

Thèse

Présentée par

Nivine ALNAGA

Pour obtenir le titre de :

Docteur de l'Université Joseph Fourier (Grenoble 1)

Spécialité : CHIMIE

Synthèse de la Quinolobactine, de l'Entérobactine et leurs dérivés. Etudes de la complexation du fer

Soutenue le 26 novembre 2007 devant la Commission d'Examen constituée par :

M. Jean-Pierre DUTASTA, ENS de Lyon,	Rapporteur
Mme Isabelle MICHAUD-SORET, CENG CNRS,	Examineur
M. Jean-Louis PIERRE, Université Grenoble 1,	Examineur
Mme Clotilde POLICAR, Université Paris-Sud-Orsay,	Rapporteur
M. Amaury Du MOULINET D'HARDEMARE, Université Grenoble 1, Directeur de thèse	
M. Guy SERRATRICE Université Grenoble 1,	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1, au sein du Département de Chimie Moléculaire (DCM) dirigé par Professeur Pascal DUMY.

En premier, je tiens à remercier Madame Clotilde POLICAR, Maître de Conférences à l'Université Paris-Sud et Monsieur Jean-Pierre DUTASTA, Directeur de Recherches au CNRS-Lyon, mes rapporteurs de thèse, ainsi que Madame Isabelle MICHAUD-SORET, Directeur de Recherche au CNRS-Grenoble, pour avoir bien voulu examiner ce travail et avoir aimablement consenti de participer au jury de cette thèse.

Je remercie Professeur Jean-Louis PIERRE, de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je remercie Monsieur Guy SERRATRICE, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, mon co-directeur de thèse, pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à Monsieur Amaury Du MOULINET D'HARDEMARE, pour m'avoir offert la chance de travailler avec lui et sous sa direction scientifique. Je le remercie pour son soutien et encouragement tout le long de ma thèse, ainsi que pour ses conseils, sa disponibilité et sa rigueur.

Je tiens également à remercier Stéphane, Catherine, Jérémy, Olivier, Naveen, Marie-Hélène, Gisèle et un remerciement particulier à ma chère Houda avec laquelle j'ai partagé de très bons moments.

Je remercie évidemment mes proches de cœur : mes parents, mes frères, Djamel et Ihab et ma sœur, Samar, pour leurs encouragements, malgré la distance, et pour leurs prières.

J'exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude envers mon cher frère Ahmed. Merci, pour sa présence, son soutien et son aide.

Enfin, je n'oublierai pas bien sûr de remercier mon cher Adel, pour sa présence, sa patience et ses prières pour moi.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1. ORIGINE ET IMPORTANCE DU FER DANS LA NATURE.....	1
1.1.1. Origine de l'élément fer.....	1
1.1.2. Abondance et bio-disponibilité du fer sur Terre.....	2
1.1.3. Acquisition du fer par les micro-organismes : les sidérophores.....	3
1.1.4. La nature des sidérophores.....	4
1.1.4.1. Les sidérophores de basse affinité pour le fer.....	5
1.1.4.2. Les sidérophores de haute affinité pour le fer.....	7
➤ Les sidérophores de type catéchol.....	9
a) Les sidérophores <i>tris</i> -bidentés.....	9
b) Les sidérophores <i>bis</i> -bidentés et « <i>mono</i> »-bidentés.....	12
➤ Les sidérophores de type acide hydroxamiques.....	13
a) Les sidérophores <i>tris</i> -bidentés.....	13
b) sidérophores <i>bis</i> -bidentés.....	17
1.1.5. Les phyto-sydérophores.....	18
1.1.6. Le mécanisme du transport de Fer.....	19
• Le modèle du transport de la ferri-Entérobactine (FeEnt) par navette de sidérophore.....	23
• Les modèles de transport de FeEnt dit « pore transient » et « bal and chain ».....	24
1.2. LES SIDEROPHORES BIOMIMETIQUES ET LEURS APPLICATIONS.....	26
1.2.1. Sidérophores biomimétique et nutrition en fer.....	27
1.2.2. Sidérophores bio-mimétiques et inhibition du transport du fer.....	28
1.2.3. Vectorisation d'antibiotiques, la stratégie du « cheval de Troie ».....	29
1.2.4. Synthèse d'inhibiteurs de formation de biofilms.....	30

1.2.5. Les sidérophores bio-mimétiques et les applications chez l'Homme.....30

1.3. LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL.....32

1.3.1. La Quinolobactine, caractérisations physico-chimiques.....32

1.3.2. Synthèse, caractérisation et évaluation de dérivés de l'Entérobactine.....33

CHAPITRE 2 : SYNTHESSES DE LA

QUINOLOBACTINE, DE LA QUINOLOBACTINE

FLUOREE ET D'ACIDES 4-QUINOLENIQUES.

ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPLEXES

DU FER ET DU GALLIUM.....35

2.1. Synthèse de la Quinolobactine (Q).....35

2.2. Synthèse de la quinolobactine fluorée (QF).....37

2.3. Une nouvelle voie d'accès direct aux acides quinoline-4-carboxyliques.....41

2.3.1. Les grandes voies de synthèse menant à de dérivés de quinoléine.....42

a) Synthèse de Skraup-Doebner-Von-Miller.....42

b) Synthèse de Friëdlander.....43

c) Synthèse de Povarov.....46

2.4. Synthèse et caractérisation des complexes du fer ou du gallium avec la Quinolobactine.....57

2.4.1. Avec le gallium.....57

2.4.2. Avec le fer.....58

2.5. Synthèse et caractérisation des complexes de la quinolobactine fluorée (QF) avec le gallium et le fer.....64

2.5.1. Avec le gallium.....64

2.5.2. Avec le fer.....	68
2.6. Etude physico-chimique de la quinolobactine fluorée.....	68
2.6.1. Introduction.....	69
♦ Définitions.....	69
2.6.2. Méthodes expérimentales.....	71
2.6.3. Résultats et discussions.....	72
♦ Les constantes d'acidité.....	72
Titration spectrophotométrique.....	73
Mesures de pH.....	73
• Détermination de pKa1 dans la gamme pH = 5,04 - 9,07.....	74
• Détermination de pKa2 dans la gamme pH = 10,12 - 11,02.....	75
♦ Les constantes de complexation du Fer.....	76
➤ pH = 2,81 – 4,28.....	77
➤ pH = 4,41 – 7,62.....	77

CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE D'ENTEROBACTINE ET DE SES ANALOGUES.....81

3.1. Synthèse de l'Entérobactine naturelle.....	81
3.1.1. Synthèse de la trilactone de la sérine.....	83
3.1.2. Protection et fluoruration de l'acide 1,2-dihydroxybenzoïque.....	85
3.1.3. Couplage trilactone-fluorure d'acide, puis débenzylation.....	87
3.1.4. Synthèse directe de l'Entérobactine.....	87
3.1.5. Conjugaison de l'Entérobactine avec des dérivés du bore et du phosphore : préparation d'inhibiteurs potentiels du transport du fer.....	88
• Antimétabolites dérivant du phosphore.....	90
3.2. Synthèse de la Salibactine.....	92
3.2.1. Essais des couplages Salibactine-POCl ₃	93

• Formation d'antimétabolites dérivant des acides boronique et borique.....	96
3.3. Synthèse de l'Entérobactine-Cyprofloxacin un cheval de Troie potentiel.....	104
3.4. Synthèse de l'Oxinobactine.....	107
3.4.1. Obtention de la 7-carboxy-8-hydroxyquinoléine <u>51</u>	108
3.4.2. Obtention de la 7-carboxy-8-dibenzyloxyquinoléine.....	109
3.4.3. Obtention du fluorure d'acide.....	110
3.4.4. Obtention de l'oxinobactine benzylée.....	110
3.4.5. Synthèse direct de l'Oxinobactine.....	112
3.5. Etude spectrophotométrique UV-Visible de l'Entérobactine et de ses analogues.....	113
3.5.1. Etude du ligand Entérobactine et son ester <u>35</u>	113
➤ Complexation Entérobactine/Fer.....	114
Mesures de pH.....	115
➤ Complexe ENTB/Fer.....	118
3.5.2. Etude de la Salibactine.....	120
3.5.3. Etude de l'Oxinobactine.....	121

CHAPITRE 4 : PARTIE EXPERIMENTALE.....127

4.1. Généralités.....	127
4.1.1. Chromatographies.....	127
4.1.2. Resonances Magnétique Nucléaire (RMN).....	127
4.1.3. Point de fusion.....	128
4.1.4. Spectre de masse.....	128
4.1.5. Analyses élémentaires.....	128
4.1.6. Rayons X.....	128

4.2. Acide 8-hydroxy-4-méthoxy-quinoline-2-carboxylique (Quinolobactine)	
<u>4</u>	129
4.3. 4-fluoro-2-nitro -phénol <u>5</u>	130
4.4. 1-benzyloxy-4-fluoro-2-nitro-benzène <u>6</u>	131
4.5. 2-benzyloxy-4-fluoro-2-aniline <u>7</u>	132
4.6. 2-(2-benzyloxy-5-fluoro-phenylamino)-but-2-énedioate de diméthyle	
<u>8</u>	133
4.7. 8-benzyloxy-5-fluoro-4-hydroxy-quinoline-2-carboxylate de méthyle	
<u>9</u>	134
4.8. 2-(2-benzyloxy-5-fluoro-phenylamino)-but-2-énedioate de diéthyle	
<u>10</u>	135
4.9. 8-benzyloxy-5-fluoro-4-hydroxy-quinoline-2-carboxylate d'éthyle	
<u>11</u>	136
4.10. 8-benzyloxy-5-fluoro-4-méthoxyquinoline-2-carboxylate de	
méthyle <u>12</u>	137
4.11. 5-fluoro-8-hydroxy-4-méthoxyquinoline-2-carboxylate de méthyle	
<u>13</u>	139
4.12. Acide 5-fluoro-8-hydroxy-4-méthoxyquinoline carboxylaique <u>14</u>	140
4.13. 6-Oxo-7-9-dihydro-5-oxa-9-aza-benzocycloheptène-8-carboxylate de	
méthyle <u>15</u>	141
4.14. 2-(2-méthoxy-phénylamino)-but-2-énedioate de diméthyle ; <u>16</u>	142
4.15. Acide 8-Méthoxy-2-méthylquinoline-4-carboxylique <u>19</u>	144
4.16. 8-Méthoxy-2-méthylquinoline-4-carboxylate de potassium <u>20</u>	145
4.17. 8-hydroxyphénylamide de l'acide 8-hydroxy-2-méthylequinoline-4-	
carboxylique <u>21</u>	147
4.18. 1,2- diméthoxy-4,5-diamino-benzène <u>22</u>	148
4.19. Acide 8-amino-5,6-diméthoxy-2-méthylquinoline-4-	
carboxylique <u>23</u>	148

4.20.	Acide	5,6,7-Triméthoxy-2-(pyridin-2-yl)-quinoline-4-carboxylique <u>24</u>	149
4.21.	[1,3,6,8]-tétraoxa-[2,7]-distannedecane-2,7-dioxyde :	Stannoxane <u>25</u>	150
4.22.	<i>N</i> - tristrityl - <i>L</i> -serinate de méthyle <u>26</u>		151
4.24.	Acide 2,3-dibenzyloxy-benzoïque <u>28</u>		152
4.25.	Fluorure de 2,3- <i>bis</i> -benzyloxy-benzoïque <u>29</u>		153
4.26.	Fluorure de 2,3- <i>bis</i> -hydroxy-benzoïque <u>30</u>		154
4.27.	Tri-chlorhydrate de 3,7,11-triamino-1,5,8-trioxa-cyclododécane-2,6,10-trione <u>31</u>		155
4.28.	<i>N</i> -[7,11- <i>bis</i> (2,3-dibenzyloxybenzoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxa-cyclododec-3-yl]2,3-dibenzyloxy benzoxylamide : L'Entérobactine benzylée <u>32</u>		156
4.29.	<i>N</i> -[7,11- <i>bis</i> (2,3-dihydroxybenzoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxa-cyclododec-3-yl]-2,3-dihydroxy benzoxylamide : Entérobactine <u>33</u>		157
4.30.	Couplage entre l'acide méthylboronique et l'Entérobactine <u>34</u>		158
4.31.	Couplage entre l'acide 4-fluoro 3-chlorophénylboronique et l'Entérobactine.....		158
4.32.	1-cyclopropyl-1,4-dihydro-6-fluoro-4-oxo-7-(<i>N</i> -Boc-pipérazinylquinoline)-3-carboxylate d'allyle <u>36</u> ; ciprofloxacine protégée		159
4.33.	Chlorhydrate de 1-cyclopropyl-1,4-dihydro-6-fluoro-4-oxo-7-pipérazinylquinoline-3-carboxylate d'allyle <u>37</u>		160
4.34.	Acide 4-(4,4,5,5-tétraméthyl-[1,3]-dioxo-2-borolan-2-yl)-benzoïque <u>38</u>		161
4.35.	Fluorure de 4-(4,4,5,5-tétraméthyl-[1,3]-dioxo-2-borolan-2-yl)-benzoyle <u>39</u>		161

4.36. 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-{4-[4,4,5,5-tétraméthyl-[1,3]-dioxo-2-borolan-2-yl)-benzoyl]-piperazin-1-yl}-1,4-dihydro-quinoline-carboxylate d'allyle <u>40</u>	162
4.37. Couplage enter le composé <u>40</u> et l'Entérobactine <u>33</u> : le composé <u>41</u>	163
4.38. Couplage enter le triéthylborate et l'Entérobactine <u>42</u>	164
4.39. Les essais de couplage de l'Entérobactine <u>33</u> avec les dérivés phosphorés.....	165
4.40. Acide 2-benzyloxy-benzoïque <u>44</u>	166
4.41. Fluorure de 2-benzyloxy-benzoïque <u>45</u>	167
4.42. <i>N</i> -[7,11- <i>bis</i> (2-benzyloxybenzoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxa-cyclododec-3-yl]-2-benzyloxy benzoxylamide <u>46</u>	168
4.43. <i>N</i> -[7,11- <i>bis</i> (2-hydroxybenzoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxa-cyclododec-3-yl]-2-hydroxybenzoxylamide : Salibactine <u>47</u>	169
4.44. Acide 3-benzyloxy-benzoïque <u>49</u>	171
4.45. Fluorure de l'acide 3-benzyloxy-benzoïque <u>50</u>	172
4.46. Acide 8-hydroxy quinoline-7-carboxylique <u>51</u>	173
4.47. 8-hydroxyquinoline-7-carboxylate de méthyle <u>52</u>	174
4.48. 8-benzyloxyquinoline-7-carboxylate de méthyle <u>53</u>	175
4.49. Acide 8-benzyloxy quinolinique <u>54</u>	176
4.50. Fluorure de 8-benzyloxy-quinoline-7-carbonyle <u>55</u>	176
4.51. Fluorure de 8-hydroxy-quinoline-7-carbonyle <u>56</u>	178
4.52. <i>N</i> -[7,11- <i>bis</i> (8-benzyloxyquinoline-7-carbamoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxa-cyclododec-3-yl]-8-benzyloxyquinoline-7-carbamide <u>57</u>	179
4.53. <i>N</i> -[7,11- <i>bis</i> (8-hydroxyquinoline-7-carbamoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxa-cyclododec-3-yl]-8-hydroxyquinoline-7-carbamide : Oxinobactine <u>58</u>	180
4.54. Acide 2,3-difluoro-5,6-diméthoxy-benzoïque <u>59</u>	181
4.55. Acide 2,3-difluoro-5,6-dihydroxy-benzoïque <u>60</u>	182

4.56. Acide 2,3-dibenzyloxy-5,6-difluoro-benzoïque <u>61</u>	183
4.57. 1,2-dibenzyloxy-4,5-dichloro-benzène <u>62</u>	184
4.58. Acide 2,3-dibenzyloxy-5,6-dichloro benzoïque <u>63</u>	185
4.59. Acide 2,3-dibenzyloxy-5,6-dichloro-1,4-dibenzoïque <u>64</u>	186
4.60. 2,3-dibenzyloxy-5,6-dichloro-1,4-benzoate de diméthyle <u>65</u>	187
4.61. 1,2-diallyloxy-4,5-dichloro benzène <u>66</u>	188
4.62. Acide 2,3-diallyloxy-5,6-dichloro benzoïque <u>67</u>	189
4.63. Acide 2,3-diallyloxy-5,6-dichloro-1,4-dibenzoïque <u>68</u>	190
CONCLUSION GENERALE.....	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	195

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1. ORIGINE ET IMPORTANCE DU FER DANS LA NATURE

1.1.1. Origine de l'élément fer

L'Astrophysique démontre que les éléments chimiques les plus légers H, He et Li, ainsi que des traces de béryllium et de bore, se sont formés lors du Big-bang (processus dit de nucléosynthèse primordiale). Les éléments plus lourds, à partir du carbone, sont quant à eux produits au cours des réactions nucléaires à l'œuvre au cœur des étoiles (processus dit de nucléosynthèse stellaire). Le **Tableau 1** indique les cinq étapes de fusion des éléments qui peuvent donner lieu à ce processus de nucléosynthèse stellaire.

Etape	Température (K)	Masse volumique (Kg/m ³)	Durée
Fusion H	$4 \cdot 10^7$	5000	$7 \cdot 10^6$ ans
Fusion He	$2 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$ ans
Fusion C	$6 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	600 ans
Fusion O	$1.5 \cdot 10^9$	10^{10}	6 mois
Fusion Si	$2.7 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^{10}$	1 jour
Effondrement du cœur	$5.4 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^{12}$	1/4 s

Tableau 1 : Les étapes de fusion dans les étoiles.

C'est au cours de la dernière étape de fusion qui est réalisable au sein d'une étoile que deux atomes de silicium (^{14}Si) donnent naissance au fer (^{26}Fe). Seules les étoiles plus massives que le Soleil, où la température est nettement

supérieure à 15 millions de degrés, sont capables d'assurer la fusion du carbone, de l'oxygène et du silicium. Comme on le voit, le fer tient déjà une place particulière dans l'univers car la nucléosynthèse stellaire conduit inexorablement à cet élément. En effet, au delà de celui-ci (pour $A = 26$ et $Z = 56$), le bilan énergétique de liaison entre les nucléons est défavorable, d'exothermique la fusion nucléaire devient endothermique : c'est la limite dite du fer de la nucléosynthèse stellaire. L'exceptionnelle stabilité du noyau de fer explique donc son pic d'abondance. Les éléments plus lourds que le fer résultent eux de phénomènes d'addition de neutrons beaucoup plus lents se produisant dans des conditions thermodynamiques défavorables, ce qui explique la faible abondance des éléments plus lourds que le fer.

1.1.2. Abondance et bio-disponibilité du fer sur Terre

On explique ainsi pourquoi le fer est le quatrième élément (et le premier métal lourd) le plus abondant de la croûte terrestre (5%). Cette forte abondance, alliée à l'existence d'une chimie redox qui autorise les échanges d'électrons, fait qu'il n'est pas surprenant qu'il puisse jouer un rôle dans le monde vivant. En fait, il y tient une place tout à fait majeure : exception faite du spirochète *Borrelia burgdorferi* (responsable de la maladie de Lyme) et des bactéries du genre *Lactobacillus* qui substitue au fer le cobalt ou le manganèse, tous les organismes vivants dépendent fortement de ce métal. En effet, cet élément est impliqué dans une très grande variété de processus vitaux tels que : la synthèse des ribo-nucléotides, la réduction de l'azote, le transport ou le stockage ou l'activation de l'oxygène, l'activation ou la dismutation des peroxydes (contrôle du stress oxydant) et le transport des électrons (comme dans le cytochrome P 450) etc. Le fer constitue le site actif des enzymes à l'origine de toutes ces activités. Il est admis que la vie sur Terre est apparue dans des conditions

anaérobies où le fer est le plus stable au degré d'oxydation + II du métal. Pour ce nombre d'oxydation, l'hydroxyde $\text{Fe}(\text{OH})_2$ est relativement soluble à $\text{pH} = 7$ ($K_s = 7,9 \cdot 10^{-16}$, $[\text{Fe}^{2+}]_{\text{soluble}} = 7,9 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) et l'élément était alors facilement disponible pour les organismes vivants.

L'apparition des organismes photosynthétiques, qui libèrent des quantités considérables d'oxygène dans l'atmosphère, créa une véritable crise de disponibilité du fer. En effet, en présence d'oxygène le fer n'est stable qu'au degré d'oxydation +III pour lequel l'hydroxyde $\text{Fe}(\text{OH})_3$ est virtuellement insoluble^{1a,b, 2} ($K_s = 10^{-38}$), ce qui conduit à une concentration en fer +III de l'ordre de 10^{-18} M à $\text{pH} = 7,4$. Dans ces conditions de très faible biodisponibilité, les organismes ont dû développer des stratégies d'acquisition efficaces du fer.

1.1.3. Acquisition du fer par les micro-organismes : les sidérophores

Le fer inorganique soluble est directement assimilable par les micro-organismes et constitue une des voies d'acquisition de cet élément comme chez *Erwinia chrysanthemi*. Elle met en jeu Fe^{2+} éventuellement formé à partir de Fe^{3+} via une réductase. C'est une voie dite de « faible affinité ». Pourtant, comme nous l'avons déjà cité, Fe^{2+} n'est pas la source de fer normale et la plupart des micro-organismes (bactéries et champignons microscopiques) synthétisent puis excrètent dans l'environnement des ligands qui vont solubiliser Fe^{3+} . Ces ligands du fer sont appelés sidérophores^{3a, 4, 5} (du Grec *sideros* = fer et *pherien* = transport, terme dû à Lankford en 1973)^{3b}. Le complexe ferrique ainsi

1)a- J. B. Neilands, K. Konopka, B. Schwyn, M. Coy, R. T. Francis, B. H. Paw, A. Bagg, *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*, G. Winkelmann, D. Van der Helm, J. B. Neilands, Weinheim, **1987**, 3.

b- M. Meyer, J. R. Telford, S. M. Cohen, D. J. White, J. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10093.

2) R. J. A. Ramirez, L. Karamanukyan, S. Ortiz, C. G. Gutierrez, *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38, 749.

3) a- M. Luo, H. Lin, M. A. Fischbach, D. R. Liu, C. T. Walsh, J. T. Groves, *ACS Chemical Biology*, **2006**, 1, 29.

4) E. R. Marinez, E. K. Salmassian, T. T. Lau, C. G. Gutierrez, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3548.

