; Biasutto L. *et al.*, *Mol. Pharmaceutics*, **2013**, 10, 2781–2792

II. Axe II : Outils pour l'imagerie

Développement (en collaboration) de plateformes multivalentes permettant l'accroche d'antennes de reconnaissance cellulaire et de sonde pour l'imagerie médicale. Toujours pour rester dans le domaine thérapeutique je souhaite que mes travaux, jusqu'alors consacrés à la mise au point de molécules actives (antibactériennes) s'orientent vers des applications à visée diagnostique.

L'objectif final est le diagnostic de maladies, le suivi de leur évolution, la découverte de leur fonctionnement, mais aussi de mieux les soigner. Les recherches s'orientent vers la mise au point de techniques pour localiser les foyers d'infection, les cibler et activer les principes actifs uniquement à l'endroit souhaité.

Contexte :

L'évolution permanente de l'imagerie médicale incite à constamment réinventer des agents d'imagerie plus performant. L'association de l'imagerie TEP et de l'imagerie de fluorescence proche IR est une combinaison particulièrement appropriée. Les sondes radioactives et les sondes fluorescentes peuvent être détectées dans des concentrations picomolaires et fournir des informations très complémentaires. L'imagerie TEP permet d'évaluer la distribution de la sonde radioactive et cibler le tissu malade. Le signal proche IR, permet quant à lui, la chirurgie guidée par fluorescence pour l'exérèse des tumeurs⁷⁸ par exemple ou de l'histopathologie *ex vivo* pour affiner le ciblage moléculaire.

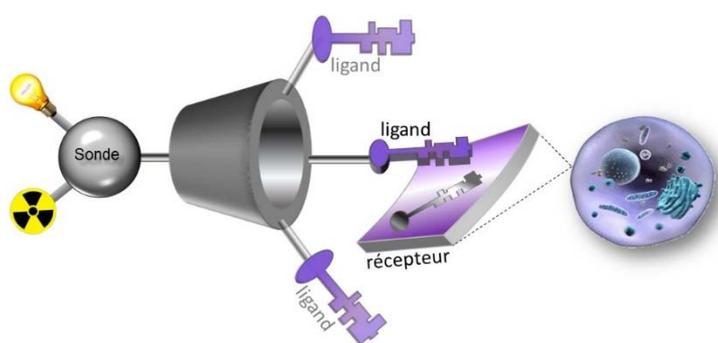
Généralement, l'imagerie duale nécessite d'avoir une sonde spécifique correspondant à chaque modalité. L'injection séquentielle d'une sonde radioactive puis fluorescente ou en « cocktail » simultané pose le problème, d'une part de la double injection subie par le patient et d'autre part de la différence de pharmacocinétique entre les deux sondes ainsi que de la contradiction dans les images finales suite aux fenêtres de temps d'images de chaque agent. Pour contourner les faiblesses de ces approches, il semble pertinent d'aller la construction de sondes duales porteuses des deux modalités.

Objectif :

L'imagerie moléculaire monomodale classique reste largement utilisé dans le diagnostic clinique. Cependant, des techniques d'imagerie moléculaires différentes, intelligemment combinées, peuvent conjuguer leurs avantages en termes de résolution spatiale et temporelle, de pénétration, de sensibilité et de coût. Le but du projet auquel je

souhaite participer est de concevoir et synthétiser des agents d'imagerie monomoléculaire (MOMIA) portant deux fonctionnalités : radioactive (^{18}F) et fluorescente proche IR. Cette sonde bimodale pourra être conjuguée à une plate-forme portant plusieurs ligands pour tirer profit du phénomène additif apporté par la multivalence, et c'est précisément à ce niveau que je devrais intervenir.