5) P. Thulasiraman, S. M. C. Newton, J. Xu, K. N. Raymond, C. Mai, A. Hall, M. A. Montague, P. E. Klebba, *Journal of Bacteriology*, **1998**, 180, 6689

formé, un ferri-sidérophore, est ensuite transporté à l'intérieur de la cellule en général *via* un processus de reconnaissance par un récepteur membranaire. C'est le système d'assimilation à « haute affinité ». Comme on peut l'attendre, la biosynthèse des sidérophores est régulée rigoureusement par les besoins du micro-organisme et par la concentration en Fe^{3+} disponible.^{6, 7, 8}

1.1.4. La nature des sidérophores

Les ligands rencontrés dans les sidérophores sont fondés essentiellement sur des atomes réputés durs au sens des Acides et de Bases Durs et Mous (concept Hard and Soft Acids and Bases dit HSAB dû à Pearson). Cette constatation s'explique en considération le caractère « dur » de Fe^{3+} qui doit être complexé : faible taille du cation ($r = 0,65 \text{ \AA}$), charge élevée et haut potentiel redox ($E^\circ_{\text{Fe}^{+III}(\text{H}_2\text{O})_6/\text{Fe}^{+II}(\text{H}_2\text{O})_6} = +0,77 \text{ V/ENH}$). Ainsi dans les sidérophores, on observe comme atome donneur l'azote mais surtout l'oxygène plus dur. Les fonctions complexantes sont assez variées : des amines parfois aromatiques (imidazole), des phénols, des catéchols, des acides carboxyliques, des acides hydroxamiques et des acides α -hydroxy-carboxyliques.^{9, 10}

Les sidérophores sont plus ou moins efficaces vis-à-vis de leur capacité à complexer le fer. Il est commode de distinguer les sidérophores de basse affinité pour le fer des sidérophores de haute affinité pour le fer.

1.1.4.1. Les sidérophores de basse affinité pour le fer

3) b- C. E. Lankford, *Crit. Rev. Microbiol.*, **1973**, 2, 273.

6) L. D. Loomis, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 906.

7) M. E. Bluhm, B. P. Hay, S. S. Kim, E. A. Dertz, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 5475.

8) H. Hayen, D. A. Volmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 711.

9) A. D. Lestie, R. Daneshfar, D. A. Volmer, *Am. Soc. Mass spectrom.*, **2007**, 18, 632.

10) A. M. D'hardemare, S. Torelli, G. Serratrice, J-L. Pierre, *BioMetals*, **2006**, 19, 349.

Il s'agit de ligands simples et de très bas poids moléculaire où la faible denticité et la faible préorganisation expliquent les faibles spécificités et stabilité des complexes du fer. Ces espèces peuvent ainsi complexer une grande variété de métal comme l'aluminium, c'est pourquoi le terme sidérophore ne leur est pas toujours complètement approprié (ne devrait-on pas parler de métallope ?).

Les sidérophores de basse affinité les plus importants sont l'acide citrique¹¹ et, dans une moindre mesure, l'acide salicylique dont les structures sont représentées **Figure 1**. Le rôle de l'acide salicylique en tant que sidérophore est par ailleurs contesté par les travaux de l'équipe de Colin Ratledge.¹²

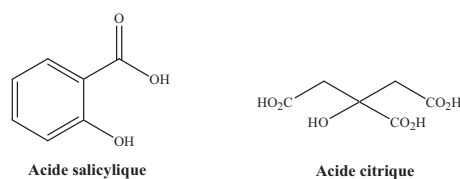


Figure 1 : « Sidérophores » de faible affinité.

Il existe quand même de véritables sidérophores, au sens où la synthèse de ces molécules est essentiellement bio-régulée par le fer, et qui présentent une relativement faible stabilité des ferri-complexes. Ils sont utilisés ou excrétés par les micro-organismes en cas d'impossibilité de biosynthèse des sidérophores plus spécifiques de « haute affinité ». Ils sont conventionnellement considérés comme des systèmes secondaires ou de secours d'acquisition du fer. Il s'agit par exemple de la Pyochéline (**Figure 2a**) produite par *Pseudomonas aeruginosa*.¹³

11) B. Van Hove, H. Staudenmaier, V. Braun, *J. Bacteriol.*, **1990**, 172, 6749.

12) J. R. Chipperfield, C. Ratledge, *BioMetals*, **2000**, 13, 165.

13) J. A Ferreras, J-S. Ryu, F. Di Lello, D. S. Tan, L. E. N Quadri., *Nature Chemical Biology*, **2005**, 1., 29.

Le ferri-sidérophore est de stoechiométrie $[\text{Fe}(\text{L})_2]$, avec une constante de stabilité estimée à 10^{+5} seulement.¹⁴

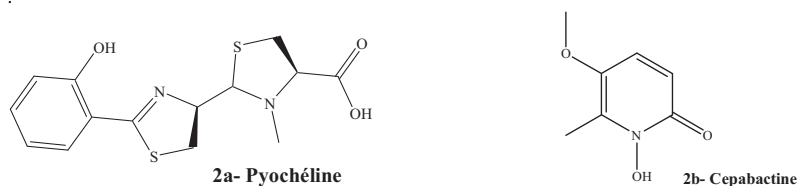


Figure 2 : Pyochéline ; Cépabactine.

La Cépabactine (**Figure 2b**) est sécrétée par *Barkholderia cepacia*, elle représente un cas exceptionnel de sidérophore fondée sur une structure hydroxypyridonate bidente. Le complexe ferrique est de stœchiométrie $[\text{Fe}(\text{L})_3]$,¹⁵ mais la constante de stabilité n'est pas connue.

Il est intéressant de remarquer la possibilité de formation de complexe mixte $[\text{Fe}(\text{Pyochéline})(\text{Cépabactine})]$, sans qu'il soit démontré qu'il puisse être reconnu par la bactérie.

On peut encore citer la Quinolobactine, seul exemple de sidérophore naturel fondé sur la structure 8-hydroxyquinoline (**Figure 3**). La valeur de la constante de stabilité du ferri-sidérophore $[\text{Fe}(\text{L})_2]^-$ est beaucoup plus élevée $K_s = 10^{28,2}$ ce qui peut déjà faire passer la Quinolobactine pour un sidérophore de moyenne affinité¹⁶ pour le fer.

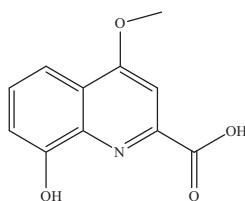


Figure 3 : La Quinolobactine.

1.1.4.2. Les sidérophores de haute affinité pour le fer

14) A. A. Miles, P. L. Khimji, *J. Med. Microbiol.*, **1975**, 8, 477.

15) C. Klumpp, A. Burger, G. L. Mislin, M. A. Abdallah, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 15, 1721.

16) A. du Moulinet d'Hardemare, G. Serratrice, J-L. Pierre, *BioMetals*, **2004**, 17, 691.

Il s'agit de ligands de poids moléculaire modeste (de 0,5 à 1,0 kDa)^{1, 2}, mais qui complexent sélectivement et fortement le cation ferrique^{5, 6} : ce sont les sidérophores *stricto sensus*. En général, la constante de stabilité du ferri-sidérophore est élevée, typiquement comprise dans l'intervalle 10^{+25} et 10^{+50} .

Les donneurs qui assurent la coordination du fer sont surtout des systèmes bidentés de type catéchol, acide hydroxamique ou acide α -hydroxy-carboxylique représentés⁹ (**Figure 4a**).

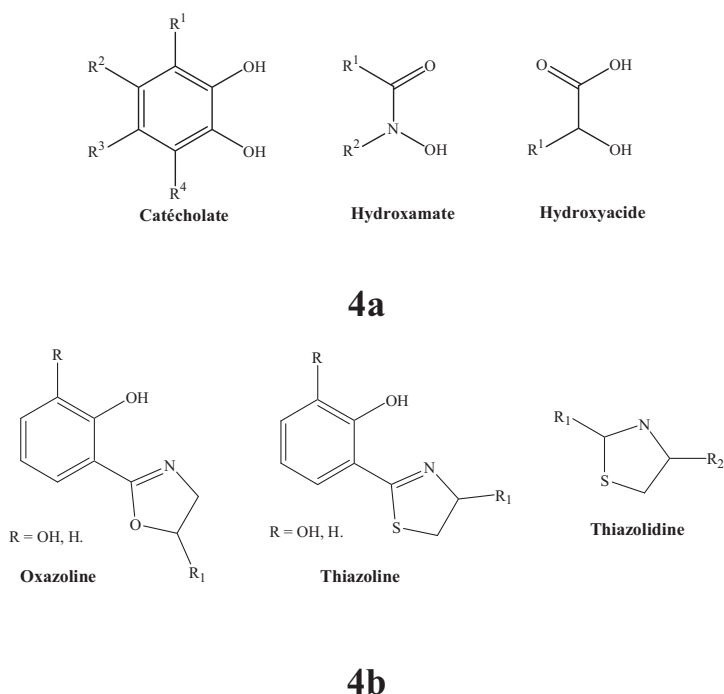


Figure 4 : Groupes chélateurs : 4a groupes bidentés les plus fréquents ; 4b groupes des oxazoline,thiazoline bidentés et thiazolidine monodenté.

1) M. Meyer, J. R. Telford, S. M. Cohen, D. J. White, J. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 10093.

2) R. J. A. Ramirez, L. Karamanukyan, S. Ortiz, C. G. Gutierrez, *Tetrahedron Letters*, **1997**, *38*, 749.

5) P. Thulasiraman, S M. C. Newton, J. Xu, K N. Raymond, C. Mai, A. Hall, M A. Montague, P E. Klebba, *Journal of Bacteriology*, **1998**, *180*, 6689

6) L. D. Loomis, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **1991**, *30*, 906.

9) A. D. Lestie, R. Daneshfar, D. A. Volmer, *Am. Soc. Mass spectrom.*, **2007**, *18*, 632.

Les acides α -hydroxy-carboxyliques sont de moins bons complexants que les catéchols et les acides hydroxamiques. De façon plus rare, les sidérophores contiennent des systèmes bidentés de type 2-(2-hydroxyphényl)-oxazoline, 2-(2-hydroxyphényl)-thiazoline voire l'unité monodenté thiazolidine (**Figure 4b**).

D'autre part, les sidérophores sont caractérisés par la nature du squelette (les espaceurs) qui porte les systèmes de chélation. Ces espaceurs sont :

- soit de nature peptidique,
- soit dérivant directement de l'acide citrique,
- soit des polyamines. La norspermine et la spermine sont surtout présentes chez les bactéries, alors que les diamines comme la putrescine et la 1, 3-propanediamine sont essentiellement rencontrées dans les sidérophores sécrétés par les champignons.

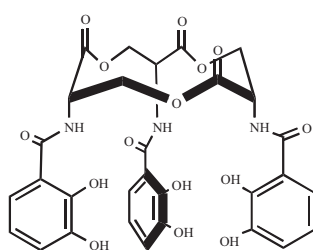
La denticité des sidérophores de haute affinité est élevée, le plus souvent égale à six afin d'assurer d'emblée les conditions de complexation optimale de Fe^{3+} qui est normalement un ion hexacoordonné. Nous présentons ci-après les principaux sidérophores, classés conventionnellement en fonction de la nature chimique du donneur principal. S'il existe des sidérophores fondés uniquement sur des catéchols ou sur des acides hydroxamiques, il n'en va pas de même avec les sidérophores contenant des acides α -hydroxy-carboxyliques qui sont toujours en combinaison avec des catéchols ou des acides hydroxamiques (sidérophores « mixtes »).

➤ Les sidérophores de type catéchol

La sous-unité chélatrice dérive plus précisément de l'acide 2, 3-dihydroxy-benzoïque dont la fonction acide carboxylique permet d'établir un lien amide avec l'azote des acides aminés ou des polyamines constituant l'espaceur.

a) Les sidérophores *tris*-bidentés

Parmi les sidérophores *tris*-catéchol, le plus connu et le plus important est l'Entérobactine (ou encore Entérochéline) représentée **Figure 5a**. Elle est synthétisée par certaines bactéries gram-négative ou gram-positive comme *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. De tous les sidérophores naturels aujourd'hui connus, l'Entérobactine présente la plus forte constante de stabilité pour Fe^{3+} ($K_s = 10^{49}$)¹⁷. L'exceptionnelle affinité de l'Entérobactine pour Fe^{3+} s'explique sans doute par l'alliance de la dureté des catécholates et la fixation sur un espaceur macro-trilactonique dérivé de la sérine qui assure une préorganisation parfaitement adaptée à la taille du cation ferrique ($r = 0,65 \text{ \AA}$).



5a- Entérobactine.

17) M E. Bluhm, S S. Kim, E A. Dertz, K N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2436.

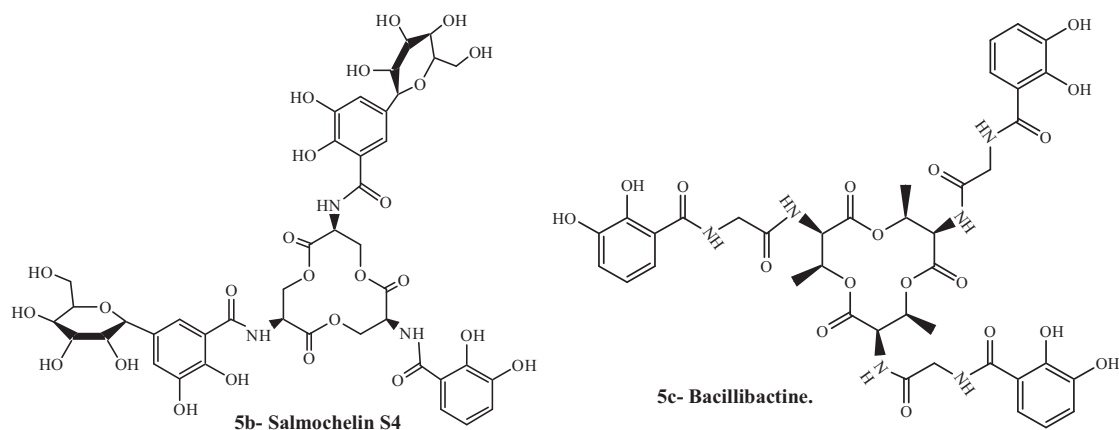


Figure 5 : Les sidérophores de type Entérobactine (espaceur cyclopéptidique).

La Salmochéline (**Figure 5b**) est une Entérobactine où deux catéchols sont C-glycosylés, ce qui ne modifie pas les propriétés de complexation, mais qui induit une reconnaissance plus spécifique par les récepteurs de la bactérie productrice. L'exemple de la Bacillibactine (**Figure 5c**) synthétisée par *Bacillus subtilis* est plus intéressant du point de vue de la complexation. Il s'agit encore d'une Entérobactine mais plus profondément modifiée par la présence d'un espaceur glycinyle supplémentaire entre la macro-trilactone de la sérine et le groupe chélatant catéchol. Curieusement, la stabilité du complexe ferrique est très peu affectée par ce changement structurel *a priori* important (la constante de stabilité reste très voisine de celle de l'Entérobactine ferrique avec K_s Bacillibactine = $10^{47,6}$ et K_s Entérobactine = 10^{49}).^{18, 19, 20}

La Protochéline, sécrétée par *Azotobacter vinelandii*, est quant à elle un sidérophore de type *tris*-catéchol dont l'espaceur linéaire est une lysine liée à la putrescine (**Figure 6**).²¹ Même si l'espaceur est linéaire, donc *a priori* moins préorganisé qu'un espaceur cyclique, la stabilité du ferri-sidérophore reste élevée comme le montre la valeur calculée par Duhme *et al.*, $K_s = 10^{44,6}$.

18) E. A. Dertz, J. Xu, A. Stintz, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 22.

19) R. J. Bergeron, J. B. Dionis, M. J. Ingenu, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 144.

20) C. K. S. Chung, T. D. Jickells, D. J. Richardson, D. A. Russell, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 5040.

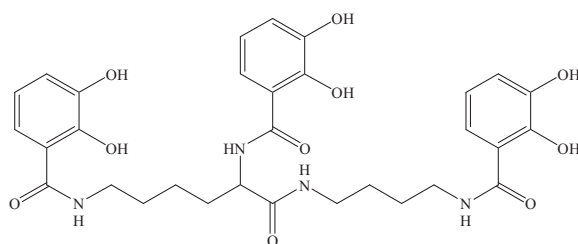
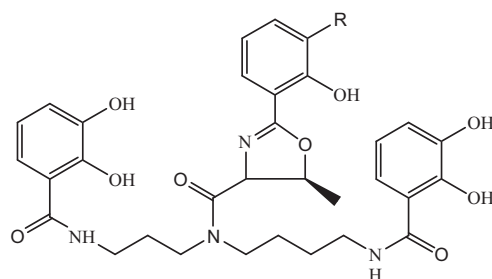


Figure 6 : Protochéline (espaceur « mixte » putrescine + lysine).

L'Agrobactine et la Parabactine représentées **Figure 7** sont produites par *Agrobacterium tumefaciens* et par *Paracoccus denitrificans*. Il s'agit d'exemples de sidérophores « mixtes » car, bien qu'ils comportent 3 catéchols, seuls les 2 catéchols d'extrémité et le groupe 2-(2-hydroxyphényl) oxazolidine complexent le fer. L'espaceur servant de squelette, la spermidine, est acyclique et cette dernière caractéristique n'affecte toujours pas la constante de stabilité qui est très élevée et proche de celle de l'Entérobactine (K_s Parabactine = 10^{48} et K_s Entérobactine = 10^{49})^{5, 22, 23}.



**R=OH Agrobactine ; R=H
Parabactine**

Figure 7 : Parabactine et Agrobactine (espaceur polyamine « spermidine »).

21) A. K. Duhme, R. C. Hider, M. J. Naldrett, R. N. Pau, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **1998**, 3, 520.

5) P. Thulasiraman, S M. C. Newton, J. Xu, K N. Raymond, C. Mai, A. Hall, M A. Montague, P E. Klebba, *Journal of Bacteriology*, **1998**, 180, 6689.

22) M. Valdebenito, A. L. Crumbliss, G. Winkelmann, K. Hantke, *International Journal of Medical Microbiology*, **2006**, 296, 513.

23) T. Peterson, K-E. Falk, S. A. Leong, M. P. Klein, J. B. Neilands, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 7715.

b) Les sidérophores *bis*-bidentés et « *mono* »-bidentés

Si les sidérophores *tris*-bidentés sont les plus fréquents, il existe bien des sidérophores dérivants du catéchol de plus faible denticité. Il faut citer parmi les *bis*-bidentés l'Azotochéline et la Serratiochéline (**Figure 8**) que l'on peut assimiler à des fragments de la Protochéline et de l'Agrobactine citées précédemment. La stabilité de la ferri-Serratiochéline n'est pas connue et celle de la ferri-Azotochéline est estimée à $K_s = 10^{12,7}$ pour le complexe mononucléaire $[Fe(L)]$, et à $K_s = 10^{34,5}$ pour son complexe dinucléaire $[Fe_2(L)_3]$.²⁴

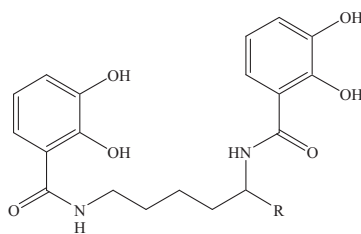


Figure 8 : Azotochéline.

Parmi les systèmes « *mono* »-bidentés, on remarque la Chrysobactine découverte par Persmark *et al.* (**Figure 9a**), elle est sécrétée par *Erwinia chrysanthemi* et *E. carotovora*. C'est le représentant typique des sidérophores dérivant simplement de l'acide dihydroxy-benzoïque et de quelques acides aminés.²⁵ La Vanchrobactine, récemment découverte (**Figure 9b**)²⁶, est issue de cultures de *Vibrio anguillarum*, elle appartient aussi à cette famille de sidérophore où seuls les acides aminés constituant le squelette changent d'une structure à l'autre. Pour la Chrysobactine, les fonctions présentes sur les acides aminés ne coordonnent pas le fer : seul le groupe catéchol est chélatant. La

24) J-P. Bellenger, F. Arnaud-Neu, Z. Asfari, S. C. B. Myneni, E. I. Stiefel, A. M. L. Kraepeil, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 12, 367.

25) M. Persmark, D. Expert, J. B. Neilands, *The Journal Of Biological Chemistry*, **1989**, 264, 3187.

26) R. G. Soengas, C. Anta, A. Espada, R. M. Nieto, M. Larrosa, J. Rodriguez, C. Jiménez, *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 3021.

stoechiométrie des complexes formés varie de 1/1 à 1/3 (Métal/L) en fonction du pH et de la concentration en ligand. Il semble toutefois, à la lueur des travaux de Persmark et Neilands²⁷, que le complexe préférentiellement engendré soit plutôt 1/2. Ce complexe déplace le fer du complexe [Fe(HDDHA)] considéré pourtant comme de forte stabilité.

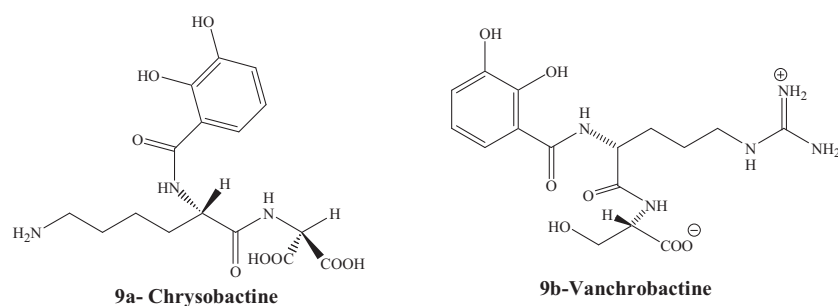


Figure 9 : Les sidérophores « mono »-bidenté (espaceur péptidique).

➤ Les sidérophores de type acide hydroxamiques

a) Les sidérophores *tris*-bidentés

Plusieurs sidérophores *tris*-hydroxamates sont connus, où les fonctions chélatrices bidentés sont fixées sur un espaceur linéaire ou cyclique dérivés d'acides aminés^{28, 29, 30}. C'est le cas du Ferrichrome, de la Ferrioxamine E produits par le genre *Nocardia* (espaceurs cycliques) et de la desferrioxamine B produit par *Streptomyces pilosus* (espaceur acyclique) dont les structures sont représentées **Figure 10**. Les constantes de formation sont un peu plus faibles que

27) M. Persmark, J. B. Neilands, *BioMetals*, **2005**, 5, 29.

28) F. Biaso, P. Baret, J-L. Pierre, G. Serratrice, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 89, 123.

29) J-M. Meyer, M. A. Abdallah, *J. Gen. Microbiol.*, **1980**, 118, 125.

30) A. Stintzi, C. Barnes, J. Xu, K. N. Raymond, *PANS*, **2000**, 97, 10691.

pour l'Entérobactine avec par exemple, la constante de stabilité pour la ferri-ferrioxamine $K_s = 10^{40}$.^{31, 32}

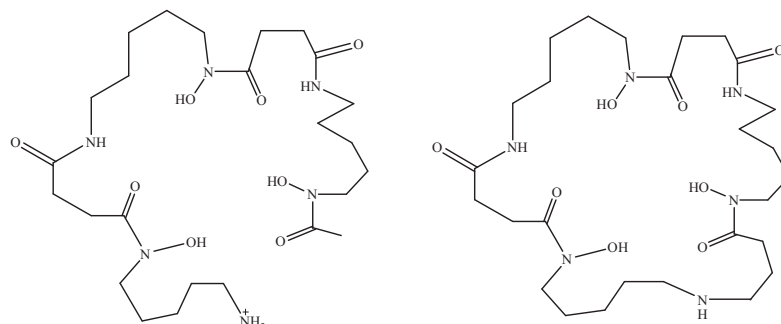


Figure 10 : desferriferrioxamine B et Ferrioxamine E (espaceurs péptidiques).

Il ne faut pas oublier de citer l'Albomycine produite par *Streptomyces griseus* et *Streptomyces substrictus*,³³ dont la structure est représentée **Figure 11**. La partie chélatrice *tris*-hydroxamate est reliée à une séquence thioribosyl-pyrimidine qui présente des propriétés antibiotiques. Il s'agit là d'un exemple naturel de la stratégie dite du « Cheval de Troie » (Trojan Horse strategy) qui consiste à profiter de la reconnaissance spécifique d'un sidérophore pour vectoriser un antibiotique qui lui est conjugué.

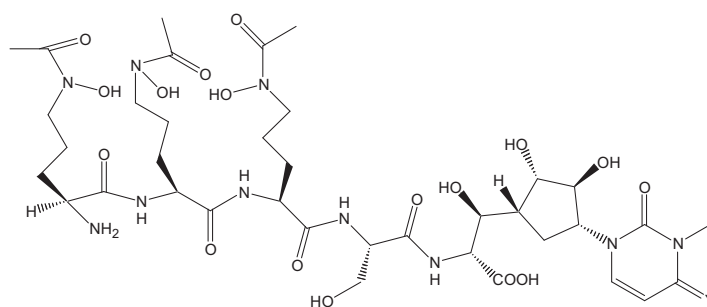


Figure 11 : Albomycine : un exemple naturel de conjugué sidérophore-antibiotique.

31) H. Boukhalfa, A. L. Crumbliss, *BioMetals*, **2002**, 15, 325.

32) H. K-Leshem, C. Ziv, E. G-Kontacka, R. A-Yellin, Y. Chen, M. Elhabiri, A-M. A-Gary, Y. Hadar, A. Shanzer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1137.

33) Y-M. Lin, M. J. Miller, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 7451.

Les Mycobatines sont sécrétées par des mycobactéries comme l'agent pathogène bien connu de la tuberculose *Mycobacterium tuberculosis*. Ces sidérophores « mixtes » sont organisés sur un espaceur péptidique portant deux acides alpha-hydroxamiques et un groupe 2-(2-hydroxyphényl)-oxazoline comme pour la Mycobactine T (Figure 12).³⁴

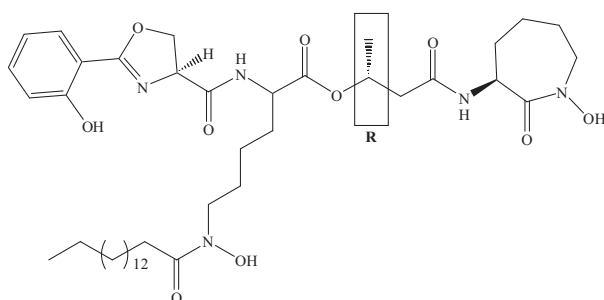


Figure 12 : Mycobactine T.

Les Mycobactines représentent un cas intéressant de sidérophore dont la nature est amphiphile, tout comme les Marinobactines sidérophores marins sécrétés par le genre *Marinobacter*. Ces ferri-sidérophores peuvent s'assembler en vésicules, caractéristiques permettant sans doute une meilleure concentration du fer.

Les Pyoverdines³⁵ sont un ensemble de sidérophores étroitement apparentés produits par le genre *Pseudomonas*. Ce sont des molécules chimiquement complexes où les groupes impliqués dans la coordination sont toujours un catéchol, un acide hydroxamique terminal et un α -hydroxyacide carboxylique (sauf dans le cas de la Pyoverdine PaA, où ce dernier est remplacé

34) A. J. Walz, U. Mollmann, M. J. Miller, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 1621.

35) H. Boukhalfa, S. D. Reilly, R. Michalczyk, S. Lyer, M. P. Neu, *Inorganic Chemistry.*, **2006**, 45, 5607.

par un deuxième acide hydroxamique). La chaîne peptidique qui relie les sites de complexation varie légèrement d'une espèce à l'autre. La **Figure 13** représente le sidérophore sécrété par *Pseudomonas putida* ATCC 33015.

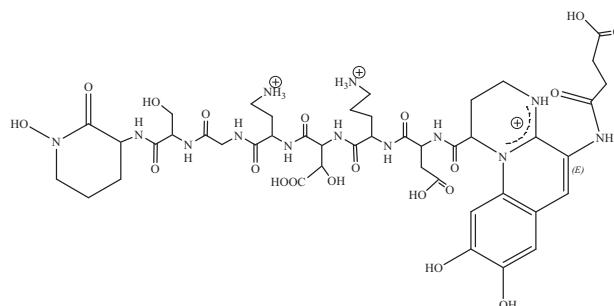


Figure 13 : Pyoverdine (espaceur péptidique).

L'ion quinolinium est responsable de la coloration et de la fluorescence des cultures de *Pseudomonas*. Il faut noter que l'azote ne participe pas à la complexation du fer, il ne s'agit donc pas d'une quinoline coordinante. Les constantes de stabilité des ferri-Pyoverdines sont comprises dans un intervalle de 10^{24} à 10^{32} à pH = 7.³⁶

Enfin, citons l'Aérobactine (**Figure 14a**) produite par *Escherichia coli*. C'est un sidérophore typique dérivé de l'acide citrique, espaceur souvent rencontré comme dans la Rhizobactine (**Figure 14b**). La constante de stabilité du ferri-complexe est moyenne : $K_s = 10^{25}$. Ce sidérophore secondaire est beaucoup moins efficace que l'Entérobactine ce qui explique sans doute qu'il soit moins étudié.²²

36) S. Wendenbaum, P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer, M. A. Abdallah, *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 4877.

22) M. Valdebenito, A. L. Crumbliss, G. Winkelmann, K. Hantke, *International Journal of Medical Microbiology*, **2006**, 296, 513.

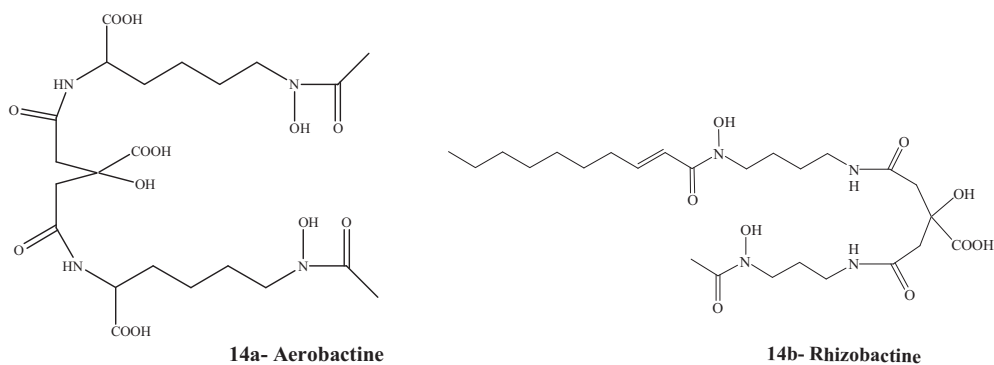


Figure 14 : Aerobactine et Rhizobactine (espaceur « citrate »).

b) sidérophores *bis*-bidentés

L'acide Rhodotorulique, représenté **Figure 15**, est isolé des cultures de la levure *Rhodotorula pilimanae*. C'est un acide *bis*-hydroxamique^{37, 31} qui forme un complexe de stoechiométrie [Fe/L ; 2/3] à pH = 7 avec une constante de stabilité élevée, $K_s = 10^{64,6}$. Cette constante est déterminée pour 2 atomes de fer et pour établir une comparaison plus adéquate avec les autres sidérophores, on la ramène à un atome de métal, $K_{s/Fe} = 10^{32,3}$. Il s'agit donc d'un sidérophore beaucoup moins efficace que l'Entérobactine comme on peut d'ailleurs s'y attendre pour un ligand de plus faible denticité.

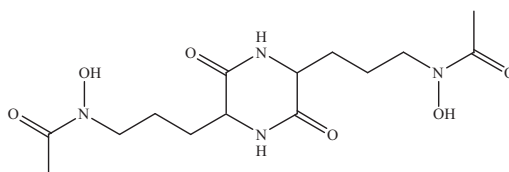


Figure 15 : Acide rhodotorulique (acide *bis*-hydroxamique).

37) C. Atkin, J. B. Neilands, *Biochemistry*, **1968**, 7, 3734.

31) H. Boukhalfa, A. L. Crumbliss, *BioMetals*, **2002**, 15, 325.

On peut citer comme exemple de sidérophore *bis*-bidenté fondé cette fois-ci sur deux acides α -hydroxycarboxylique, la Vibrioferrine (**Figure 16**). Elle est produite par l'agent pathogène *Vibrio parahemolyticus*.^{38, 39} Les propriétés de complexations ne sont pas quantifiées.

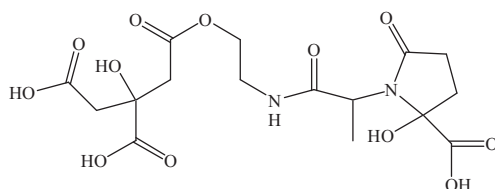


Figure 16 : Vibrioferrine.

1.1.5. Les phyto-sidérophores

Ce panorama des sidérophores serait incomplet si l'on ne citait pas ceux produits par les végétaux. Ce sont des espèces hexadentés sécrétées par les racines de certains végétaux comme les Graminées dont beaucoup ont une importance économique et nutritionnelle majeure (riz, maïs et blé par exemple).

Leurs sécrétions sont souvent accompagnées de celle d'acide citrique. Ce dernier facilite la dissolution du fer en diminuant localement le pH des sols calcaires très alcalins, où le fer est encore moins soluble que dans un sols argileux ou humifère. Ceci constitue une remarquable adaptation des végétaux à la carence en fer dans des sols basiques.

Les phyto-sidérophores sont structurellement moins nombreux et moins variés que les sidérophores bactériens. Les exemples suivants illustrent parfaitement la nature de ces espèces : l'acide muginéique, la nicotianamide, l'acide avénique et distichonique (**Figure 17**).

38) S.Yamamoto, N. Okujo, T. Yoshida, S. Matsuura, S. J. Shinoda, *Biochem.*, **1994**, 155, 868.

39) S.Yamamoto, N. Okujo, S. Matsuura, I. Fujiwara, Y. Fujita, S. Shinoda, *Micobiol. Immunol.*, **1994**, 38, 687

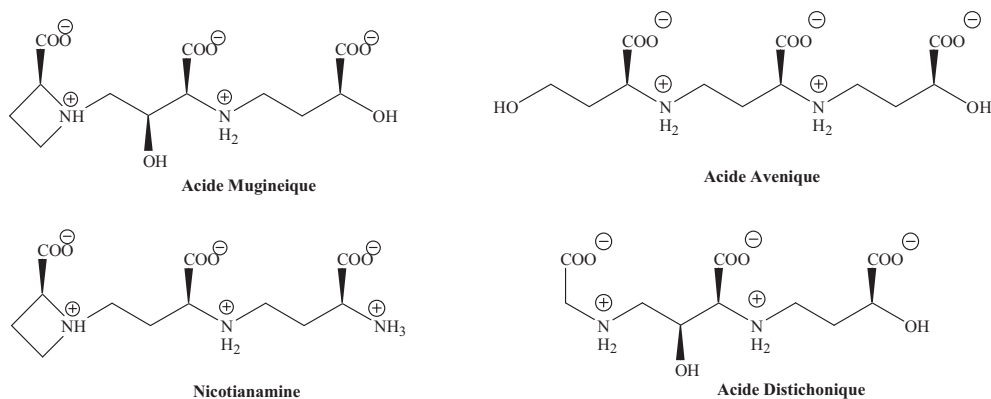


Figure 17 : les phyto-sidérophores.

Les fonctions carboxylate,⁴⁰ amine et hydroxyle assurent la coordination du fer. Les constantes de stabilité des ferri-sidérophores sont typiquement comprises autour de 10^{17} - 10^{18} .

1.1.6. Le mécanisme du transport de Fer

Si l'assimilation du fer par les micro-organismes peut mettre en jeu la captation du fer hémique ou des ferri-proteines d'un hôte qui les héberge, la voie sidérophore reste la plus importante. Dans ce cadre, le ferri-sidérophore doit rentrer dans le micro-organisme. Or, la limite d'exclusion par diffusion passive par les porines bactériennes est inférieure à 500 Da, ce qui interdit la diffusion passive des ferri-sidérophores dont la masse est plus élevée. Les micro-organismes assurent donc la translocation de ces molécules par des systèmes actifs et sélectifs. C'est pourquoi l'étude des mécanismes d'appropriation du fer par les pathogènes bactériens est en plein essor dans de nombreux laboratoires qui espèrent identifier les « points de vulnérabilité » de ce processus. Cette connaissance pouvant être mise à profit pour mettre au point de nouveaux antibiotiques (stratégie du cheval de Troie) à l'instar de

40) N. Wirén, H. Khodr, R. Hider, *Plant Physiology*, **2000**, 124, 1149.

l'Albomycine ou pour inhiber l'acquisition du fer *via* le système de récepteur spécifique des sidérophores.

Seules les études chez les bactéries à coloration Gram-négative permettent d'accroître notre connaissance du transport des ferri-sidérophores qui reste malgré tout encore très fragmentaire.

On peut assimiler le processus de captation comme suit.

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est constituée de deux membranes, l'une externe et l'autre cytoplasmique. Ces deux membranes sont séparées par l'espace périplasmique (ou périplasme) pouvant représenter jusqu'à 40% du volume total de la bactérie et qui contient le péptidoglycane qui, comme la carcasse radiale d'une pneu, permet de conserver la forme de la bactérie en résistant à la pression osmotique. C'est donc véritablement trois barrières physiques, avec des propriétés chimique et mécanique très différentes, que doivent traverser les ferrisidérophores pour atteindre le cytoplasme. La diversité structurale qui prévaut parmi les sidérophores implique que les mécanismes d'incorporation peuvent être sensiblement différents d'une espèce bactérienne et/ou d'un sidérophore à l'autre. Cependant, les travaux effectués sur divers micro-organismes permettent de dégager un processus général qui est résumé par la **Figure 18**.

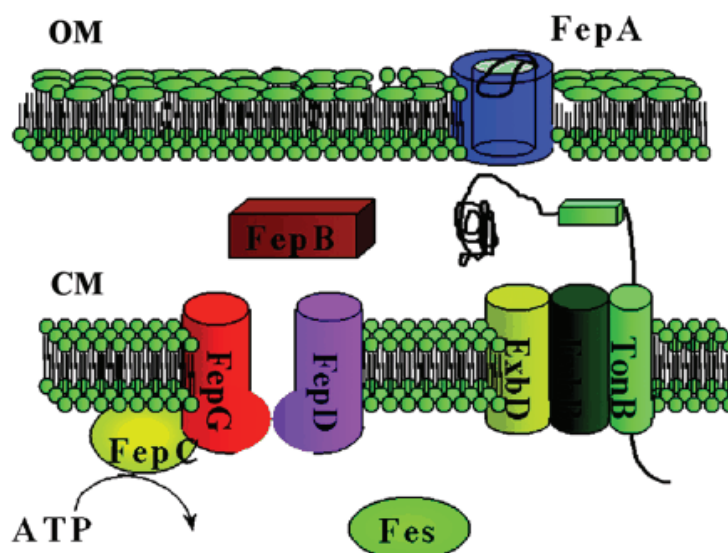


Figure 18 : Représentation schématique des transporteurs membranaires de la ferri-Entérobactine chez *E. coli* (ref-41).

Les sidérophores sont synthétisés dans le cytoplasme et le périplasma puis sont exportés vers le milieu extracellulaire, probablement grâce à des pompes d'efflux. Les sidérophores complexent alors le fer disponible dans le milieu extracellulaire et le ferri-sidérophore ainsi formé est reconnu par un récepteur spécifique enchâssé dans la membrane externe de la bactérie. La structure tridimensionnelle des récepteurs spécifiques FepA de l'Entérobactine, FhuA du ferrichrome, FecA du citrate, FpvA de la pyoverdine et enfin FptA de la pyochéline ont été décrits dans la littérature. Ces structures présentent une organisation commune en deux parties principales : un tonneau β , constitué de 22 brins antiparallèles, forme un pore transmembranaire alors que la partie N terminale de la protéine se replie pour obturer le pore en formant un « bouchon ». Après l'étape de reconnaissance spécifique, une modification du récepteur, ouvrant probablement le pore central, permet ensuite au ferrisidérophore de traverser la membrane externe. Cette modification de structure est liée à l'intervention de la protéine TonB par ailleurs impliquée dans le transport d'autres nutriments comme la vitamine B₁₂. Cette protéine, associée

avec ExbB et ExbD,^{41, 42} fournit l'énergie nécessaire au passage du nutriment en couplant l'ouverture du pore avec la force proto-motrice. Le ferri-sidérophore est ensuite pris en charge par la protéine périplasmique d'un transporteur de type ABC dont le rôle est d'exporter le complexe ferrique vers le cytoplasme. Ce transporteur est en fait constitué de trois protéines distinctes dont la protéine périplasmique, la protéine constituant le pore et enfin la protéine qui lie puis hydrolyse l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport. Dans la cellule, le fer peut ensuite être libéré soit par une digestion partielle du sidérophore et/ou par un processus de réduction permettant la transition Fe^{3+} vers Fe^{2+} . Dans ce deuxième cas, le ligand intact pourrait être recyclé en étant réexcrété par la bactérie. Ce schéma général est en fait un résumé des connaissances actuelles sur les différentes étapes et composants des systèmes d'assimilation du fer dépendant des sidérophores. Ainsi, dans la réalité, en fonction de l'espèce bactérienne étudiée et du sidérophore considéré, le processus mis en jeu est une déclinaison de ce mécanisme assortis de points d'interrogations.

Ces mécanismes de transport extrêmement performants permettent aux bactéries de subvenir efficacement à leurs besoins en fer même si elles sont en compétition avec l'hôte ou d'autres micro-organismes. Cependant, bien que le fer soit un élément indispensable à la vie, l'augmentation massive et incontrôlée du taux de fer intracellulaire peut avoir des conséquences graves et irréversibles pour l'être humain comme pour les bactéries. L'évolution a donc pourvu les être vivants de divers mécanismes permettant de réguler très finement la quantité de fer absorbé en fonction des lésions de l'organisme considéré. Chez les bactéries à Gram négatif, ces mécanismes de régulation sont fondés sur le contrôle de la transcription des gènes codants pour les protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des sidérophores.

41) K. N. Raymond, E. A. Dertz, S. S. Kim, *P.N.A.S.*, **2003**, 100, 3584.

42) A. D. Ferguson, V. Braun, H-P. Fiedler, J. W. Coulton, K. Diederichs, W. Welte, *Protein Science*, **2000**, 9, 956.

A partir de ce schéma général du transport des sidérophores bactériens, des études plus fines ont été réalisées sur *E. coli*. qui nous intéresse plus particulièrement.

- **Le modèle du transport de la ferri-Entérobactine (FeEnt) par navette de sidérophore**

Il s'agit d'un modèle dû à l'équipe de K. Raymond qui laisse entendre que deux sidérophores sont nécessaires au transport du fer. Après capture du fer, la ferri-Entérobactine (feEnt) se fixe sur le récepteur FepA de la membrane externe où une desferri-entérobactine se trouve déjà. Un échange de fer entre les deux entérobactines se produit alors et conduit à l'internalisation du fer à travers de la membrane cellulaire⁴³ (**Figure 19**).

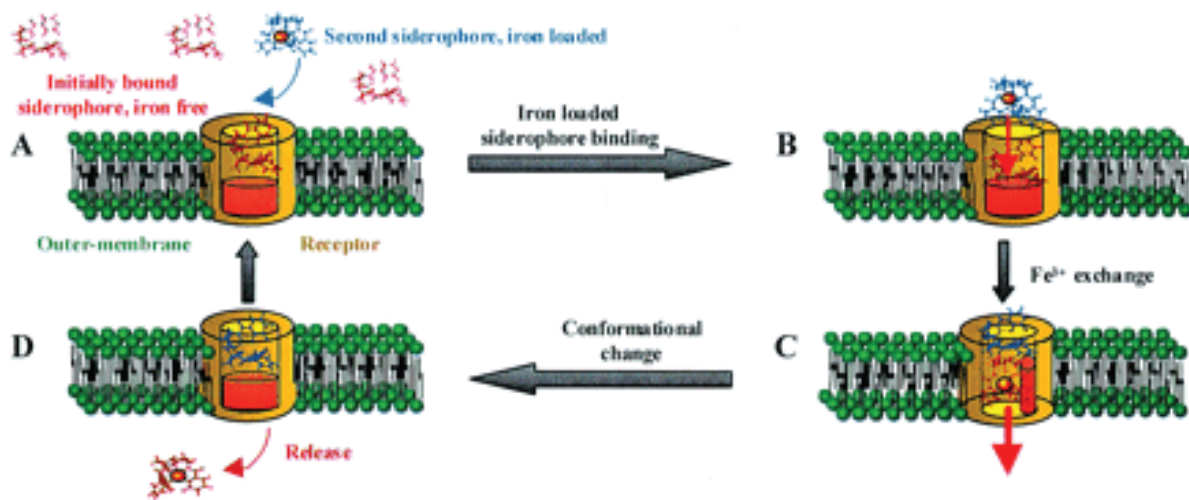


Figure 19 : Transport du fer par le modèle dit de la navette de sidérophore (ref- 43).

Ce modèle à été récemment remplacé par le modèle dit « pore transient » lui même remplacé par celui dit « ball and chain », prouvé par les études publiées par Ma *et al.* en 2007.

43) A. Stintzi, C. Barnes, Jide Xu, K. N. Raymond, *P. N.A.S.*, **2000**, 97, 10691.

- Les modèles de transport de FeEnt dit « pore transient » et « ball and chain »

FeEnt est reconnue par le biais de sa charge tri-négative par le récepteur FepA en position « ouverte » (premier dessin **Figure 20**). La fixation de FeEnt provoque la fermeture du pore du côté extérieur de la membrane (deuxième dessin **Figure 20**).

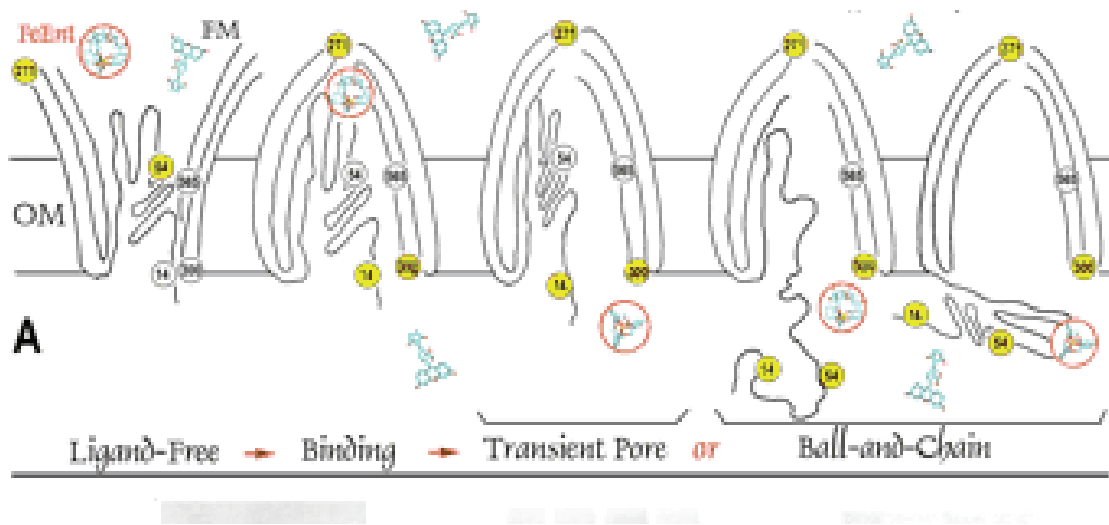


Figure 20 : modèles « pore transitoire » et « Ball et chain » (ref- 44).