Collaboration :



⁷⁸ P. S. Low *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2013**, *24*, 1075-1080

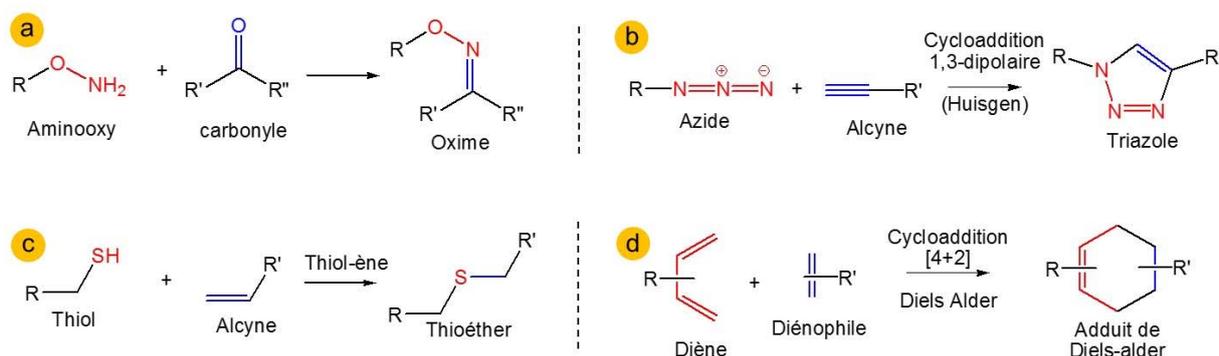
- Au sein de l'équipe pour la fabrication de la sonde et son accroche à la plateforme calixarénique.
- NancyloTEP pour tous les aspects de développement radiochimiques et imagerie TEP *in vivo* du petit animal
- CRAN (UMR 7039) en termes de fluorescence proche IR et expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

D'une manière générale, la construction d'agents d'imagerie nécessite de mettre en œuvre des techniques de ligation performantes et rapides, car l'introduction du radiomarqueur doit se faire le plus rapidement possible (décroissance rapide de radioactivité) à l'aide d'un automate. Ce travail méthodologique portera sur le développement des types de conjugaison sonde-plateforme et plateforme-ligand.

Méthodologie générale :

- Types de ligations :

Nous développerons des stratégies de synthèse utilisant des méthodes de ligation chimiosélectives (Fig. ci-dessous)⁷⁹. Ces dernières présentent l'avantage de pouvoir se faire bien souvent avec des entités non protégées, grâce à des fonctionnalités présentant une réactivité complémentaire. Ceci permet souvent de « simplifier » les stratégies de synthèse plus classique.



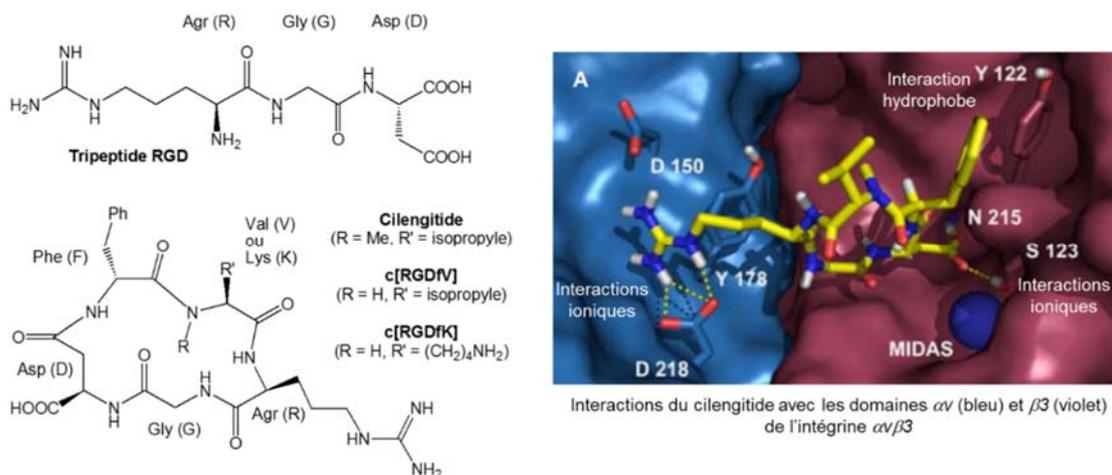
Exemples de ligation chimiosélectives envisageables. a) oxime b) click c) thiol-ène d) Diels-Alder

L'objectif final est d'arriver à une plateforme porteuse de **1 à 4 antenne(s) de reconnaissance** (en couronne haute par exemple) et porteuse, en couronne basse, d'**un bras fonctionnalisé et réactif** pour l'introduction de la sonde bimodale. Même si les concentrations utiles de tel traceurs sont de l'ordre de la picomole il est important d'avoir au final une entité hydrosoluble. Afin de s'en assurer nous garderons à disposition les trois groupements hydroxyles résiduels en couronne basse pour introduire au besoin des **fonctions hydrosolubilisantes** (ou hydrophiles).

Le tripeptide Arginyl-Glycyl-Aspartyl (RGD) est la séquence que nous avons choisie comme modèle en tant qu'entité de reconnaissance. Ce tripeptidique RGD a la capacité de cibler certaines tumeurs cancéreuses. En effet, les intégrines plus particulièrement les intégrines $\alpha v \beta 3$ présentes dans

⁷⁹ Bode J. W. *et al.* *ACS Chem. Biol.*, **2015**, *10*, 1026–1033 ; Tiefenbrunn T. K., Dawson P. E. *Biopolymers*, **2010**, *94*, 95–106. Langenhan J. M. et Thorson J. S., *Curr. Org. Synth.*, **2005**, *2*, 59-81, Bertozzi R. *et al.*, *Trends in Biotechnology*, **1998**, *16*, 506-513

plusieurs protéines matricielles extracellulaires reconnaissent cette séquence tripeptidique⁸⁰ et ce type de peptides s'est avéré utile pour cibler l'angiogenèse tumorale. Cette intégrine est une excellente cible pour l'imagerie de tumeurs⁸¹.



A gauche : représentation du tripeptide RGD et dérivés cycliques ; à droite : le cilengitide au sein de la cavité de l'intégrine $\alpha_5\beta_3$.

Un exemple connu, le pentapeptide cyclique c[RGDf(N-Me)V] (Cilengitide⁸², Fig. ci-dessus), premier antagoniste de l'intégrine à avoir été testé dans de multiples essais cliniques⁸³, récemment en cours d'études de phase II pour le traitement de cancer du poumon⁸⁴ (après un échec en phase III pour le traitement de patients atteints de glioblastome (tumeur cérébrale) nouvellement diagnostiqué⁸⁵ et en phase I en association avec le paclitaxel⁸⁶). Autres bien connus sont le cyclo [RGDfV] (Fig. ci-dessus) peptide parent du cilengitide et le cyclo [RGDfK] (Fig. ci-dessus), qui a été largement utilisé comme motif de ciblage pour le diagnostic ciblé du cancer et des études thérapeutiques.

A travers le travail de Saïd El Khezraji (M2) nous avons entre autre, commencé à initier un travail concernant l'introduction de motifs peptidiques utilisant par exemple le genre de liaison chimiosélective décrite précédemment (*via* oxime ou click). Ce travail préliminaire s'est orienté vers la bis-fonctionnalisation du calixarène (couronne haute) afin d'aller dans un premier temps vers une structure porteuse de deux antennes de reconnaissance peptidiques.

⁸⁰ Arosio D. *et al.*, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **2017**, *12*, 148-168 ; Gennari C. *et al.* *Current topics in medicinal chemistry*, **2016**, *16*, 314-329 ; Kessler H. *et al.* *Scientific Reports* **7**, **2017**, article number 39805.

⁸¹ Haubner R. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, *15*, 61-69 ; Hancheng D. et Conti P. S., *J. Labelled Comp. Radiopharm.*, **2013**, *56*, 264-279 ; Wester H.-J., *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 969-980. Beer A. J. *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2012**, *39*, 126-138 ; Beer A. J. *et al.*, *Theranostics*, **2011**, *17*, 48-57.