Dans le modèle « pore transient », le domaine N-terminal resterait à l'intérieur du cylindre β de FepA (**Figure 21**), mais changerait de conformation pour laisser un canal étroit ($\pm 20 \text{ \AA}$) où FeEnt devrait se frayer un passage en « sautant » de site de liaisons en site de liaisons de la protéine, vers le periplasme (troisième dessin **Figure 20**).

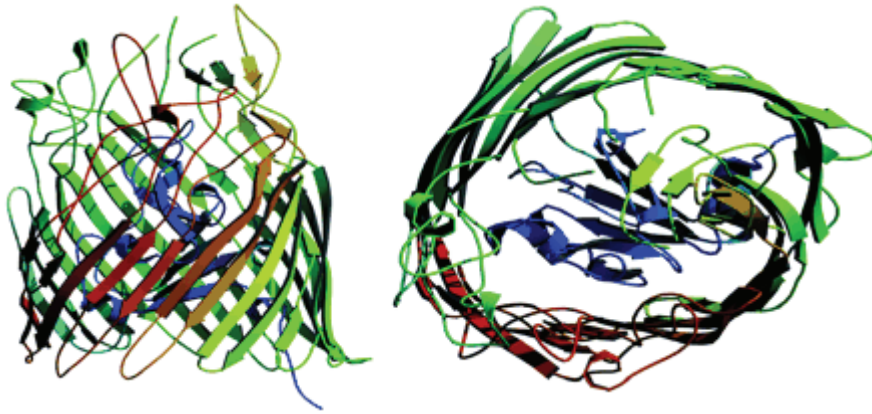


Figure 21 : protéine FepA.

Dans le modèle « ball and chain », après la reconnaissance de FeEnt et fermeture de FepA (deuxième dessin **Figure 20**), il s'ensuit un réarrangement *structurel* du domaine globulaire N-terminal de la protéine. Ce domaine N-terminal *migre vers le périplasme en entraînant avec lui FeEnt* dégageant ainsi un canal de 40 Å de diamètre. Au cours de cette migration, soit le domaine N-terminal se déplie (quatrième dessin **Figure 20**) soit le domaine N-terminal reste globulaire (cinquième dessin **Figure 20**).

La suprémacie de ce dernier modèle provient du fait qu'elle explique l'expulsion de FeEnt vers le périplasme où se trouve TonB⁴⁴, par le mouvement du domaine N-terminal de FepA (**Figure 22**).

44) Li Ma, W. Kaserer, R. Annamalia, D. C. Scott, Bo Jin, X. Jiang, Q. Xiao, H. Maymani, L. M. Massis, L. C. S. Ferreira, S. M. C. Newton, P. E. Klebba, *Journal of Biological Chemistry*, **2007**, 282, 397.

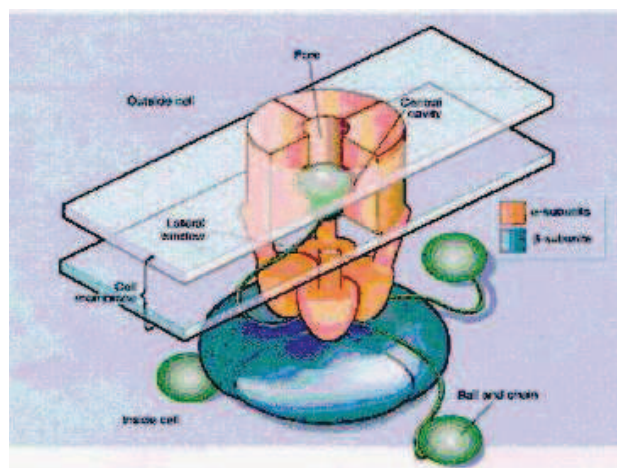


Figure 22 : Le modèle de « bal and chain ».

Ce dernier modèle semble actuellement le plus rigoureux suite aux preuves expérimentales obtenues par marquage de fluorescence du domaine N-terminal de la protéine.

1.2. LES SIDÉROPHORES BIOMIMÉTIQUES ET LEURS APPLICATIONS

Les sidérophores biomimétiques ou bioinspirés sont des chélateurs artificiels du fer susceptibles de se substituer partiellement ou totalement aux sidérophores « naturels » des micro-organismes ou des végétaux. Les domaines d'application de ces molécules sont abordés ci-dessous.

Pour les micro-organismes, ces sont des analogues de sidérophore naturels, capables de capter le fer et de le délivrer⁴⁵. Ils sont souvent synthétisés dans les buts suivants :

45) J-L. Pierre, G. Lescoat, *L'Actualité Chimique*, 2003, 123,

1.2.1. Sidérophores biomimétique et nutrition en fer

Si la supplémentation en fer des bactéries est d'intérêt restreint, celle des plantes alimentaires est d'une portée économique et sociale majeure.

Dans ce cadre le complexe fer-EDTA reste le « sidérophore » le moins coûteux pour la nutrition ferrique des plantes (composé anti-chlorose). Au laboratoire, a été développé le O-TRENSEX^{46, 47} (**Figure 23**). L'espaceur portant des groupes complexants 8-hydroxyquinoléine est la triéthylène-tétramine (tren). Ce sidérophore est bien bio-mimétique car il présente une très forte affinité pour Fe^{3+} et Fe^{2+} , et permet d'assurer la nutrition en fer des plantes⁴⁸ (il présente aussi des propriétés thérapeutiques potentielles chez l'Homme⁴⁹).

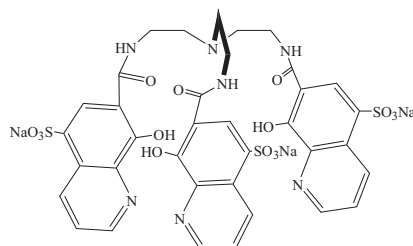


Figure 23 : O-Trensox un sidérophore bio-mimétique.

Les analogues Cox200, 750 et 2000 (**Figure 24**) sont fondés sur un espaceur carboné cette fois-ci. Des chaînes polyéthylèneglycol modulent la lipophilie, chaque ferri-complexe permet également l'incorporation de fer dans les plantes⁵⁰. Ce résultat montre que la balance hydrophilie/lipophilie n'est pas un

46) P Baret, C. G. Béguin, H. Boukhalfa, C. Caris, J-P Laulhere, J-L Pierre, G. Serratrice, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9760.

47) J-L. Pierre, P. Baret, G. Serratrice, *Current Medicinal Chemistry*, **2003**, 10, 1077.

48) C. Caris, P. Baret, C. Béguin, G. Serratrice, J-L Pierre, J-P Laulhere, *Biochem. J.*, **1995**, 312, 879.

49) N. Rakba, C. Henry, C. Caris, I. Morel, N. Padeloup, P. Baret, J-L Pierre, P. Brissot, G. Lescoat, R. R. Crichton, *Biochem. Pharmacol.*, **1998**, 55, 1797.

50) D. Imbert, P. Baret, D. Gaude, I. Gautier-Luneau, G. Gellon, F. Thomas, G. Serratrice, J-L Pierre, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 1091.

facteur déterminant pour la nutrition en fer et donc, de façon plus générale, pour assurer une bonne activité biologique.

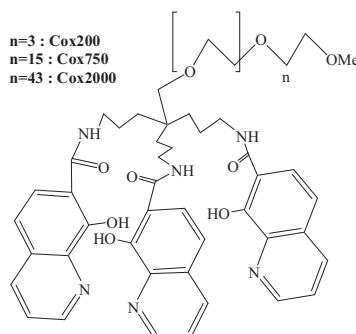


Figure 24 : Cox200, 750, 2000.

1.2.2. Sidérophores bio-mimétiques et inhibition du transport du fer

On peut aussi espérer exploiter les dérivés des sidérophores naturels ou des sidérophores bio-mimétiques pour entraver la croissance des bactéries en perturbant sinon en inhibant la captation du fer vital. C'est dans ce but que la synthèse du complexe du rubidium-MECAM a été réalisée (**Figure 25**). Il s'agit là d'un inhibiteur compétitif du complexe $[Fe(\text{Entérobactine})]^{3-}$, comme le montrent les travaux de Raymond et de Shanzer chez *E. coli*^{51, 52}.

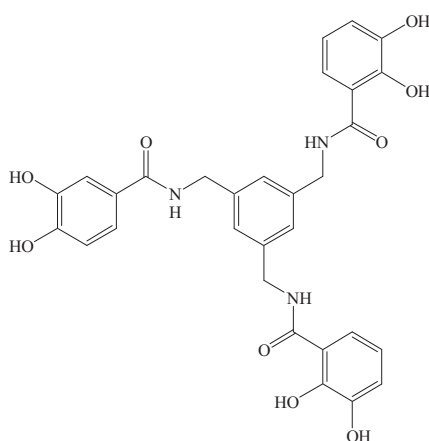


Figure 25 : MECAM.

51) L. D. Loomis, K. N. Raymond., *Inorg. Chem.*, **1991.**, 30., 906.

52) A. Shanzer, J. LiBman, S. Lifson, C. E. Felder, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 7609.

Cependant, cet inhibiteur ne permet pas de contrecarrer la croissance des bactéries pathogènes.

1.2.3. Vectorisation d'antibiotiques, la stratégie du « cheval de Troie »

Comme nous l'avons déjà vu, l'Albomycine peut-être regardée comme un des rares cas de «conjugué » naturel d'antibiotique et de sidérophore. La partie sidérophore utilise la voie du transport du fer chez de nombreux micro-organismes et permet ainsi l'internalisation de la composante antibiotique qui est relâchée *in vivo* par hydrolyse. Des études préliminaires indiquent que le squelette du sidérophore tolère des modifications substantielles sans altérer profondément les propriétés biologiques. L'archétype prouvant la faisabilité de cette stratégie de vectorisation de médicament est illustré par la molécule GR69153 (**Figure 26**) qui présente la conjugaison d'une céphalosporine (partie antibiotique) et d'un groupe catéchol (partie sidérophore). Ce composé est plus actif *in vitro* contre *Pseudomonas aeruginosa* que les autres céphalosporines.⁵³

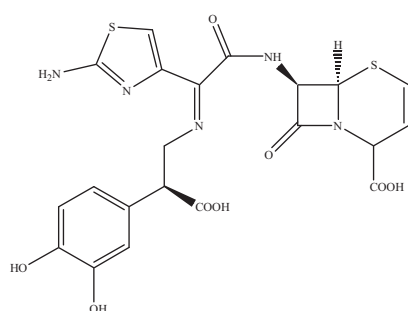


Figure 26 : GR69153.

Les résultats *in vivo* de ces molécules se sont révélés décevants, il reste encore à trouver de nouvelles molécules réellement efficaces. Ceci représente un

⁵³) P. Silley, J. W. Griffiths, D. Monsey, A. M. Harris, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, 34, 1806.

enjeu considérable aujourd'hui, car on constate une augmentation alarmante de la résistance des agents pathogènes aux anti-biotiques classiques.

1.2.4. Synthèse d'inhibiteurs de formation de biofilms

Lorsqu'elles rencontrent des conditions favorables à leur prolifération, les bactéries passent de la forme planctonique à une organisation en biofilm. Au moment de cette transition, la bactérie modifie profondément son métabolisme ce qui se traduit notamment par le passage d'une existence aérobie à une existence en anaérobiose. Un biofilm est constitué d'amas de bactéries enchâssées dans une matrice d'alginate, un polymère saccharidique. Sous forme de biofilms, les bactéries sont beaucoup moins sensibles aux antibiotiques que dans leurs formes planctoniques. Les xénobiotiques ont en effet beaucoup de difficulté à diffuser profondément à l'intérieur de ce milieu à haute viscosité et riche en groupement polaire. Paradoxalement, des résultats récents montrent que le fer +III à haute concentration est toxique pour la synthèse des biofilms et s'accompagne aussi leur destruction.

Actuellement, il n'existe pas de composé capable de délivrer sélectivement et de libérer des quantités toxiques de fer dans les biofilms. L'utilisation de sidérophores biomimétiques pourrait constituer un moyen commode d'arriver à cet objectif.

1.2.5. Les sidérophores bio-mimétiques et les applications chez l'Homme

Pour les organismes supérieurs tel que l'Homme, les analogues de sidérophores trouvent surtout des applications en médecine.

La lutte contre l'anémie peut-être un objectif, car une déficience en fer s'accompagne rapidement d'anémie plus ou moins sévère puis de désordres métaboliques graves, mais il existe déjà des substances simples comme l'EDTA ferrique qui permettent cette supplémentation.

De façon plus significative, la lutte contre la surcharge en fer, dans le cadre d'une thérapie par chélation, est beaucoup plus importante. En effet, la régulation de la charge en fer chez l'être humain (homéostasie) est particulièrement fine et vitale et lorsque l'organisme emmagasine trop de fer, il s'ensuit des maladies graves comme dans le cas de l'hémochromatose.⁵⁴ C'est une maladie fréquente et méconnue, souvent d'origine génétique, ou l'on constate un dépôt d'oxyde ferrique sur les organes vitaux comme le foie, le coeur ou les glandes surrénales. On observe alors chez l'adulte dès 40 ans des dégâts dus au stress oxydant engendrés par Fe^{3+} qui peuvent aboutir à la mort dans les cas les plus graves. Le Desferral est un agent utilisé pour lutter contre la surcharge en fer, mais il doit être injecté par voie veineuse et sa cinétique d'hydrolyse *in vivo* est rapide ce qui entraîne une efficacité faible.

Une autre application potentielle des sidérophores bio-mimétiques chez l'Homme est la lutte anti-cancéreuse. Le O-TRENTOX montre une activité anti-proliférative *in vitro* des cellules cancéreuses du foie, sans doute par privation en fer. La vectorisation *in vivo* de tels sidérophores constituerait une façon élégante et efficace de lutter contre certains cancers.

Après cet énoncé non exhaustif des applications potentielles des sidérophores naturels et biomimétiques qui soulignent l'importance actuelle des études sur les transporteurs du fer, nous présentons les objectifs de ce travail.

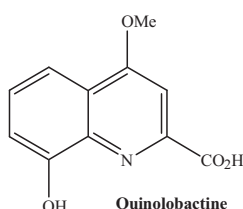
54) Y. Deugnier, *Hépatogastro.*, 1999, 6, 173.

1.3. LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

Deux aspects ont été abordés au cours de ces études. Le premier consiste dans l'étude d'un sidérophore naturel, la Quinolobactine et le deuxième aspect est focalisé sur la synthèse de l'Entérobactine et de ses dérivés en vue de concevoir notamment de nouveaux anti-biotiques.

1.3.1. La Quinolobactine, caractérisations physico-chimiques

L'intérêt que nous portons à la Quinolobactine provient du fait qu'il s'agit d'un sidérophore dont les propriétés de complexation n'étaient pas connues et qu'il est le seul sidérophore naturel comportant une structure quinoléine pour laquelle nous avons par ailleurs une bonne connaissance en physico-chimie et en complexation du fer.



Nous rappelons que la bactérie *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 produit deux sidérophores la Pyoverdine et la Quinolobactine⁵⁵.

Si la Pyoverdine est connue pour sa haute affinité (voir page 16), cette dernière à une affinité moyenne pour le fer^{56, 57}.

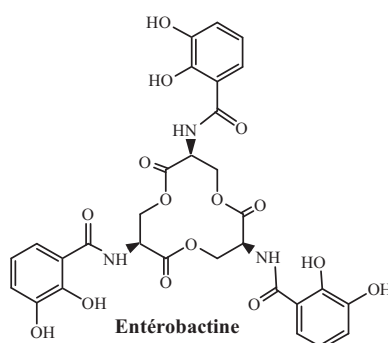
55) S. Matthijs, C. Baysse, N. Koedam, K. A. Tehrani, L. Verheyden, H. Budzikiewicz, M. Schaifer, B. Hoorelbeke, J-M Meyer, H. De Greve, P. Cornelis., *Molecular Microbiology*, **2004.**, 52., 371.

56) S. Matthijs, K. A. Tehrani, G. Laus, R. W. Jackson, R. M. Cooper, P. Cornelis, *Environnement Microbiology*, **2007**, 9, 425.

57) D. Mossialos, J-M Meyer, H. Budzikiewicz, U. Wolff, N. Koedam, C. Baysse, V. Anjaiah, P. Cornelis, *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, **2000**, 66, 487.

Nous avons déjà amorcé l'étude des propriétés physico-chimiques du complexe ferrique de la Quinolobactine au laboratoire³⁶. Cependant, la structure du complexe ferrique à l'état solide n'était pas connue et la nature bidenté ou tridenté de ce sidérophore restait à prouver sans aucune ambiguïté. Nous avons donc abordé une étude cristallographique et nous l'avons comparé aux résultats obtenus en solution. Pour ce faire, nous avons aussi synthétisé un analogue fluoré de la Quinolobactine qui permet en particulier d'utiliser la RMN de ¹⁹F pour les caractérisations. Les études ont été réalisées en combinant les méthodes d'analyse : spectrométrie de masse ESI, diffraction des RX, RMN ¹⁹F.

1.3.2. Synthèse, caractérisation et évaluation de dérivés de l'Entérobactine



La synthèse naturelle de l'Entérobactine est répandue dans toutes les souches sauvages d'*E. coli* et dans quelques bactéries Gram-positif et Gram-négatif : *Salmonella enterica* et *Klebsiella pneumoniae*.^{58, 59, 60} De plus, des souches de bactéries pathogènes sont susceptibles d'utiliser l'Entérobactine qu'elles ne produisent pourtant pas. Ce sidérophore présente donc un intérêt pour la conception d'anti-biotique. Une grande partie de cette thèse est donc consacrée à la synthèse et à la caractérisation de dérivés de l'Entérobactine à savoir :

36) S. Wendenbaum, P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer, M. A. Abdallah, *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 4877.

58) M. A. Fischbach, H. Lin, L. Zhou, R. J. Abergel, D. R. Liu, K. N. Raymond, B. L. Wanner, R. K. Strong, C. T. Walsh, A. Aderem, K. D. Smith, *PNAS*, **2006**, 103, 16502.

59) B. Tse, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7892.

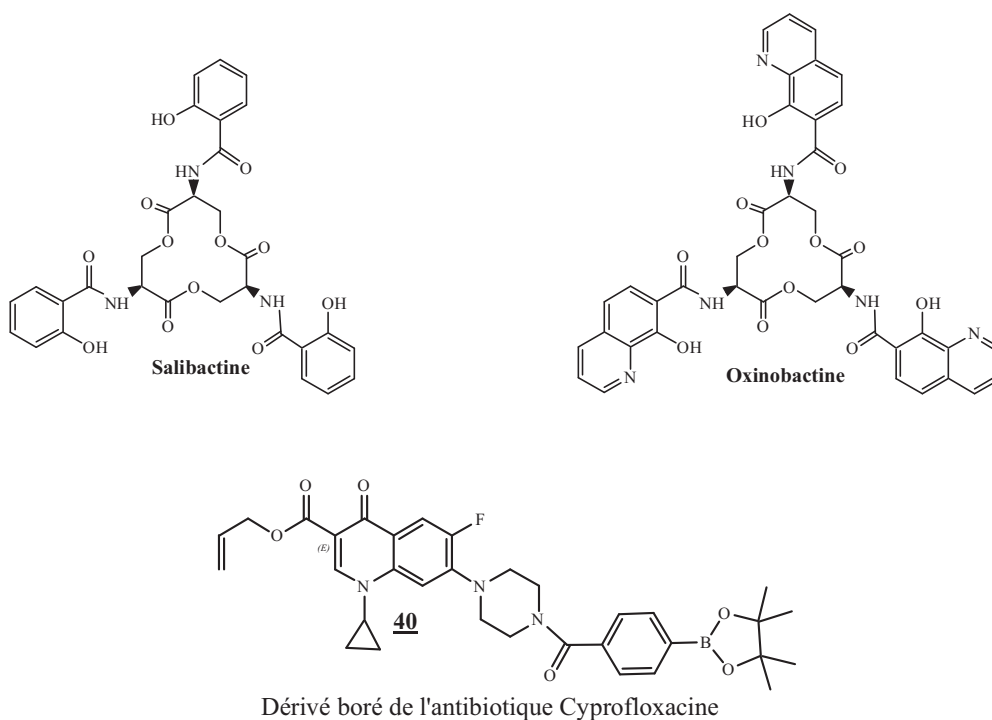
60) V. L. Pecoraro, F. L. Weigl, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 5133.

- l'Entérobactine elle même,

-deux dérivés bio-mimétiques de l'Entérobactine dérivant de l'acide salicylique ou de la 8-hydroxyquinoléine pris comme groupes chélateurs à la place des catéchols : la Salibactine et l'Oxinobactine

- des conjugués de l'Entérobactine ou de ses dérivés avec du phosphore ou des acides dérivants du bore, pour tenter d'inhiber le système de transport du fer des bactéries. Enfin, nous avons repris l'idée de la stratégie classique du cheval de Troie en préparant un dérivé boré de l'antibiotique Cyprofloxacin que nous avons couplé avec l'Entérobactine.

Les molécules ciblées sont représentées ci-dessous.



CHAPITRE 2 :

- SYNTHÈSES DE LA QUINOLOBACTINE, DE LA QUINOLOBACTINE FLUORÉE ET D'ACIDES 4- QUINOLENIQUES

- ÉTUDES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPLEXES DU FER ET DU GALLIUM

Dans ce chapitre, nous présentons la synthèse de la Quinolobactine et de son analogue fluoré. C'est au cours de cette synthèse que nous avons découvert une nouvelle synthèse « one pot » d'acides 4-quinoléinecarboxyliques. Nous parachevons ce chapitre par les études physico-chimiques de la complexation de Fe^{3+} et Ga^{3+} de la Quinolobactine et de la fluoro-Quinolobactine.

2.1. Synthèse de la Quinolobactine (Q)

La Quinolobactine (**Figure 28, 4**) est obtenue naturellement à partir de la bactérie *Pseudomonas fluorescens*⁵⁵, cependant le rendement du processus de production reste faible. Cela empêche la réalisation d'études physico-chimiques qui nécessitent des quantités de produit de l'ordre de la centaine de milligramme. Pour circonvenir ce problème de disponibilité, nous avons cherché une méthode de synthèse organique de cette molécule. Dans la littérature, seuls Neuenhaus et *al.* ont proposé une synthèse de la quinolobactine à partir d'acide xanthurénique.

55) S. Matthijs, C. Baysse, N. Koedam, K. A. Tehrani, L. Verheyden, H. Budzikiewicz, M. Schaifer, B. Hoorelbeke, J-M Meyer, H. De Greve, P. Cornelis., *Molecular Microbiology*, **2004.**, 52., 371

Cependant, aucun mode opératoire n'est détaillé. Nous avons donc tenté de reproduire cette synthèse (**Figure 27 a**). Si nous avons pu refaire sans difficulté la première étape en réalisant la chloruration de l'acide xanthurénique par POCl_3 pour obtenir le composé **1**, en revanche plusieurs essais de conversion de ce chlorure se sont soldés par des échecs. Que ce soit en présence d'un très gros excès (10 éq) de méthylate de sodium et même on opérant à reflux du DMF, on ne recueille pas le produit de $\text{S}_\text{N}ar$ mais seulement la réactif de départ **1**. Nous avons alors pensé que cette absence de réactivité provenait de la déprotonation préalable de l'acide carboxylique qui en développant une charge négative délocalisée sur le cycle empêche alors toute nouvelle approche de méthylate (**Figure 27 b**).

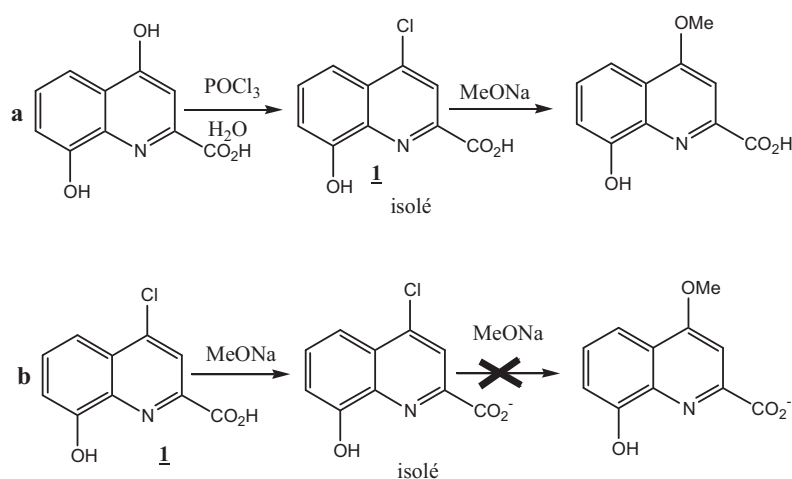


Figure 27 : Schéma de synthèse de la Quinolobactine par POCl_3 selon Neuenhaus et *al.*

Cette hypothèse s'est révélée exacte car en estérifiant préalablement l'acide **1**, la $\text{S}_\text{N}ar$ par le méthylate se produit alors aisément. Avec ces conditions il est possible d'accroître la simplicité de la synthèse en réalisant un enchaînement des réactions sans isoler les intermédiaires **1** et **2** (**Figure 28**)³⁶.

36) A. du Moulinet d'Hardemare, G. Serratrice, J-L. Pierre, *BioMetals*, **2004**, 17, 691.

Finalement, après une dernière étape de saponification, la Quinolobactine **4** peut être isolée avec un très bon rendement global de 85%.

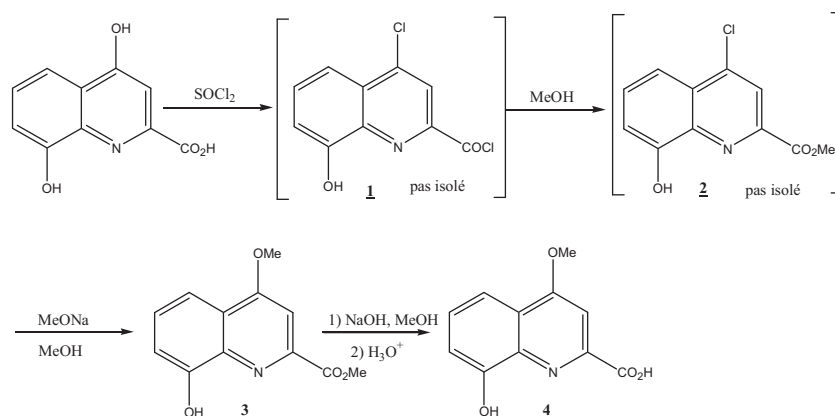


Figure 28 : Schéma de synthèse de la Quinolobactine.

2.2. Synthèse de la quinolobactine fluorée (QF)

Nous avons aussi abordé la synthèse d'une Quinolobactine fluorée. En effet, l'atome de fluor 19 est une sonde RMN plus sensible à la variation chimique que le proton en raison notamment d'une largeur spectrale importante. Par le biais de ¹⁹F nous voulions confirmer la stœchiométrie Fe/Q par une autre technique que la spectrophotométrie UV-Visible utilisée dans l'étude déjà réalisée au laboratoire.

Le choix du site de fixation du fluor est dicté par la nécessité de maintenir une bonne sensibilité de réponse de ¹⁹F lors de la complexation. Dans ce cadre la position en *para* de phénol devait être la plus convenable car elle conserve une bonne conjugaison O-F qui permet de « transmettre » l'information lors de la complexation du phénol. La position en *ortho* du phénol est moins satisfaisante car la forte proximité du fluor et de l'oxygène pouvait induire une gêne stérique importante. L'influence électronique du fluor n'est pas à craindre de façon

excessive car si F est le plus électronégatif et exerce donc un effet inducteur $-I$ puissant, cet effet est contrebalancé par l'aspect mésomère donneur $+M$ intense.

La synthèse de cette molécule n'est pas connue et nous l'avons donc abordé comme de celle de la Quinolobactine : en partant de l'acide xanthurénique mais fluoré en position 5 comme composé clé (**Figure 29**).

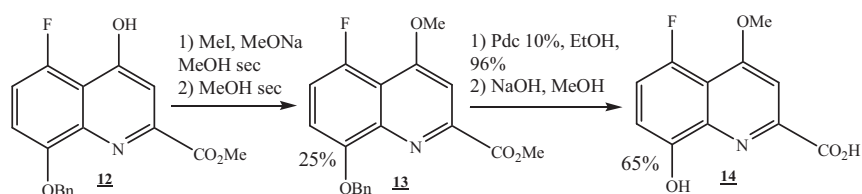


Figure 29 : Synthèse de la quinolobactine fluorée.

La synthèse de l'ester d'acide 5-fluoro-xanthurénique **12** a donc été entreprise. Nous nous sommes inspirés de la synthèse de l'acide xanthurénique décrite originellement par Furst et Olsen⁶¹. Ces auteurs partent de l'*ortho*-anisidine et du diéthyl-oxaloacétate de sodium et arrivent en quatre étapes à l'acide xanthurénique (**Figure 30**).

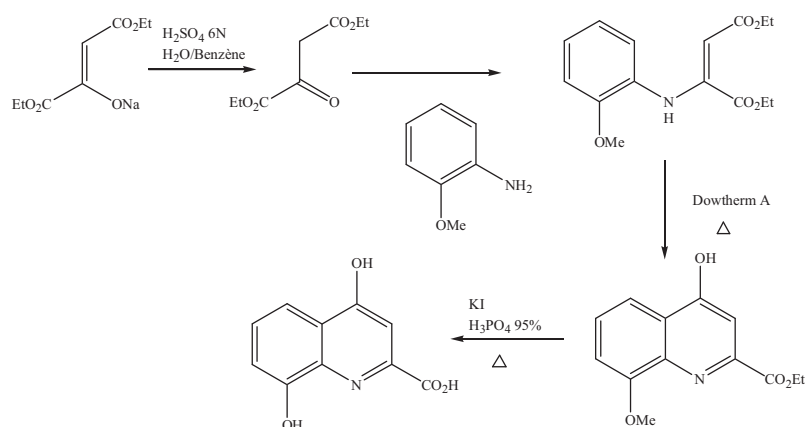


Figure 30 : Synthèse de l'acide xanthurénique selon Furst et Olsen.

61) A. Furst, C. J. Olsen, *Journal of Organic Chemistry*, **1951**, 16, 412.

Cependant, au cours de la dernière étape de déméthylation, on observe une décarboxylation partielle. Cette réaction est particulièrement gênante car les deux hydroxyquinoléines produites sont très difficilement séparables. Nous avons alors opté pour un groupe protecteur du phénol plus facile à enlever et dans des conditions où la décarboxylation ne peut pas se produire : le benzyle.

Le schéma de synthèse de l'ester d'acide 5-fluoro-xanthurénique retenu est donc le suivant (**Figure 31**) :

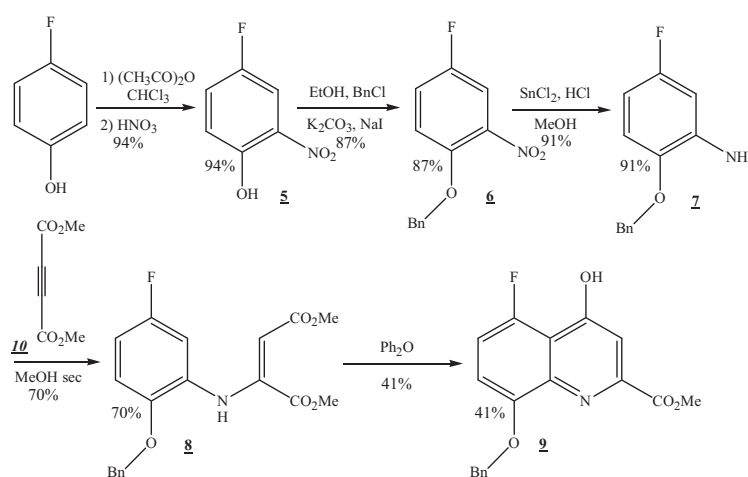


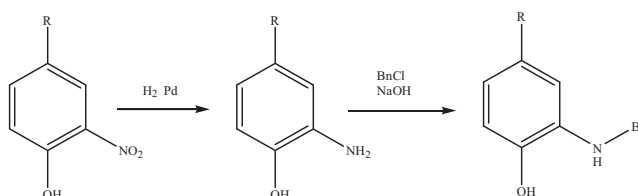
Figure 31 : Schéma de synthèse de l'acide 5-fluoro-xanthurénique.

Le réactif de départ est le 4-fluorophénol, composé commercial et bon marché, qui subit une réaction classique de nitration⁶² avec HNO_3 fumant et avec un très bon rendement de 94%. Il faut remarquer que le véritable agent de nitration est ici l'anhydride mixte Me-CO-O-NO_2 , formé *in situ* par HNO_3 fumant et l'anhydride acétique.

62) R. G. Clewley, G. G. Gross, A. Fischer, G. N. Hheenderson, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 1299.

Ensuite le phénol est benzylé avec un rendement satisfaisant de 87% en suivant les conditions décrites par Miller *et al.*⁶³

La fonction nitro est réduite en amine par le chlorure stanneux en milieu acide chlorhydrique. Il est impossible d'inverser l'ordre réactionnel de ces deux étapes. En effet, si l'on réduit d'abord le nitro en amine avant la protection du phénol, la benzylation touche essentiellement l'azote comme nous l'avons vérifié expérimentalement (**équation 1**).



Équation 1

L'étape suivante consiste en une addition 1,4 de l'azote de l'aniline sur l'acétylène dicarboxylate de diméthyle pour obtenir le composé **8** (étape de rendement égal à 70%). Ensuite, une cyclisation thermique dans le diphényle éther avec un rendement moyen sensiblement proche de 41%⁶⁴ permet d'obtenir **9**.

De façon surprenante, la *O*-méthylation du groupement phénol en position 4, avec MeI et MeONa, se produit avec un rendement très faible de 25%. Cette perte de produit ne s'explique pas simplement par l'observation de l'estérification concomitante mais plus certainement par une substitution nucléophile aromatique du fluor. En effet, l'analyse du brut réactionnel montre

63) D. D. Miller, A. Hamada, M. T. Clark, A. Adejare, P. N. Patil, G. Shams, K. J. Romstedt, S. U. Kim, U. Intrasuksri, J. McKenzie, D. R. Feller, *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 1138.

64) K. M. Muirhead, N. P. Botting, *ARKIVOC*, **2002**, III, 37.

très clairement la présence d'un signal important de l'ion fluorure F^- ! Nous n'avons pas optimisé cette étape et finalement, la Quinolobactine fluorée est obtenue après la réaction de débenzylation (de rendement égal à 96%) suivie par la réaction de saponification (d'un rendement égal à 65%).

Cette méthode d'obtention de la fluoroquinolobactine présente des difficultés au niveau de la purification du produit final et donne de faibles rendements. Nous nous sommes donc fortement intéressés pour trouver une nouvelle voie plus directe de la synthèse des dérivés de la Quinolobactine qui permet également d'obtenir de meilleurs rendements.

Les tentatives que nous avons effectuées pour améliorer cette synthèse nous ont permis de découvrir une nouvelle voie d'accès aux acides quinolines-4-carboxyliques substitués également en position 2 et/ou sur le « noyau benzénique » à partir d'aniline et d'acide acétylène dicarboxylique (AADC).

2.3. Une nouvelle voie d'accès direct aux acides quinoline-4-carboxyliques

Les quinoléines sont des hétérocycles qui se retrouvent très souvent dans la nature (faune et flore) en tant que sous-unité structurale de nombreux alcaloïdes. C'est aussi un pharmacophore très important, notamment dans le cas de médicaments anti-paludéens. En raison de cette importance, les méthodes de synthèse de dérivés de quinoline ont fait l'objet de nombreuses recherches. A ce titre, les synthèses dites de Skraup-Doebner-Von-Miller, de Friedländer et plus récemment celle de Povarov sont les plus représentatives.

Nous présenterons d'abord ces méthodes générales qui doivent permettre d'accéder aux dérivés originaux d'hydroxy-quinoline substitués en position 2 et nous discuterons ensuite des résultats obtenus.

2.3.1. Les grandes voies de synthèse menant à de dérivés de quinoléine

a) Synthèse de Skraup-Doebner-Von-Miller

Historiquement la synthèse de Skraup⁶⁵ consiste à faire réagir par addition nucléophile 1,4 une aniline et l'acroléine en milieu acide. Le produit intermédiaire formé subit une réaction de cyclisation intramoléculaire et fini par se réaromatiser par une séquence de déshydratation puis d'oxydation (**Figure 32**).

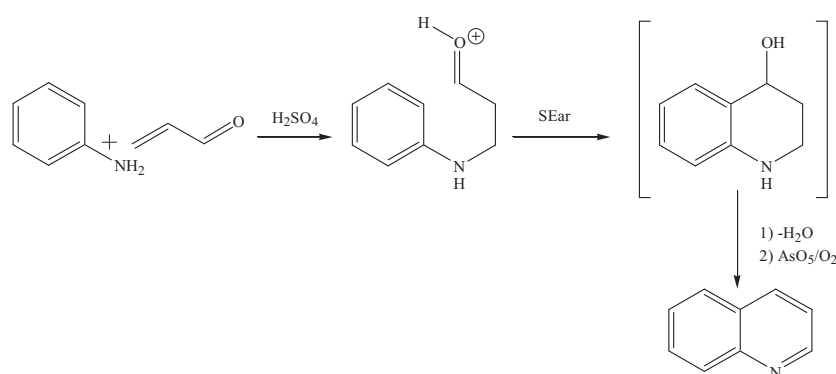


Figure 32 : Synthèse de Skraup.

L'oxydation par l'air étant limitée, il est difficile d'obtenir la quinoléine en quantité suffisante⁶⁶. C'est pourquoi l'utilisation d'un agent oxydant tel que AsO₅ permet d'augmenter la quantité de quinoléine au détriment de la dihydroquinoline. La réaction de Skraup-Doebner-Von-Miller est une extension

65) Z.H. Skraup, *Monatsh.Chem.*, **1880**, , 316.

66) B. E Cohn, R. G. Gustavson, *J Am. Chem. Soc.*, **1928**, 50, 2709.

de celle de Skraup. Elle permet d'obtenir des quinoléines substituées en position 2 à partir d'aldéhydes ou de cétones α, β -insaturés, voir **Figure 33**.

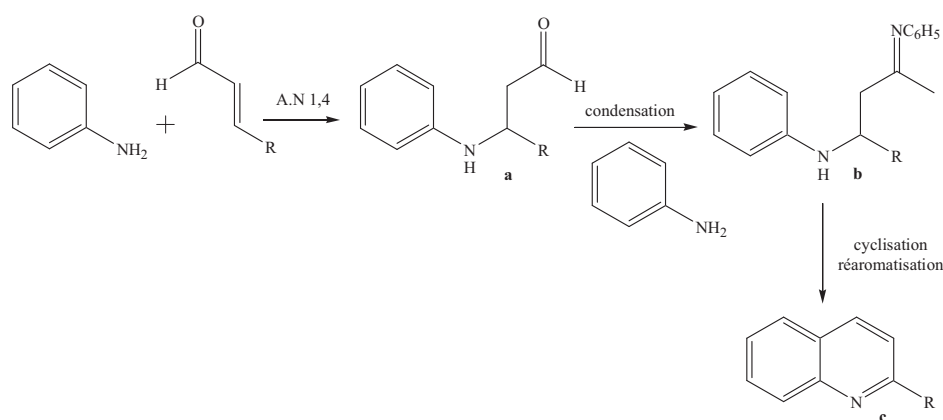


Figure 33 : Synthèse de Skraup-Doebner-Von-Miller.

Des études suggèrent^{67, 68} que la formation de l'imine **b** (**Figure 33**) comme intermédiaire clé serait indispensable à l'étape de cyclisation. Si la réaction de Skraup-Doebner-Von-Miller permet la formation de quinoléines **c** (**Figure 33**) substituées en position 2, les rendements restent très variables. En effet, la réaromatisation nécessite toujours une étape d'oxydation des dihydroquinoléines en quinoléines qui est incomplète, ce qui rend la séparation des mélanges délicate.

b) Synthèse de Friedländer

Historiquement, cette synthèse consiste à condenser un *o*-aminobenzaldéhyde avec l'acétaldéhyde. Cette réaction est étendue à la condensation d'*o*-aminophénylcétone et de composés contenant un groupe à

67) W. Koning, *Ber. Dtsch. Chem.*, **1923**, 26B, 1853.

68) T. P. Forrest, G. A. Dauphinee, W. F. Miles, *Can. J. Chem.*, **1969**, 47, 2121.

méthylène actif comme les aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, esters, amides voire nitriles ou aldoximes (**Figure 34**).

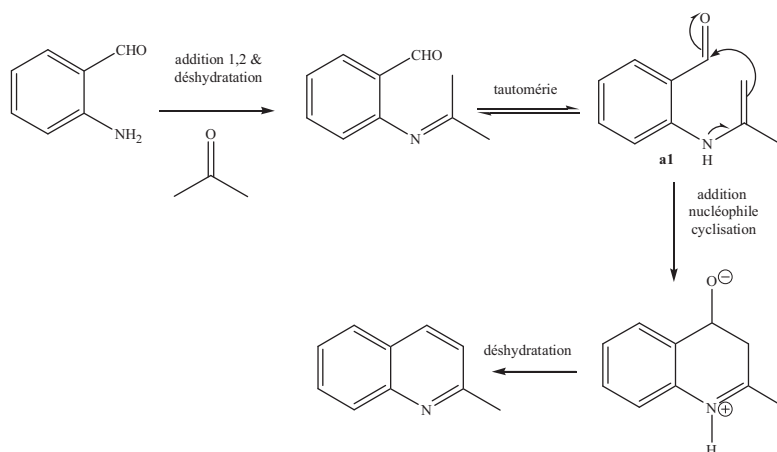


Figure 34 : Synthèse de quinoléine selon Friedländer.

Le groupe méthylène étant plus ou moins activé, il est parfois nécessaire d'utiliser des catalyseurs (acides ou bases) ou bien d'augmenter la température de réaction. L'énamine formé **a1** (**Figure 34**), riche en électron, réalise une addition nucléophile sur l'aldéhyde (ou la cétone) pour donner un produit de cyclisation intramoléculaire.⁶⁹ Ce produit, non isolable, se transforme en quinoléine par déshydratation.^{70, 71} Un autre mécanisme faisant intervenir une céto-lisation en première étape est aussi envisageable (**Figure 35**).

67) Friedländer, *Ber.*, **1882**, 15, 2572.

70) F. W. Bergstrom., *Chem. Rev.*, **1944**, 35, 77.

71) J. A. Joule, G. F. Smith, *Heterocyclic. Chem.*, **1972**, 104.

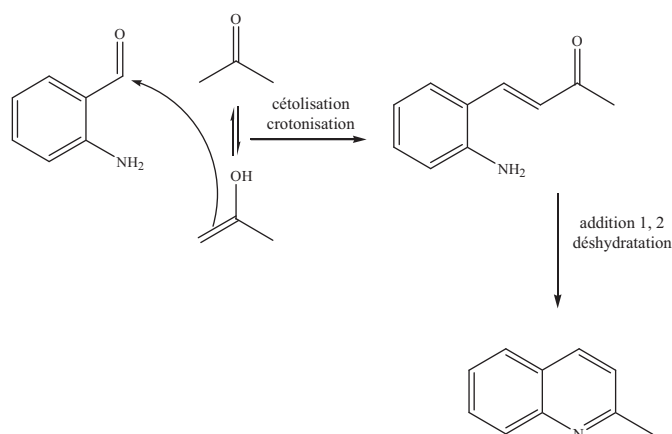


Figure 35 : Synthèse de quinoléine selon Friedländer.

Dans certaines réactions, les deux mécanismes sont compétitifs. Le passage par une base de Schiff ou par une cétone α, β -insaturée dépend des conditions de synthèse : nature des réactifs, des catalyseurs (acides ou bases), de la température et du pH. La diversité des substituants (X et R) sur le composé *o*-aminocarbonylé ainsi que celle du groupe contenant le méthylène réactif (R' et R'') rendent la réaction de Friedländer utile pour la préparation de quinoléine substituée en position 2 et/ou 8, dont la structure correspond aux ligands que nous désirons obtenir (**Figure 36**).

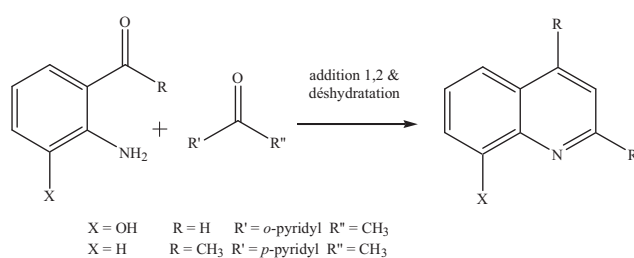


Figure 36 : Synthèse de dérivés 2-8-quinoléine.

Cependant, l'obtention de composés *o*-aminocarbonylés par ailleurs réputés peu stables est délicate car les étapes de synthèse sont nombreuses et difficiles, ce qui limite fortement l'intérêt de la réaction de Friedländer.

c) Synthèse de Povarov

La réaction de Povarov (**Figure 37**)⁷² consiste en une cycloaddition [4+2] d'une imine aromatique avec un alcène (réaction de type Diels-Alder). L'alcène doit être riche en électrons, c'est pourquoi l'on utilise des énamines, des éthers d'énol, etc...