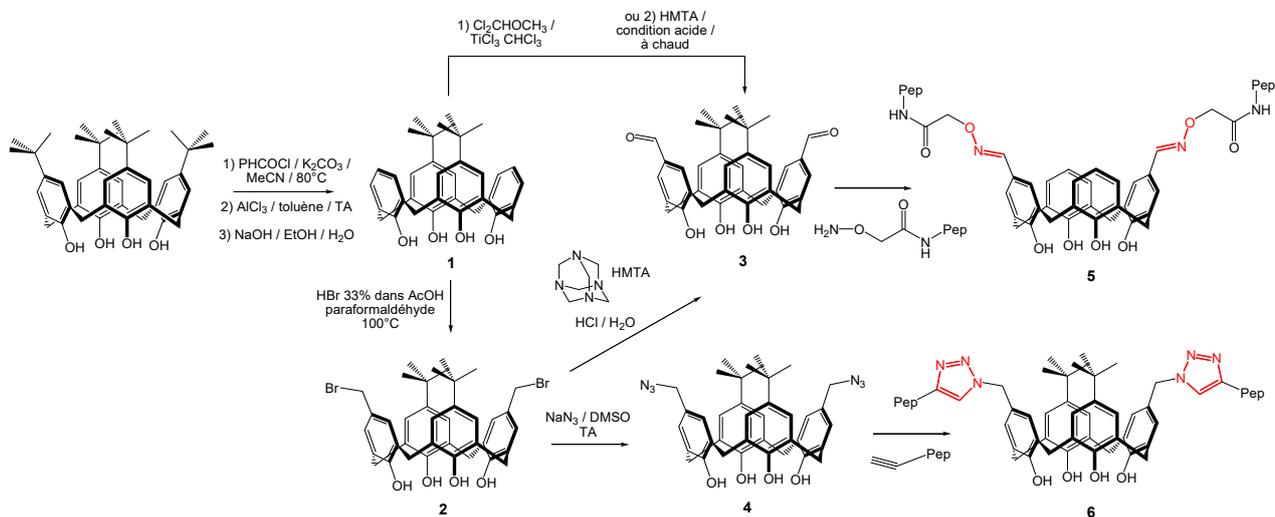
⁸² Kessler H. *et al.* *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.

⁸³ Kessler H. *et al.*, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2010**, *10*, 753-768.

⁸⁴ Vansteenkiste J. *et al.*, *Annals of Oncology*, **2015**, *26*, 1734-1740.

⁸⁵ *Lancet Oncol.*, **2014**, *15*, 1100-1108.

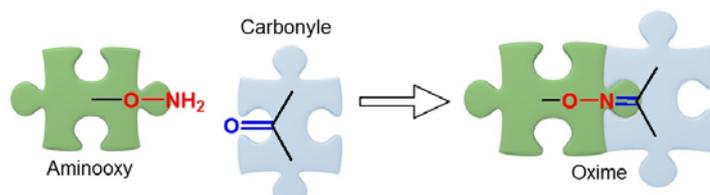
⁸⁶ Haddad T. *et al.* *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2017**, *79*, 1211-1227.



Voies d'accès envisagées pour l'obtention de plateforme bis-peptidiques

Oxime

Nous avons choisi dans un premier temps le lien oxime car il apparaît être une technique très efficace pour la bioconjugaison⁸⁷. Il nécessite l'utilisation de fonctions aldéhyde et oxyamine pouvant être facilement introduite sur les chaînes latérales de certains acides aminés. Très chimiosélective et rapide cette réaction n'interfère pas avec la plupart des groupes fonctionnel présent sur les biomolécules. Si les imines se trouvent être instables en milieu aqueux (limitant leurs utilisations pour les applications biologiques) les oximes se trouve être très stable *in vitro* et *in vivo*⁸⁸ en milieu physiologique. Stabilité probablement dû en partie à la délocalisation électronique entre l'oxygène et la double liaison, réduisant ainsi le caractère électrophile du carbone sp^2 et limitant l'attaque de H_2O ⁸⁹. Seules des conditions fortement acides peuvent l'hydrolyser des liaisons oximes, ce qui rend ce lien idéal *in vivo* et pour diverses utilisations biologiques. (synthèse de peptides⁹⁰, glycopeptide⁹¹, marquage de protéines⁹², sucres et glycoconjugués⁹³, agents anti-cancereux⁹⁴).