Généralement, la réaction de Povarov conduit à une tétrahydroquinoléine ax, mais qui subit une élimination par l'emploi d'un acide de Lewis (BF_3 , OTf_3 , ect...). Ici encore la dihydroquinoléine **b** (**Figure 37**) doit s'oxyder pour conduire à la quinoléine ce qui limite l'intérêt de la réaction de Povarov.

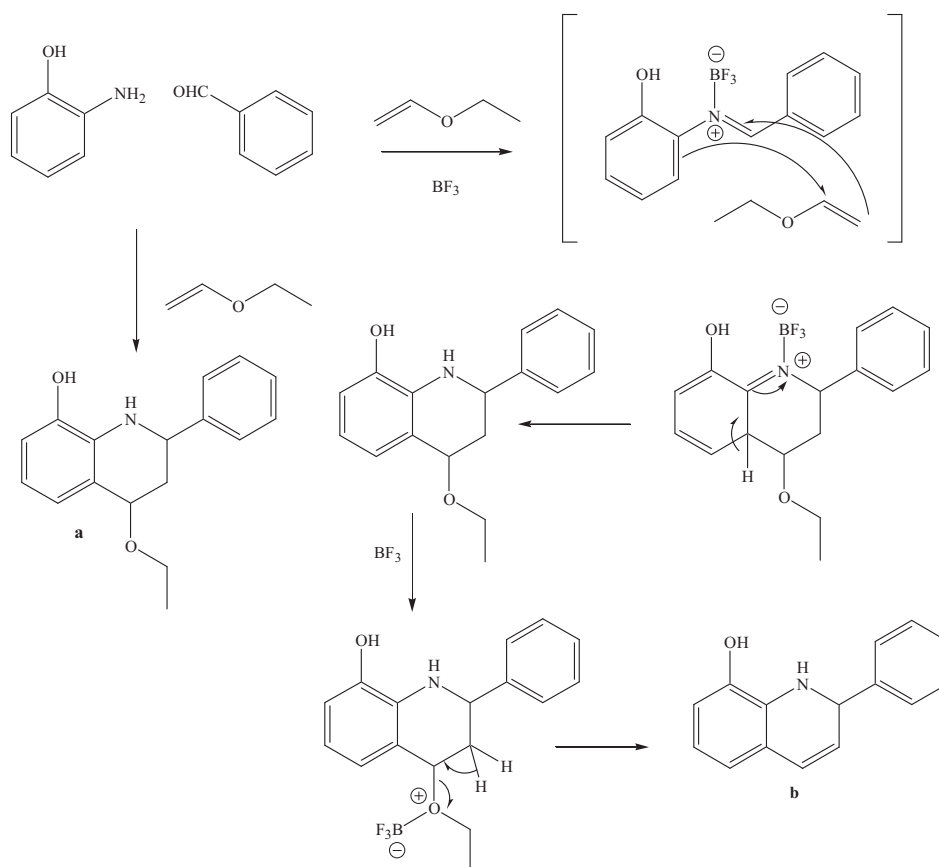
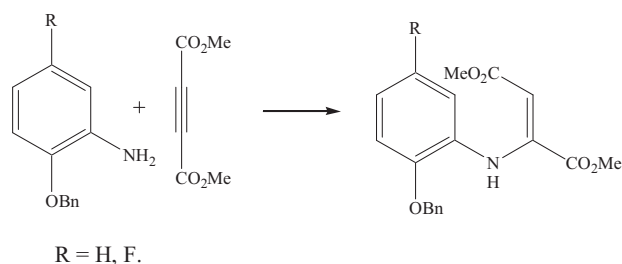


Figure 37 : Synthèse de Povarov.

⁷²) L. S. Povarov, *Russ. Chem. Rev.*, **1967**, 36, 656.

Notre synthèse de l'ester de l'acide 5-fluoro-xanthurénique s'apparente à une synthèse de type Skraup-Doebner-Von-Miller où l'aniline est le composé **7** et le composé carbonylé α, β -insaturé est l'acétylène dicarboxylate de diméthyle (**Équation 2**).



Équation 2

Pour obtenir un meilleur rendement en acide xanthurénique, nous avons tenté de diminuer le nombre d'étapes. Tout naturellement, les étapes coûteuses de protection déprotection sont à éliminer en premier. Nous avons donc essayé de faire réagir un amino-phénol à la place d'anisidine ou de benzyloxy-aniline. Dans ces conditions l'*o*-aminophénol réagit bien sur l'acétylène dicarboxylate de diméthyle mais il ne conduit pas au produit attendu **15'** mais au composé de lactonisation **15** (**Figure 38a**) et ceci avec un excellent rendement et quelques soient les conditions de pH (avec ou sans acide acétique) !

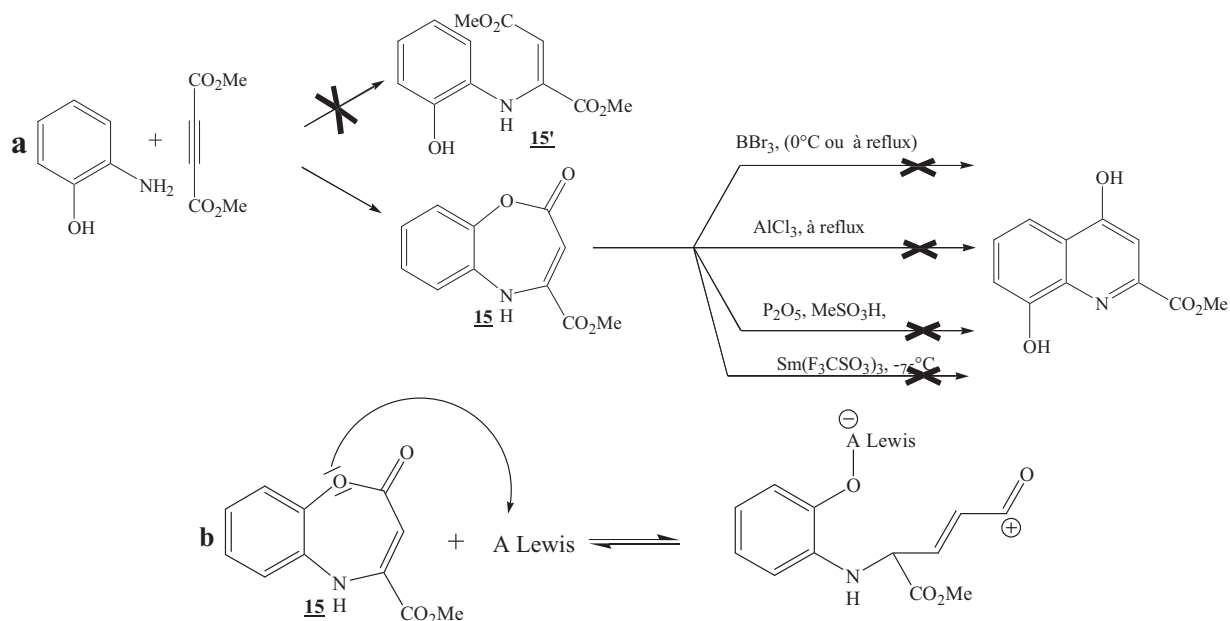


Figure 38 : Formation et essais de cyclisation du composé **15 avec les acides de Lewis.**

Dans la bibliographie, il existe des exemples de S_Nar intramoléculaires où l'électrophile est un ester (c'est d'ailleurs le cas de la cyclisation thermique de **8** en **9**). Souvent, l'activation de l'ester par un acide de Lewis facilite cette réaction. Puisque la lactone **15** est en quelque sorte un ester, il nous a semblé intéressant d'utiliser l'action d'un acide de Lewis dur au sens des Acides et des Bases Dur et Mous (concept de Pearson). Nous espérons ouvrir la lactone par cette activation et provoquer ensuite la cyclisation par S_Ear (**Figure 38b**).

Ainsi, plusieurs essais de cyclisation avec des acides de Lewis^{73, 74} ont été menés sur le produit de réaction de l'*ortho*-aminophénol ou de l'anisidine avec l'acétylène dicarboxylate de diméthyle.

Après plusieurs essais réalisés sur **15** avec les différents acides de Lewis testés (BBr₃, AlCl₃, P₂O₅ et Sm(F₃CSO₃)₃) et bien qu'en variant les conditions

73) D-M. Cui, M. Kawamura, S. Shimada, S. Shimada, T. Hayashi, M. Tanaka, *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 4007.

74) B. Jiang, Y-G Si, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 9449.

opérationnelles (T, les quantités d'acide de Lewis) nous obtenons inmanquablement le même produit de départ.

L'échec de ces réactions montre bien que la protection du phénol reste indispensable. Pour le prouver, nous avons réalisé des essais identiques sur le produit de réaction de l'anisidine avec l'acétylène dicarboxylate de diméthyle, le composé **16**. Mais si cette fois certains essais donnent effectivement le produit de cyclisation **17**, on observe aussi une décarboxylation, comme c'est le cas notamment avec BBr_3 ou avec le trifluorométhane sulfonate de samarium (**Figure 39**).

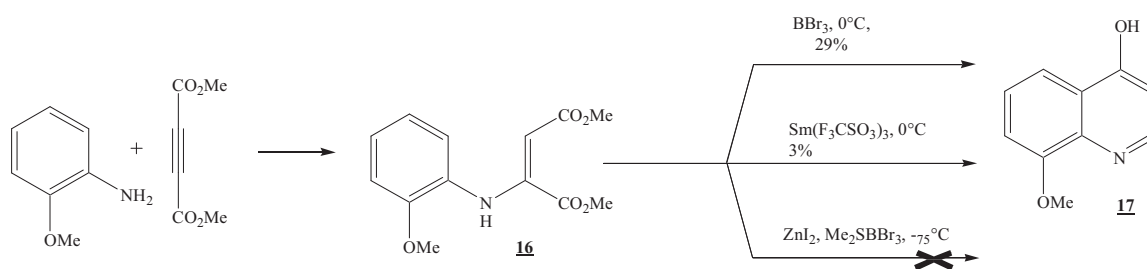
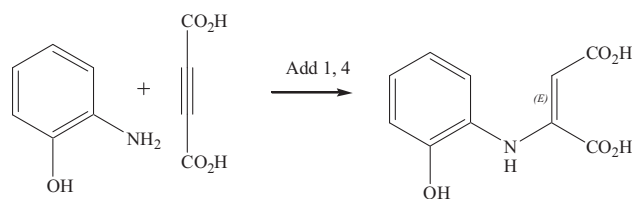


Figure 39 : Essai de cyclisation du composé **16 avec les acides de Lewis**

En consultant la bibliographie, on observe que la décarboxylation est souvent induite par un acide très fort et nous avons tenté de l'éviter en utilisant un acide faible comme l'acide acétique. Dans ces conditions, aucune réactivité de **16** n'est constatée, il n'y a pas de cyclisation.

Une nouvelle tentative de réaction de l'*ortho*-amino-phénol a finalement été réalisée mais avec l'acide acétylène dicarboxylique (AADC) ou son sel mono-potassique (et non pas son ester deméthylique). Nous espérons en effet éviter l'étape de transestérification lactonisante pour obtenir l'intermédiaire d'addition 1, 4 suivant :



Plusieurs essais ont été conduits soit avec le sel mono potassique de l'AADC soit avec l'AADC (les rendements sont calculés par rapport à l'aniline utilisée).

- avec le sel mono potassique de l'AADC :

L'*ortho*-anisidine réagit avec le sel sans que l'on puisse isoler le composé d'addition 1, 4 acyclique. A notre grande surprise nous avons pu isoler et caractériser de façon univoque par une étude cristallographique à l'aide de la diffraction des rayons X le composé de cyclisation intramoléculaire représenté **Figure 40** et le schéma **ortep 1**.

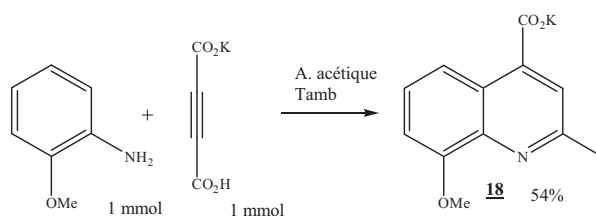
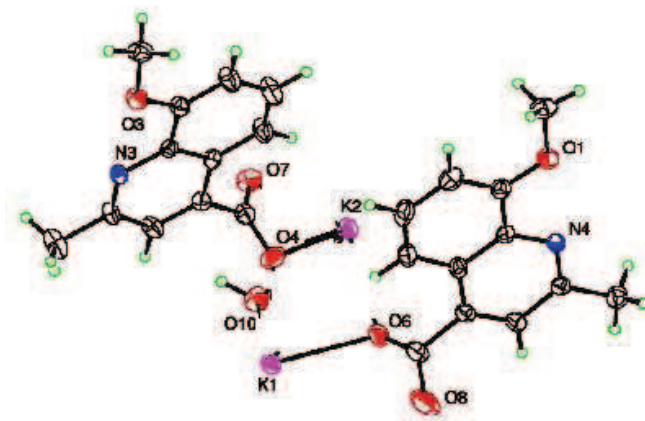


Figure 40 : Réaction de cyclisation de l'*o*-anisidine avec le sel mono potassique de l'AADC.

Schéma ORTEP du composé 18.

Lorsque l'on utilise l'*ortho*-aminophénol, la réaction conduit à un résultat similaire avec l'obtention d'un ester en position 4 de la quinoléine (**Figure 41**).

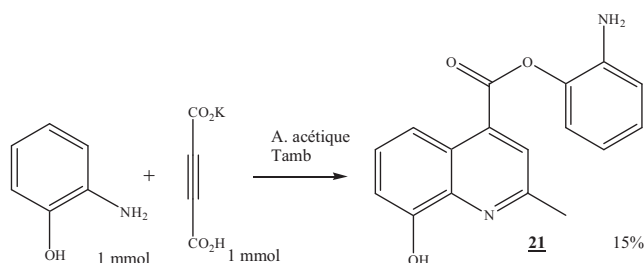


Figure 41 : Réaction de cyclisation de l'*o*-aminophénol avec le sel mono potassique de l'AADC.

- Avec l'AADC :

L'*ortho*-aminophénol traité avec un excès d'AADC (4 éq) permet d'obtenir avec un rendement de 7% (isolé par simple filtration, rendement non optimisé basé sur l'aniline) l'hydroxyquinoléine suivante :

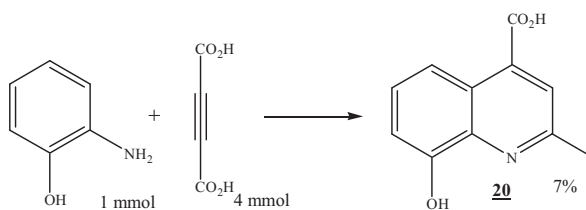


Figure 42 : Réaction de cyclisation de l'orthoaminophénol avec l'AADC.

Avec l'*ortho*-anisidine, les résultats sont à nouveau meilleurs en ce qui concerne le rendement puisque on récupère alors 51% de produit de cyclisation (obtenu par simple précipitation puis lavage) (**Figure 43**).

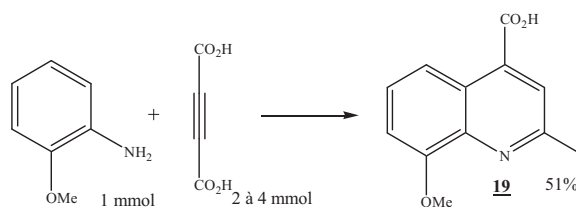


Figure 43 : Réaction de cyclisation de l'orthoanisidine avec l'AADC.

La nature du solvant ne semble pas très importante quant au résultat, puisque le méthanol et l'acide acétique donnent le même rendement. La présence d'un très gros excès d'AADC ne modifie pas le résultat non plus.

Le décompte des carbones montre que deux molécules au moins d'AADC sont nécessaires à cette transformation puisque 5 carbones sont présents en fin de réaction (alors que l'AADC n'en comporte que 4 carbones). D'autre part, la présence d'un groupe méthyle implique la transformation de l'AADC. Or, il est connu que les acides α -acétylène carboxyliques sont moyennement stables et se décarboxylent (cependant surtout thermiquement). La formation d'un groupe méthyle s'interprète alors plus facilement par une réaction d'hydratation de la triple liaison de l'acide propynoïque issu de la monodécarboxylation de l'AADC. Cette dernière est peut être catalysée par l'aniline puisque en absence

de celle-ci, l'AADC est suffisamment stable pour être commercialisé et stocké (**Figure 44**).

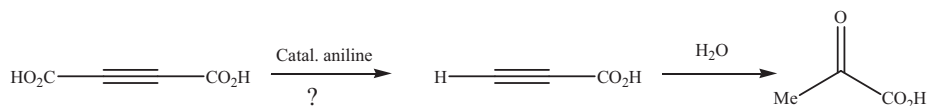


Figure 44 : Décarboxylation de l'AADC en présence de catalyseur aniline

Pour étayer ces hypothèses, nous avons mis à réagir l'*ortho*-anisidine avec l'acide pyruvique dans les mêmes conditions que précédemment. Il se forme bien le même produit de cyclisation quinolinique mais avec un rendement plus faible de 30% (**Figure 45**).

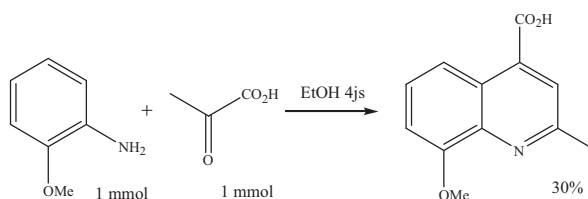


Figure 45 : Réaction de cyclisation de l'*ortho*-anisidine avec l'acide pyruvique.

Puisque l'acide pyruvique conduit au même produit il faut aussi prévoir qu'il puisse se décarboxyler car seuls 5 carbones sont toujours fixés au final. La décarboxylation de l'acide pyruvique engendre alors l'acétaldéhyde CH_3CHO . Pour étayer à nouveau cette hypothèse nous avons mis à réagir l'*ortho*-anisidine avec de l'acétaldéhyde puis de l'acide pyruvique (voir **Figure 46**).

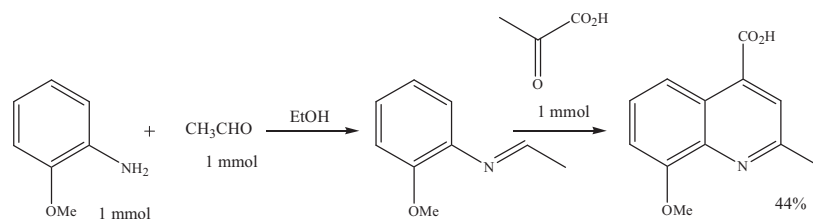


Figure 46 : Réaction de cyclisation de l'*ortho*-anisidine avec l'acide pyruvique et l'acétaldéhyde.

A nouveau nous avons obtenu le produit attendu avec un rendement similaire à celui de la réaction avec l'AADC.

Au final nous pouvons dire que l'AADC se comporte comme un donneur d'acétaldéhyde et d'acide pyruvique qui réagissent avec l'anisidine pour donner le produit de cyclisation sans que nous puissions préciser davantage le mécanisme à ce niveau d'expérimentation.

Pour évaluer l'intérêt de cette réaction, nous avons employé une diamine aromatique.

Réaction de l'AADC avec la 4, 5-diméthoxyphénylène-1, 2-diamine.

En utilisant une phénylènediamine à la place d'une aniline, nous espérons pouvoir isoler une phénanthroline mais nous n'avons pas pu l'identifier dans le mélange réactionnel. Cependant, une intéressante 8-amino-quinoléine est obtenue avec un rendement satisfaisant de 51% pour une réaction « one pot » (**Figure 47**).

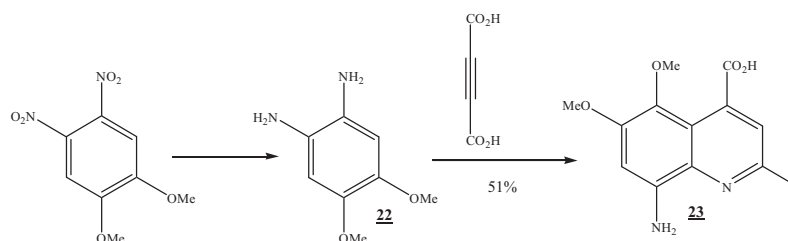


Figure 47 : Essai de cyclisation du composé 22 avec l'acide acétylène dicarboxylique.

Toujours pour explorer la flexibilité de cette nouvelle voie d'accès aux acides 4-quinoléinecarboxyliques, nous avons employé un aldéhyde en combinaison avec l'AADC. Ceci dans l'optique de pouvoir obtenir un autre groupe que le méthyle en position 2.

Notre choix s'est porté d'emblée sur la pyridine-carbaldéhyde : la réaction des trois composantes aniline + pyridine-carbaldéhyde + AADC pouvant former en une étape un très intéressant ligand ditopique.

La réaction entre la pyridine-2-carbaldéhyde, la 3-4-5-triméthoxyphénylamine et l'AADC n'a malheureusement pas permis l'isolement du produit attendu (voir **Figure 48**) mais il est majoritaire dans le brut réactionnel comme le montre l'analyse de celui-ci par SM-DCM.

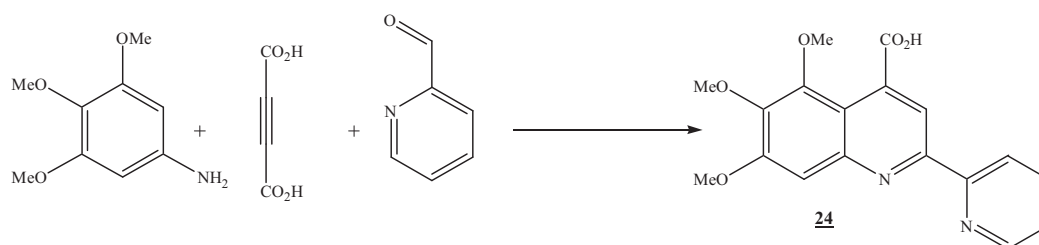


Figure 48 : Cyclisation avec la pyridine-2-carbaldéhyde, la 3-4-5-triméthoxyphénylamine et l'acide acétylène dicarboxylique.

Comme nous l'avons montré, l'AADC se comporte comme un donneur d'acide pyruvique et nous l'avons donc essayé à sa place dans une autre tentative d'accès à ce ligand ditopique. Si ce type de réaction n'est pas original car décrit par la littérature^{75, 76}, il nous a permis d'obtenir le composé **24** avec une rendement égal à 44% (**Figure 49**). Ce composé nous servira de référence pour trouver ultérieurement des conditions plus favorables de formation avec l'AADC.