⁸⁷ Kölmel D. K. et Kool E. T., *Chem. Rev.*, **2017**, *117*, 10358-10376 ; Dumy P. et al. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 34-41 ; Tiefenbrunn T. K., Dawson P. E. *Biopolymers*, **2010**, *94*, 95-106.

⁸⁸ Dumy P. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730-5739.

⁸⁹ Kalia J. Raines R. T., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523-7526.

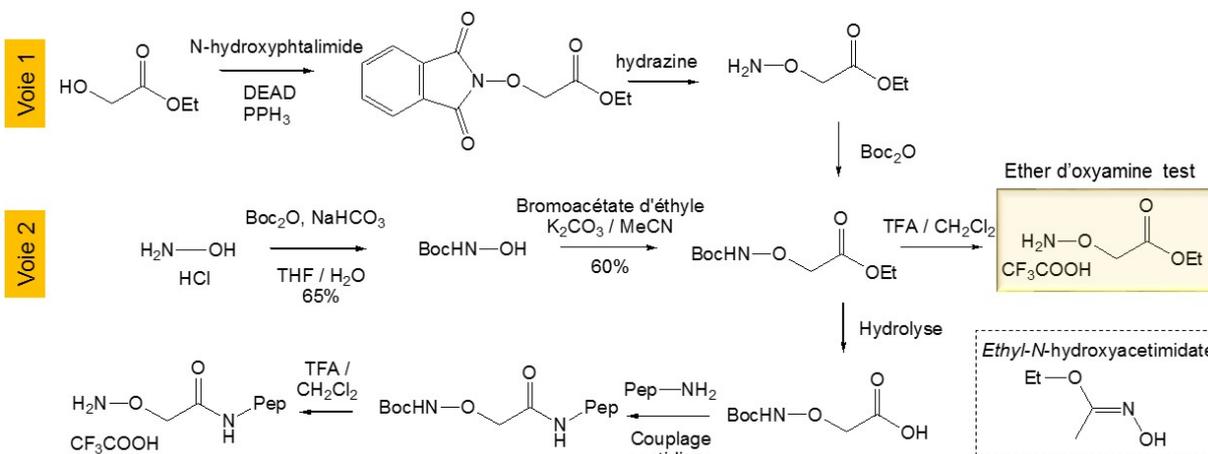
⁹⁰ Dawson et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8665-8668 ; Delmas A. F. et al., *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 5536-5543 ; Roberts et al. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 659-665.

⁹¹ Pöhner et al., *Tet. Lett.*, **2014**, *55*, 2197-2200 ; Hang H. C., Bertozzi C., *Acc. Chem. Res.*, **2001**, *34*, 727-736.

⁹² Hamachi I. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, DOI: 10.1021/jacs.7b07339

⁹³ Renaudet O. et al., *Chem. Rev.* **2017**, 9839-9873.

⁹⁴ Montiel-Smith S. et al., *Steroids*, **2017**, *122*, 24-33 ; Qin H.-L. et al. *Chem Biol Drug Des.* **2017**, *90*, 443-449 ; Sánchez-Sánchez L., *Molecules*, **2016**, *21*, 1533.

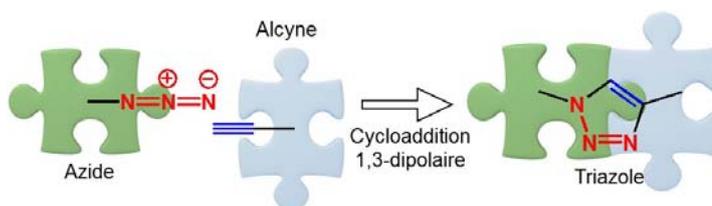


Stratégies de synthèse de peptides aminoxy fonctionnalisés

Les 1^{ers} essais permettant l'obtention, *in fine*, du peptide aminoxy fonctionnalisés l'ont été *via* réaction de Mitsunobu entre l'hydroxyphthalimide et l'hydroxyacétate d'éthyle (voie 1 fig. ci-dessus). Mais les résultats semblent bien moins positifs qu'une voie utilisant directement l'hydroxylamine (voie 2 fig. ci-dessus). Aisément protégé (*N*-Boc) cette dernière réagit simplement avec le bromoacétate d'éthyle. L'ester obtenu pourra subir une déprotection directe et nous servir d'éther d'oxyamine de référence pour la mise au point de la ligation avec le calixarène. Pour y greffer le peptide cet ester sera simplement hydrolysé et l'acide 2-bocaminoxyacétique obtenu subira ensuite un couplage peptidique et une déprotection finale pour libérer la fonction aminoxy. Néanmoins dans ces conditions l'azote de la fonction aminoxy reste réactif lors du couplage peptidique suivant. Ceci risque d'entraîner des réactions secondaires de *N*-acylation comme l'on montré Dumy *et al.*⁹⁵. La même étude annonce une certaine fragilité avec une fonction aminoxy doublement protégée (*N,N'*-*boc*). Une alternative pourra être la protection de l'oxyamine *via* l'utilisation d'un groupement 1-éthoxyéthylidène : formation d'un *N*-hydroxyacetimidate (Fig ci-dessus). Cette protection peut être éliminée dans des conditions acides douces et pourrait ainsi être utilisée si nous souhaitons construire pas à pas le peptide directement sur la fonction de ligation⁶⁶⁻⁹⁶.

Triazole

La cycloaddition de Huisgen aussi appelée réaction de *Click Chemistry* est hautement régiosélective quand elle est catalysée avec du cuivre (copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC))⁹⁷ et donne d'excellents rendements, dans des conditions douces et des temps courts. L'approche reste relativement équivalente à celle envisagée pour le greffage de peptide *via* un lien oxime. En effet j'envisage l'utilisation du composé réactif intermédiaire **2** dihalogéné dont le déplacement des bromes par l'azidure conduit au dérivé bis-N₃ **5** directement utilisable en chimie click. L'introduction de n'importe quel peptide présentant un bras alcyne permettra dans des conditions douces d'obtenir le dérivé attendu **6**. Déjà développée au laboratoire cette technique d'accroche (sur



⁹⁵ Dumy P. *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 983-8991.

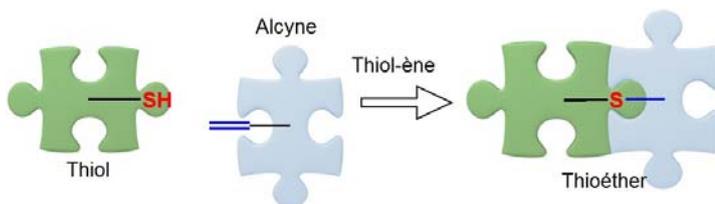
⁹⁶ Kelly J. W. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 1576-1587.

⁹⁷ Medal A. *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064 ; Sharpless K. B. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.

plateforme saccharidiques) de divers peptides (Glutation, RGD...) ⁹⁸ devrait donc être tout à fait transposable sur la plateforme calixarénique.

Thiol-yne

Le couplage photoinduit thiol-ène est une méthode de ligation assez récente. Le grand potentiel de cette réaction à haut rendement qui ne nécessite pas de catalyseur métallique et qui est compatible avec l'oxygène et l'eau est largement exploité dans la synthèse de polymères et de matériaux ⁹⁹. Son utilisation en chimie organique est encore relativement discrète, même si son intérêt comme outil de ligation puissant pour assembler des fragments moléculaires est indéniable notamment dans la chimie de sucres et des peptides. En effet, elle peut être mise en œuvre avec des peptides contenant un résidu cystéine. ¹⁰⁰ L'assemblage de biomolécules dans ces conditions de réaction douces *via* la formation spécifique de ponts sulfures robustes est un outil séduisant.