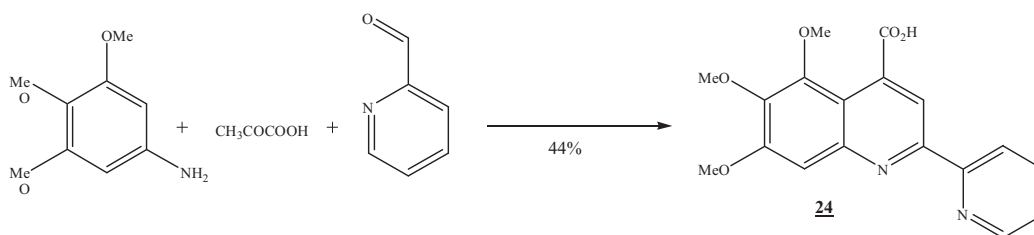


Figure 49 : Cyclisation avec la pyridine-2-carbaldehyde, 3-4-5-triméthoxy-phenylamine et l'acide pyruvique.

Pour conclure, nous n'avons pas eu assez de temps pour délimiter le champ de cette nouvelle réaction où l'AADC se comporte comme un donneur d'acide pyruvique et d'éthanal en une étape. Le mécanisme demeure aussi opaque mais la facilité de l'étape d'addition et de cycloaddition réalisée à température ambiante incitent à poursuivre les travaux au laboratoire.

Puisque notre objectif primaire était de mieux caractériser le complexe ferrique de la Quinolobactine, nous nous sommes retournés vers ces études car nous disposions de suffisamment de composé. C'est ce que nous décrivons dans ce qui suit.

75) G. J. Atwell, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 396.

76) G. A. Epling, A. A. Provatas, *Chem. Commun.*, **2002**, 10, 1036.

2.4. Synthèse et caractérisation des complexes du fer ou du gallium avec la Quinolobactine

Pour aborder cette étude physicochimique, nous avons préparé des solutions de complexe du fer mais aussi du gallium car il constitue un mime diamagnétique du fer qui permet une caractérisation par RMN plus aisée.

Une première tentative a été réalisée avec l'eau prise comme solution pour être au plus près des conditions « naturelles ». Cependant, la quinolobactine n'y est pas soluble sous la forme de son chlorhydrate. Seul l'adjonction d'un excès des K_2CO_3 permet de la solubiliser notablement dans l'eau. Mais l'ajout d'un équivalent de nitrate de gallium ou de perchlorate de fer conduit à la précipitation des hydroxydes. Pour pallier ce problème de solubilité nous avons réalisé la complexation dans le méthanol et en présence de deux équivalents de triéthylamine comme base faible. La complexation du gallium et du fer est alors possible sans observer la précipitation des hydroxydes. Les résultats de complexation sont récapitulés comme suit :

2.4.1. Avec le gallium

La solution Q/Ga est obtenue à partir de nitrate de gallium l'analyse par spectrométrie de masse, avec la technique d'ionisation par électrospray (ESI) donne la masse exacte du complexe correspondant à la stœchiométrie 2 quinolobactine/1 gallium ($M_{\text{Quinolobactine}} = 219,05 \text{ g/mol}$, $M_{\text{Ga}} = 68,93 \text{ g/mol}$), voir **Figure 50**.

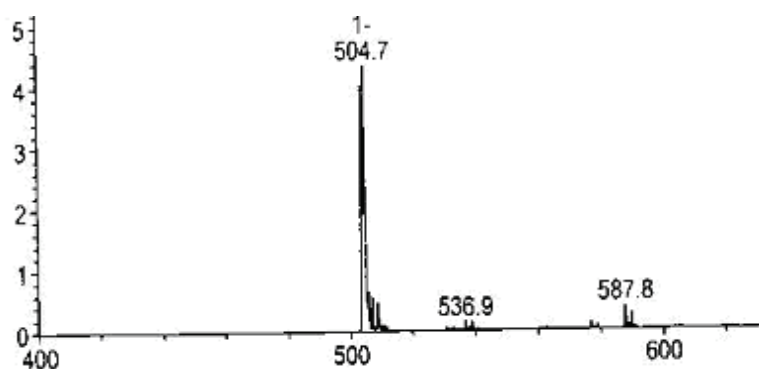


Figure 50 : Le spectre ESI indique la stœchiométrie 2/1 du complexe Q/Ga.

Le profil isotopique calculée et expérimental sont cohérent avec cette stœchiométrie et avec la présence d'un seul métal.

2.4.2. Avec le fer

Ici la source de métal est l'acétylacetonate de fer $\text{Fe}(\text{acac})_3$ pour éviter les problèmes de solubilité des sels inorganiques du fer dans le méthanol. La caractérisation de ce complexe est décrite ci-dessous :

- La spectrométrie de masse (ESI) : la masse du complexe Q/Fe^{3+} obtenue correspond à la stœchiométrie 2/1 ($M_{\text{Quinolobactine}} = 219,05 \text{ g/mol}$, $M_{\text{Fe}} = 55,93 \text{ g/mol}$), voir **Figure 51**, elle confirme les études par spectrophotométrie UV-Visible qui avaient déjà été réalisées au laboratoire.

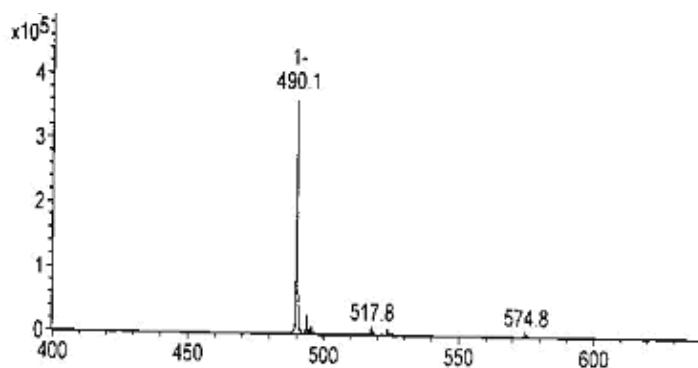


Figure 51 : Le spectre ESI indique la stœchiométrie 2/1 du complexe Q/Fe^{3+} .

On peut donc affirmer qu'en solution le complexe quinolobactine fer est bien de formule $[\text{Fe}(\text{Q})_2]^-$.

Ceci semble fortement indiquer que ce ligand agit en tant que tridentate puisque le fer est normalement hexacoordonné.

Pour prouver ce dernier point et pour contrôler que les résultats de complexation sont identiques en phase solide, nous avons tenté d'obtenir des cristaux pour une étude au RX.

- La cristallisation du complexe Q/Fe^{3+} est effectuée par diffusion de l'éther dans la solution méthanolique. Elle donne des cristaux en forme de plaquettes vertes avec un rendement égal à 35%. Ces cristaux ont pu être analysés par diffraction des RX.

- **Analyse élémentaire** : l'analyse élémentaire des cristaux est en faveur d'une stœchiométrie 2/1 Ligand/métal ou le contre ion serait un triéthylammonium : calculée pour $[\text{Fe}(\text{Q})_2, \text{Et}_3\text{NH}]$, $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{FeN}_3\text{O}_8$

Calculée : %C = 56,77 ; %H = 5,11 ; %N = 7,1.

Trouvée : %C = 56,37 ; %H = 5,25 ; %N = 7,12.

- La diffraction des RX permet de confirmer à nouveau la stœchiométrie 2/1 du complexe (**Figure 52**) : un seul atome de fer est inséré entre deux molécules de quinolobactine. Confirmant l'analyse élémentaire, on observe bien la présence d'une molécule de triéthylammonium au voisinage du complexe qui assure la neutralité de l'espèce $[\text{Fe}(\text{Q})_2]^-$, Et_3NH^+ .

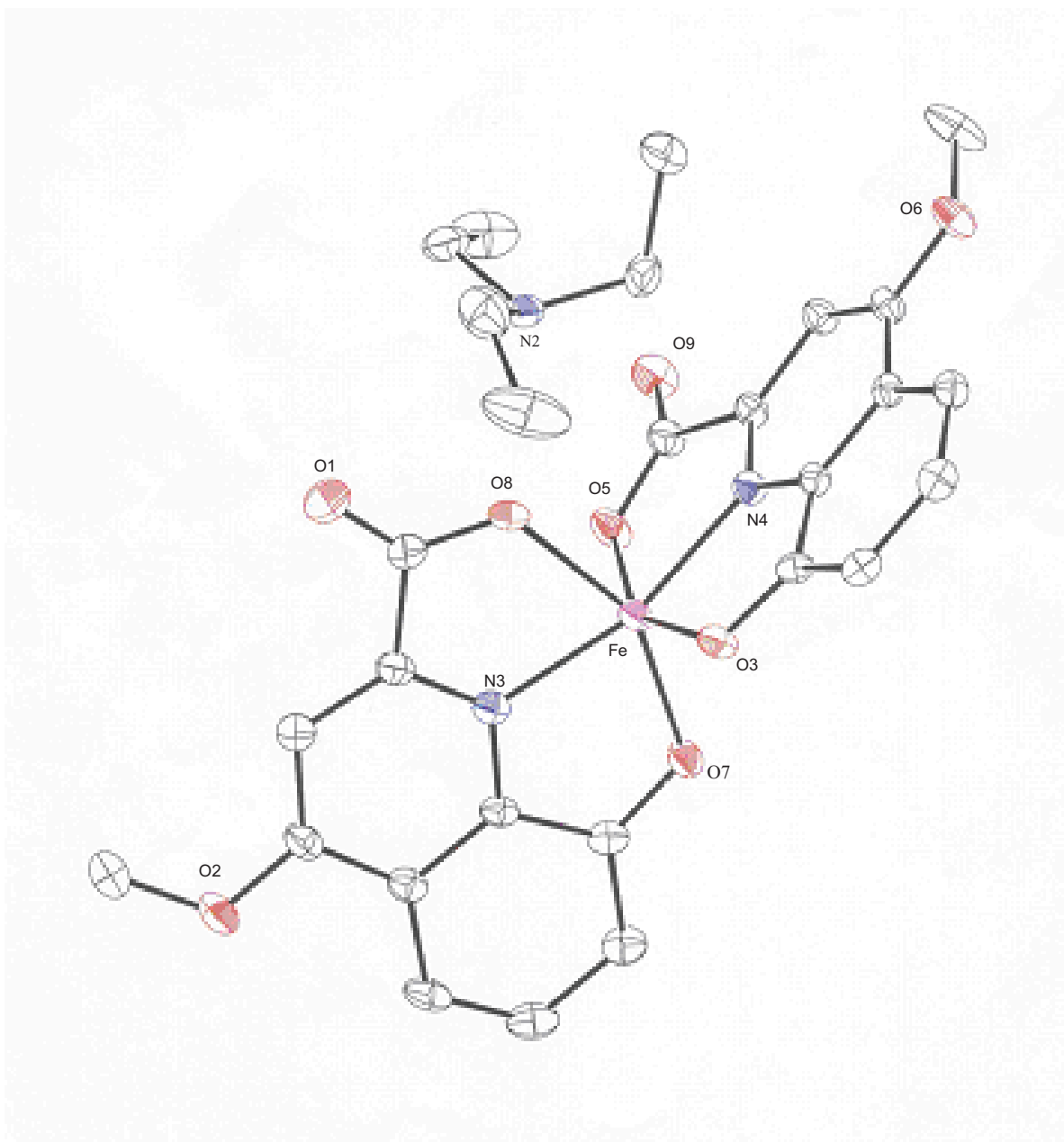


Figure 52 : RX de complexe $[\text{Fe}(\text{Q})_2, \text{Et}_3\text{NH}]$.

A	Fe	B	Angle (°)	A	Fe	B	Angle (°)
O7	Fe	O3	94	O7	Fe	O8	151,58
O7	Fe	N3	77,48	O7	Fe	O5	93,6
O7	Fe	N4	109,5	O3	Fe	N3	115,5
O3	Fe	O5	150,75	O3	Fe	N4	77,8
N3	Fe	N4	165,1	O3	Fe	O8	96,0
N3	Fe	O8	74,2	N3	Fe	O5	93,7
N4	Fe	O8	98,6	O8	Fe	O5	90,5
N4	Fe	O5	73,0				

Tableau 1 : Quelques angles de complexe Q/Fe³⁺.

Fe	atome	Liaisons (Å)
Fe	O7	1,988
Fe	O3	2,011
Fe	N3	2,046
Fe	N4	2,047
Fe	O8	2,061
Fe	O5	2,141

Tableau 2 : Quelques distances de complexe [Fe(Q)₂, Et₃NH].

D'emblée, plusieurs commentaires concernant les valeurs données par les RX pour le complexe Q/Fe³⁺ peuvent être faits. Les valeurs des angles et des distances de complexe Q/Fe³⁺ reportés dans les **Tableaux 1 et 2** montrent que la géométrie de ce complexe correspond à un octaédre très fortement déformé.

Ainsi, les angles « apicaux » O3FeO5 (150,75°), O7FeO8 (151,58°) et N3FeN4 (165,1°) ont des valeurs éloignées de 180° pour un octaèdre parfait.

Les deux distances Fe-N sont quasiment identiques (2,046 Å – 2,047 Å), par contre les distances Fe-O varient de 1,988 à 2,141 Å. Les distances Fe-O3 et Fe-O7 (2,011 et 1,988 Å respectivement) correspondent aux liaisons avec l'atome d'oxygène des phénolates. Cette différence montre déjà une dissymétrie du complexe.

On peut comparer ces distances Fe-N et Fe-O à celle du complexe ferrique avec le ligand hexadentate COX 200 de type tripode tris-hydroxyquinolinate (**Figure 53**).⁷⁷ Pour ce dernier, les liaisons Fe-N sont plus longues (2,184, 2,166 et 2,143 Å) que les liaisons avec l'azote de la Quinolobactine. La coordination avec la Quinolobactine renforce donc la liaison du fer avec l'azote. Cette caractéristique est due à la basicité supérieure de l'azote de la Quinolobactine qui provient de l'effet mésomère donneur du groupe méthoxyle situé en *para*.

Par contre, les liaisons Fe-O des phénolates sont légèrement plus courtes (1,949, 1,955 et 1,959 Å) que celles, Fe-O3 et Fe-O7, du complexe avec la Quinolobactine.

⁷⁷) D. Imbert, P. Baret, D. Gaude, I. Gautier-Luneau, G. Gellon, F. Thomas, G. Sérratrice, J6L. Pierre, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 1091.

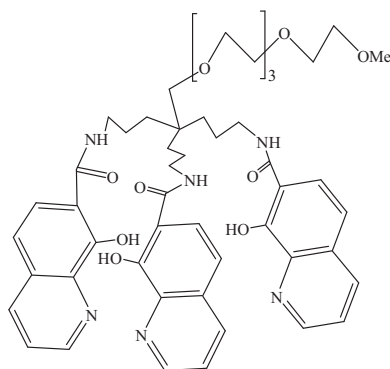


Figure 53 : COX 200.

Comme on l’observait déjà pour les phénolates, les liaisons Fe-O8 et Fe-O5 correspondant aux atomes d’oxygène des groupements carboxyliques sont relativement différentes (2,061 et 2,141 Å respectivement) en raison de la dissymétrie de « l’octaèdre ». Cette différence de longueur de liaison provient en partie de l’établissement d’une liaison hydrogène entre l’hydrogène de l’ion triéthylammonium et l’oxygène O5 du carboxylate (**Tableau 3**).

Atome A	Atome H	Atome B	Liaison A-B	Liaison A-H	Liaison H-B
N2	EtNH ⁺	O5	2.763 Å	0.95 Å	1.83 Å

Tableau 3 : valeur de liaison hydrogène.

Ces distances sont aussi sensiblement plus élevées que celles observées avec les atomes d’oxygène phénoliques. Ceci traduit évidemment une plus faible interaction des carboxylates avec le fer, provenant de l’organisation des trois donneurs sur un même cycle aromatique rigide.

2.5. Synthèse et caractérisation des complexes de la quinolobactine fluorée (QF) avec le gallium et le fer

Nous observons scrupuleusement le même mode opératoire utilisé pour la synthèse des complexes de la Quinolobactine.

2.5.1. Avec le gallium

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés dans le méthanol deutérié pour le ligand seul et pour les deux solutions contenant le ligand et Ga^{3+} dans les proportions 2/0,5 et 2/1. La solution pour laquelle $\text{QF}/\text{Ga}^{3+} = 2/0,5$ montre l'apparition de nouveaux signaux en plus des signaux du ligand et que l'on peut attribuer à un complexe QF/Ga^{3+} . Ces signaux subsistent pour la solution $\text{QF}/\text{Ga}^{3+} ; 2/1$ alors que les signaux du ligand libre ont disparu. Ces résultats suggèrent fortement la présence d'un complexe QF/Ga^{3+} de stœchiométrie 2/1 (**Figure 54**).

D'autre part, on remarque la finesse des signaux de la Quinolobactine fluorée complexée et que les deux ligands ne sont pas distinguables. Ils occupent des positions symétriques peut-être en relation avec la nature labile des complexes du fer +III. Une expérience de RMN à température variable de 20°C jusqu'à -75°C, ne permet pas d'observer le dédoublement des signaux mais seulement un léger élargissement des pics. Dans ces conditions, on peut conclure que les ligands s'échangent rapidement en solution. Cette « symétrie » n'est pas en contradiction avec la structure déterminée par les RX où les deux ligands sont « disymétriques » : en phase solide un des deux ligands est en interaction avec le contre ion Et_3NH^+ tandis que l'autre non. De plus, en solution

les ligands s'échangent rapidement en raison de la labilité des complexes du fer +III.

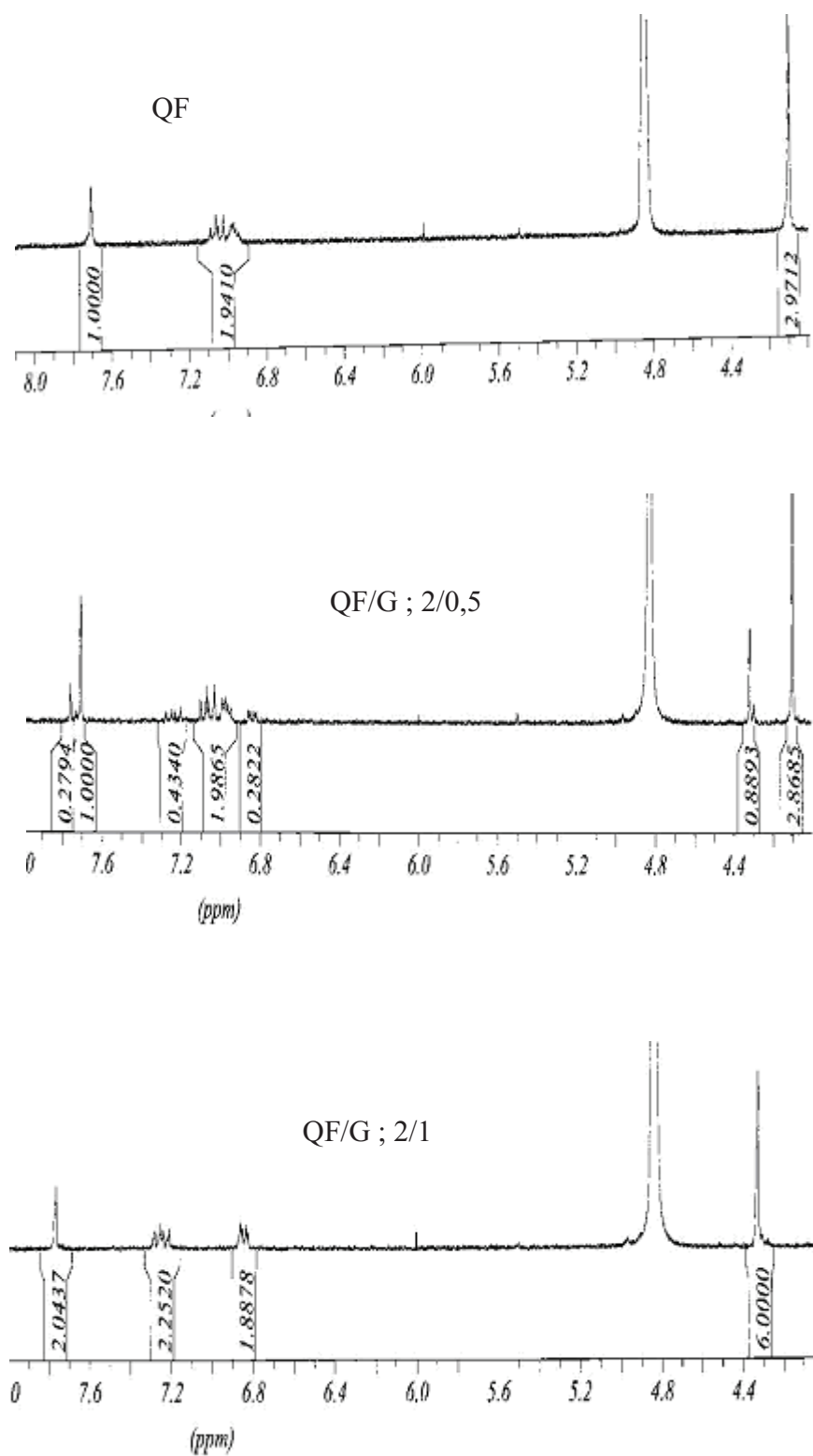


Figure 54 : Spectres RMN ^1H dans CD_3OD pour différents mélange QF/ Ga^{3+} .

Bien que les spectres de la RMN du proton soient déjà très nets, nous avons confirmé cette étude en observant la résonance de ^{19}F . Les spectres RMN ^{19}F confirment les résultats obtenus par la RMN ^1H (voir **Figure 55**).

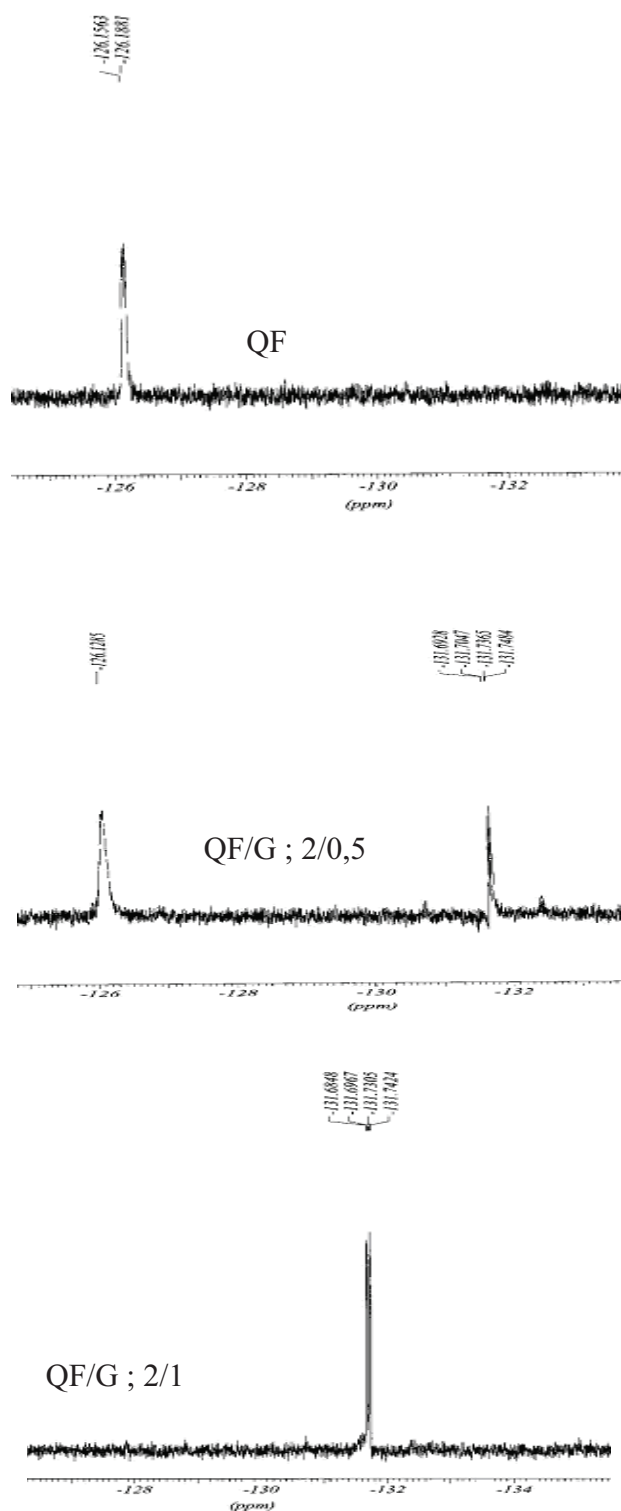


Figure 55 : Spectres RMN ^{19}F dans CD_3OD pour différents mélange QF/ Ga^{3+} .