Ces réactions procèdent rapidement avec de bons rendements. Le grand avantage de ces stratégies de ligation par rapport à d'autres méthodes existantes est que les peptides peuvent être utilisés sous leur forme native sans aucune modification/activation chimique.

Les possibilités de fonctionnalisation de la plates-formes calixarénique seront exploitées pour permettre une présentation multivalente d'un ligand de récepteur biologique. Mais aussi pour intégrer un bras fonctionnel, triple liaison par exemple pour un couplage CuAAC, ou thiol pour un couplage de type thiol-ène avec la sonde duale.

- Introduction de la sonde duale

En collaboration avec le Dr. S. Lamandé-Langle et le Dr. N. Pélegrini-Moïse.

Dans le cadre de ce projet la sonde radiomarquée, développée en parallèle, devra au final être accrochée de manière douce et rapide la plateforme porteuse des antennes de reconnaissance peptidiques. Parmi les stratégies de couplage variées seront privilégier celles de type « Click » : thiol-ène et CuAAC citées précédemment. Le développement de nouvelles techniques de conjugaison de type "Click", applicables à la radiochimie, est primordial. En effet, le radiomarquage de biomolécules implique incontestablement sa ligation avec une sonde radioactive. Ainsi mettre au point une technique de couplage innovante en conditions douces avec de bons rendement tout en modifiant le moins possible la biomolécule est toujours un grand enjeu chimique.

Le bras d'accroche de la sonde dual devra ainsi s'adapter au type de groupement fonctionnel proposé par la sonde.

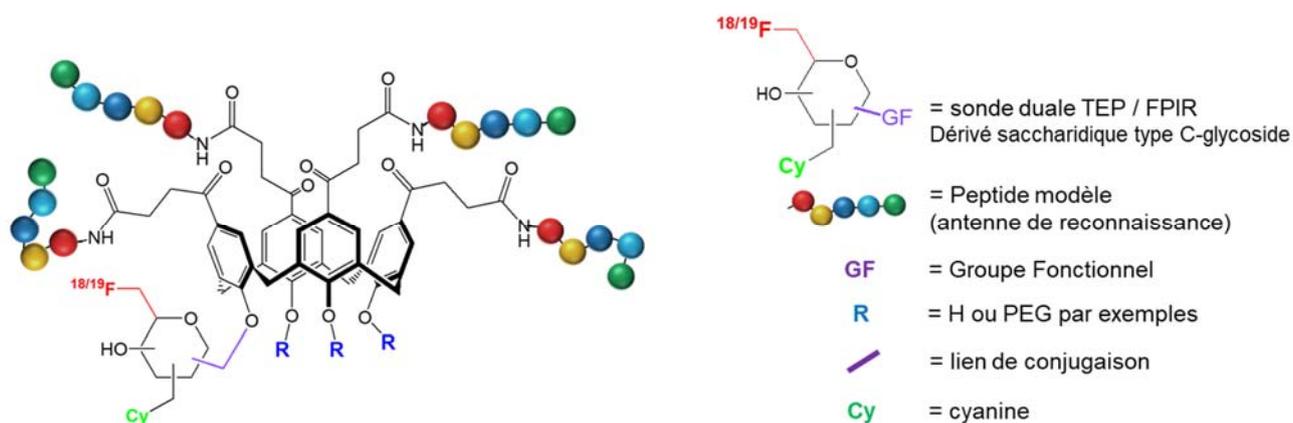
- Hydrosolubilité

⁹⁸ Exemple : Lamandé-Langle S. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 6672-6683.

⁹⁹ Lowe A. B., *Polym. Chem.*, **2010**, *1*, 17-36 ; Kade M. J. *et al.*, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2010**, *48*, 743-750 ; Bowman C. N. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1540-1573 ; Bowman C. N. *et al.*, *Chem. Mater.*, **2014**, *26*, 724-744. Bordini A. V. *et al.*, *RSC Advances*, **2016**, *81*, 77410-77426 ; Araujo P. H. H. *et al.*, *European Polymer Journal*, **2017**, *86*, 200-215.

¹⁰⁰ A. Dondoni, A. Massi, P. Nanni, A. Roda, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 11444-11449 ; Dondoni A. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 3269-3277 ; Pellegrini-Moïse N. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2632.

Un critère important concernant ce type de structure administrée par injection, va être la solubilité. Si les quantités nécessaires en imagerie sont très faibles, la structure développée devra présenter tout de même une solubilité suffisante. Outre le fait d'augmenter considérablement l'affinité d'un ligand pour sa cible (très utile en imagerie moléculaire) la formation de système multivalent (2 à 4 antennes de reconnaissance peptidiques) devrait peut-être nous permettre d'apporter une hydrosolubilité suffisante. Néanmoins pour pallier à ce problème éventuel nous prévoyons la possibilité d'introduire en couronne basse du calixarène une ou plusieurs fonctionnalités hydrophiles par exemple. Ainsi l'hydrosolubilité des systèmes biocompatibles pourra être modulée grâce à des fonctions de type éther hydrophile (PEG par exemple).



Exemple de structure visée porteuse d'une sonde duale et d'éléments de reconnaissance

III. Conclusion Projet de Recherche

Ces deux grands axes de recherche constitueront mes principales activités pour les années à venir. Dans les deux cas, il s'agit d'un travail de méthodologie de synthèse, concernant la multifonctionnalisation régiosélective de la plateforme calixarénique qui nous offre une multitude de possibilités. Il s'agira bien entendu d'un travail d'équipe et surtout d'un travail pluridisciplinaire. En relation étroite avec des collègues biologistes, en autres, seront mis en place des études de relations structure activité grâce à un aller-retour permanent d'informations permettant d'orienter le développement des futures structures.

Ce challenge synthétique est en adéquation avec certaines problématiques actuelles en santé publique :

- *Ce projet s'inscrit plus particulièrement dans la problématique inquiétante de l'infectiologie bactérienne. Aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'ayant été développée ces dernières années, les antibiotiques existant pourraient s'avérer rapidement insuffisant pour combattre les résistances et multirésistances en augmentation croissantes.*
- *Il s'inscrit également dans une demande croissante de nouveaux outils d'imagerie. Il pourrait ainsi apporter une contribution au diagnostic précoce de certains cancers avec le développement d'outils plus sélectifs et performant.*

Publications significatives

- **M. Mourer**, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, *16*, 2960-2963, « Functional Organisation and Gain of Activity: The Case of the Antibacterial tetra-*para*-Guanidinoethyl-Calix[4]arene »
DOI : 10.1016/j.bmcl.2006.02.072
- **M. Mourer**, H. Massimba Dibama, S. Fontanay, M. Grare, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*, 5496-5509, « *p*-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation »
DOI : 10.1016/j.bmc.2009.06.040
- **M. Mourer**, H. Massimba Dibama, P. Constant, M. Daffe, J.B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (6), 2035-2041, « Antimycobacterial activities of some cationic and anionic calix[4]arene derivatives »
DOI : 10.1016/j.bmc.2012.01.041
- H. Massimba Dibama, **M. Mourer**, R. E. Duval, J.-B. Regnouf-de-Vains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, *24*, 4791-4793, « Poly-guanidinoethylphenylethers organized around a benzene ring: synthesis and evaluation of their antibacterial and cytotoxic properties »
DOI : 10.1016/j.bmcl.2014.09.013
- F. Lemée, **M. Mourer**, L. Aranda, I. Clarot, J.-B. Regnouf-de-Vains, *New Journal of Chemistry*, **2016**, *40*, 8239-8250, « Bacteriophilic tetra-*p*-Guanidinoethyl-Calix[4]arene Derived Polymers. Syntheses and *E. coli* Sequestration Studies. »
DOI : 10.1039/c6nj01563h