Le signal du ligand libre présente une multiplicité normale liée aux couplages avec l'hydrogène ^1H . Le signal est centré sur $-126,128$ ppm. L'observation d'une solution pour laquelle le rapport $\text{QF}/\text{Ga}^{3+} = 2/0,5$ montre l'apparition d'un pic très nettement blindé à $-131,736$ ppm attribuable au complexe QF/Ga^{3+} ainsi qu'un léger élargissement de raie du pic de QF libre. Cette dernière caractéristique s'explique par l'instauration d'équilibres acido-basiques provoqués par la complexation du gallium qui déprotone le ligand.

L'observation du spectre de la solution où le rapport $\text{QF}/\text{Ga} = 2/1$ montre clairement la disparition du ligand libre au profit du signal du complexe qui est donc de stœchiométrie 2/1.

L'étude par spectrométrie de masse (ESI) des solutions utilisées pour la RMN montre uniquement la masse du complexe QF/Ga^{3+} correspondant à la stœchiométrie 2/1 ($M_{\text{QF}} = 237,04$ g/mol, $M_{\text{Ga}} = 68,93$ g/mol), quels soient le rapport L/Ga (**Figure 56**).

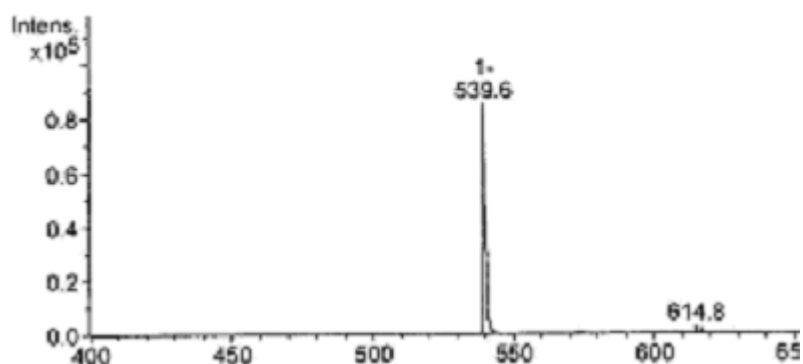


Figure 56 : Le spectre ESI indique la stœchiométrie 2/1 du complexe QF/Ga^{3+} .

2.5.2. Avec le fer

Le paramagnétisme de Fe^{3+} ne nous a pas permis de refaire ces expériences de RMN du proton ni même du fluor. Le « Lock » est instable et les spectres obtenus ne sont pas interprétables. Seul la spectrométrie de masse (ESI) donne la masse exacte du complexe Quinolobactine/ Fe^{3+} correspondant à la stœchiométrie 2/1 ($M_{\text{QF}} = 237,04 \text{ g/mol}$, $M_{\text{Fe}} = 55,93 \text{ g/mol}$), voir **Figure 57**.

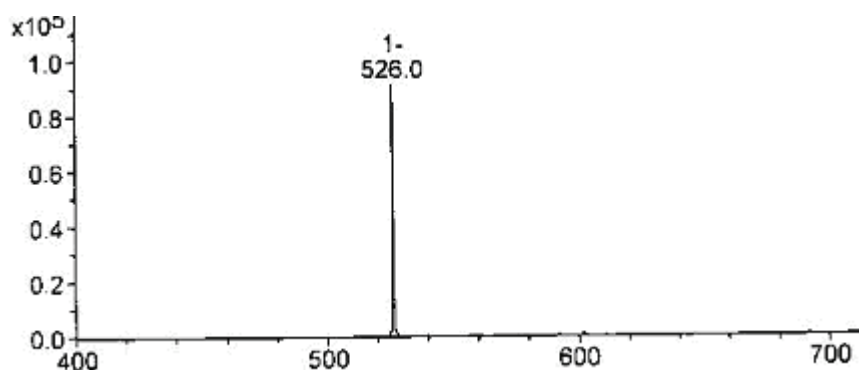


Figure 57 : Spectre de masse ESI du complexe QF/ Fe^{3+} stœchiométrie 2/1.

Ce résultat n'est pas surprenant puisque la présence d'un fluor ne devait pas modifier la structure du complexe. Le seul risque de modification résidait dans la capacité du fluor à affecter les pKa du ligand et donc de modifier les valeurs des constantes d'équilibres de complexation. C'est pourquoi nous avons voulu caractériser par physico-chimie ce système.

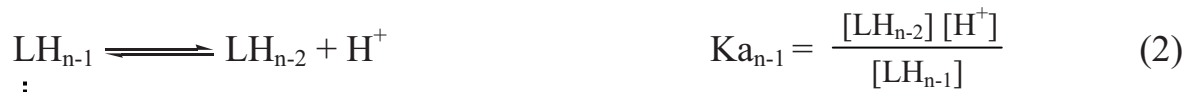
2.6. Etude physico-chimique de la quinolobactine fluorée

Nous allons déterminer les constantes des équilibres de complexation de QF avec Fe^{3+} . Pour cela il faut tenir compte de tous les équilibres possibles y compris ceux qui mettent en jeu le proton. Nous rappelons d'abord les relations nécessaires à la compréhension de ces études physico-chimiques.

2.6.1. Introduction

♦ Définitions

Les constantes de dissociation d'acide sont définies par :

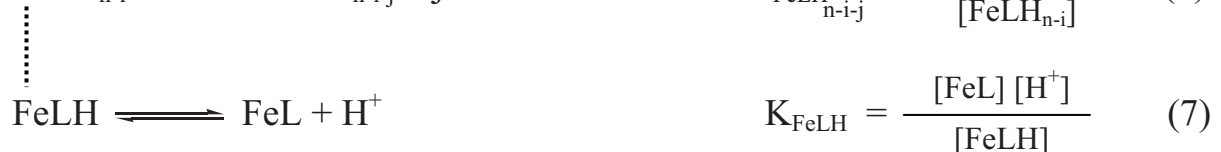


Les charges du ligand et des complexes ont été omises par simplification.

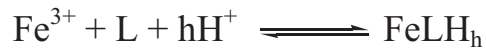
La constante globale de déprotonation : β_{LH_n}

$$\beta_{\text{LH}_n} = \frac{[\text{L}] [\text{H}^+]^n}{[\text{LH}_n]} = \prod_{i=1}^n K_{a_i} \quad (4)$$

Par exemple, dans le cas d'un ligand hexadenté complexant Fe^{3+} , les constantes sont décrites par les formules suivantes :



La constante globale de formation β_{MLH} pour chaque complexe protoné de stoechiométrie 1:1 est :



$$\beta_{11h} = \frac{[\text{FeLH}_h]}{[\text{Fe}^{3+}] [\text{L}] [\text{H}^+]^h}$$

Donc
$$\beta_{110} = \frac{[\text{FeL}]}{[\text{Fe}^{3+}] [\text{L}]}$$

$$\log \beta_{11h} = \sum_{n=0}^h \log K_{\text{FeLH}_n} - \log \beta_{\text{LH}_n}$$

Dans notre cas, le ligand est tridentaté et la stoechiométrie est 1/2 ; L/M. les constantes de complexation sont alors :



$$\text{Et } \beta_{120} = \frac{[\text{FeL}_2]}{[\text{Fe}^{3+}] [\text{L}]^2}$$

Pour comparer la force de complexation des ligands entre eux quelque soient leur denticité, le paramètre le plus adapté n'est plus β mais $p\text{Fe} = -\log [\text{Fe}^{3+}]$ résiduel.

$$\beta_{\text{FeL}} = \frac{[\text{FeL}]_{\text{tot}} \cdot \alpha_{\text{L}}}{[\text{Fe}^{3+}] [\text{L}]_{\text{tot}} \cdot \alpha_{\text{FeL}}} \quad \text{d'où} \quad [\text{Fe}^{3+}] = \frac{[\text{FeL}]_{\text{tot}} \cdot \alpha_{\text{L}}}{\beta_{\text{FeL}} [\text{L}]_{\text{tot}} \cdot \alpha_{\text{FeL}}}$$

Où α : coefficient de Ringbom⁷⁸ qui dépend des constantes de protonation du ligand ou du complexe et des concentrations en H^+ :

Pour le ligand :

$$\alpha_L = \frac{[H^+]}{[\beta_{LH_n}]} + \frac{[H^+]^{n-1}}{[\beta_{LH_{n-1}}]} + \dots + 1$$

Pour le complexe :

$$\alpha_{FeL} = \frac{[H^+]}{K_{FeLH_n} \dots K_{FeLH_{n-1}}} + \frac{[H^+]^{n-1}}{K_{FeLH_{n-1}} \dots K_{FeLH_1}} + \dots + \frac{K_{FeLOH}}{[H^+]} + \dots + 1$$

où $K_{FeLOH} = \frac{[FeLOH].[H^+]}{[FeL]}$ relatif à l'équilibre :



On a alors :

$$[L]_{tot} = [L] + [LH] + [LH_2] + \dots + [LH_n] = [L].\alpha_L$$

$$[FeL]_{tot} = [FeL] + [FeLH] + \dots + [FeLH_n] + [FeLOH] + [FeL(OH)_2] + \dots$$

$$= [FeL].\alpha_{FeL}$$

2.6.2. Méthodes expérimentales

Pour déterminer les constantes d'acidité et de complexation des ligands nous avons utilisé la titration spectrophotométrique UV-Visible.

78) A. Ringbom, *complexation in Analytical Chemistry*, Interscience, New York, 1963.

Le spectrophotomètre est un CARY 50 Probe. Toutes les mesures sont conduites à 20°C avec un dispositif à température variable à effet Peltier. L'acquisition est effectuée avec le logiciel UV (CARY 50 Probe).

Les solutions sont préparées en solution aqueuse avec une force ionique maintenue constante à 0.1M (perchlorate de sodium).

Une solution mère de Fe³⁺ a été préparée pour la titration par la dissolution appropriée de perchlorate de fer (III) hydraté dans une solution tampon dans le HClO₄ et NaClO₄. La concentration de fer a été déterminée par une mesure spectrophotométrique connaissant les caractéristiques spectrales de la bande d'absorption de Fe(ClO₄)₃ dans ce milieu : $\epsilon = 4160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda = 240 \text{ nm}$ (solution 0.1 M HClO₄).⁷⁹ Une solution fraîche de perchlorate de fer (III) hydraté à une concentration $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ a été préparée pour chaque expérience.

Le pH de la solution est mesuré avec un pH-mètre METROHM 713 équipé d'une microélectrode de verre saturée en NaCl. Les données d'absorbance en fonction du pH sont traitées par le logiciel SPECFIT 32, utilisant une méthode de régression des moindres carré non linéaire.^{80, 81}

2.6.3. Résultats et discussions

♦ Les constantes d'acidité

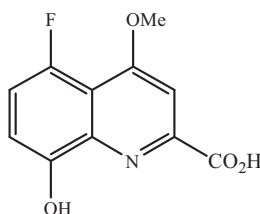


Figure 58 : Quinolobactine Fluorée (QF)

79) R. Bastian, R. Weberling, F. Palilla, *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 459.

80) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbuhler, *Talanta*, **1985**, 32, 95.

81) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbuhler, *Talanta*, **1985**, 32, 257.

Le système de coordination de notre ligand étudié contient 3 sites de protonation : le phénol, l'azote de pyridinique et l'acide carboxylique (**Figure 58**). Les constantes d'acidité de l'azote et du phénol sont déterminées par spectrophotométrie UV-Visible.

Le pKa de l'acide carboxylique est inférieur à 2 et n'a pas été déterminé.

Titration spectrophotométrique

La titration a été réalisée dans un mélange de H₂O : DMSO ; 90 : 10 (% v : v) pour des raisons de solubilité et dans un domaine de pH de 5,04 à 11,02. Le premier domaine de 5,04 à 9,07 permet de déterminer le pKa₁ correspondant à l'azote pyridinique. Le deuxième domaine de 9 à 11 correspond au pKa₂ du groupe OH phénolique.

Mesures de pH

L'électrode est calibrée selon la méthode classique de Martell⁸² par titration d'une solution de HClO₄ 0.01 M par une solution de NaOH 0.02 M (force ionique NaClO₄ 0.1 M).

Les données sont analysées par le programme GLEE⁸³ en considérant le produit ionique de l'eau $pK_{H_2O} = 14.3$ ⁸⁴ dans le mélange H₂O : DMSO 90 :10 (% v : v).

82) A. E. Martell, R. J. Motekaitis, ED. *VCH Weinheim*, **1988**, 1, 7.

83) P. Gans, B. O'Sullivan, *Talanta*, **2000**, 51, 33.

84) J-C. Hallé, R. Gaboriand, R. Schaal, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1969**, 6, 1851.

- Détermination de pKa1 dans la gamme pH = 5,04 - 9,07

Dans ce domaine de pH, l'évolution du spectre UV-visible (**Figure 59**) montre la présence d'un point isosbestique à 348 nm et un déplacement du λ_{\max} de 386 nm vers 370 nm.

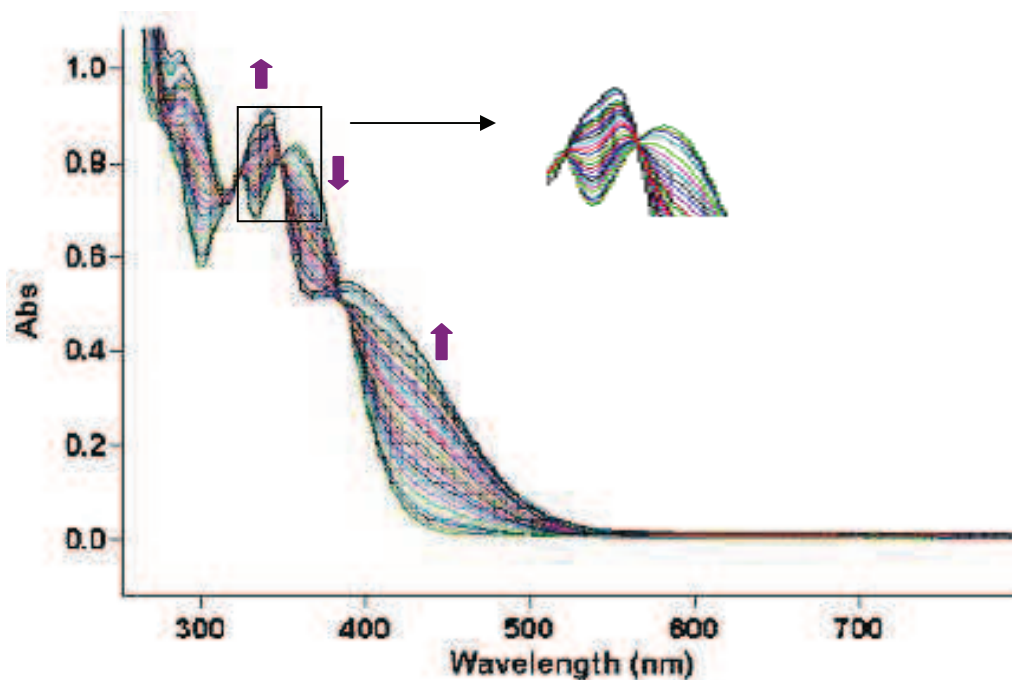


Figure 59 : Spectres UV visible de la quinolobactine fluorée en fonction du pH, [QF]= $2.1 \cdot 10^{-4}$ M (solution DMSO:H₂O ; 10:90 (% v : v) ; pH compris entre 5,04 et 9,07 ; T = 20°C ; I = 0,1M (NaClO₄).

Le traitement de ces données par le logiciel SPECFIT 32 entre 500 nm et 250 nm permet d'obtenir la valeur du pKa de l'azote pyridinique.



- Détermination de pKa₂ dans la gamme pH = 10,12 - 11,02

Dans cette zone de pH on observe un déplacement du λ_{\max} de 420 nm vers 400 nm (Figure 60).

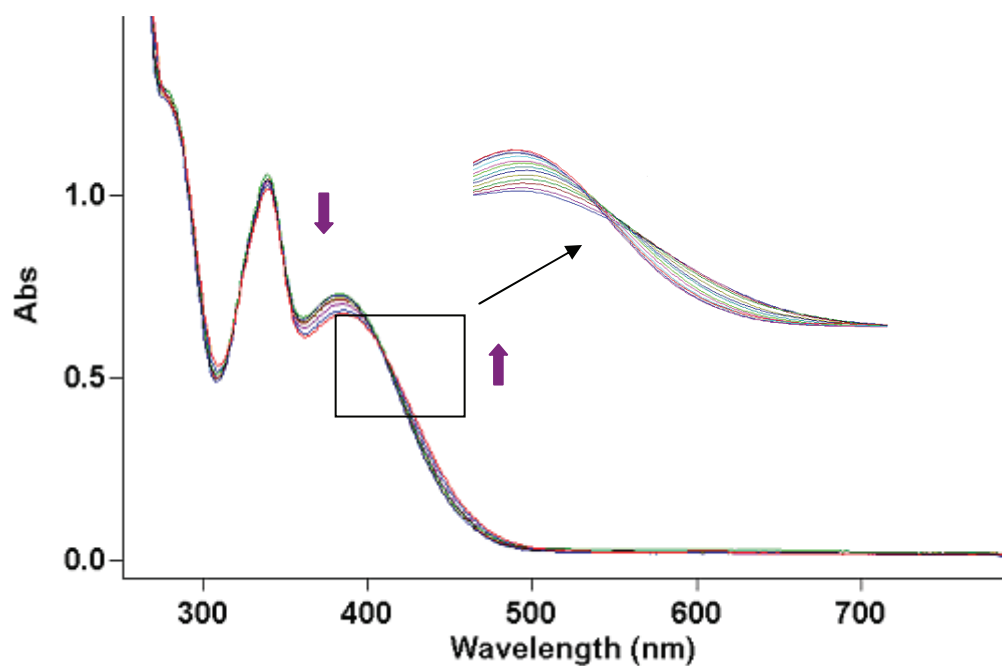


Figure 60 : Spectres UV visible de la quinolobactine fluorée en fonction du pH, [QF]= $2.1 \cdot 10^{-4}$ M (solution DMSO:H₂O ; 10:90 (% v : v) ; pH compris entre 10,12 et 11,02 ; T = 20°C ; I = 0,1M (NaClO₄).

Le traitement des données permet de calculer le deuxième pKa₂ correspondant au phénol :



Les valeurs des pKa déterminée pour la quinolobactine (Q) dans notre laboratoire¹⁶ avaient donné 5,50 pour l'azote de pyridine et 10,30 pour le phénol, voir **Tableau 4**.

	pKa1 (azote)	pKa2 (phénol)
Spectrophotométrie Quinolobactine	5,50	10,30
Spectrophotométrie Quinolobactine Fluorée	7,04	9,98

Tableau 4 : Les valeurs de pKa correspondant à QF et à Q

La substitution par le fluor conduit à une augmentation importante du pKa de l'azote et une faible variation du pKa du phénol.

♦ **Les constantes de complexation du Fer**

Pour déterminer les constantes de complexation du fer on a utilisé la titration spectrophotométrique dans un intervalle de pH compris entre 2,81 – 7,62 (**Figure 62**).

16) A. du Moulinet d'Hardemare, G. Serratrice, J-L. Pierre, *BioMetals*, **2004**, 17, 691.

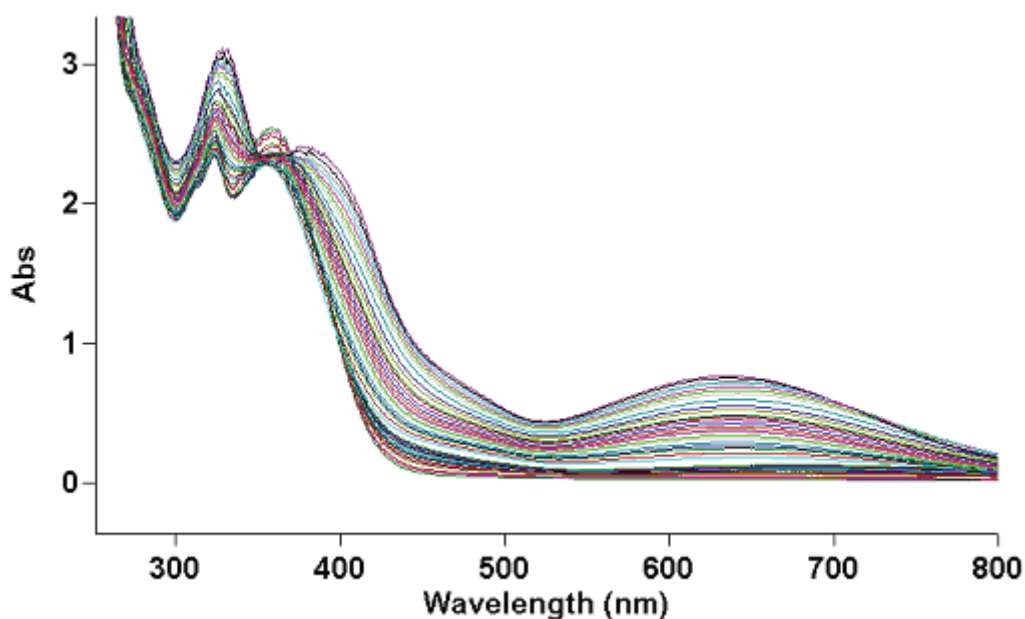


Figure 62 : Spectres UV visible du complexe quinolobactine fluorée/Fe en fonction du pH ; (solution DMSO:H₂O ; 10:90 (% v : v) ; [QF]= $4,2 \cdot 10^{-4}$ M ; [Fe³⁺] = $1,99 \cdot 10^{-4}$ M ; pH compris entre 2,81 et 7,62 ; T = 20°C ; I = 0,1M (NaClO₄).

Deux domaines d'évolution du spectre en fonction du pH sont observés :

➤ **pH = 2,81 – 4,28**

Le spectre ne présente pas de variation dans cette zone de pH

➤ **pH = 4,41 – 7,62**

Dans cette zone on observe l'apparition d'une bande de transfert de charge à 640 nm (**Figure 63**) qui caractérise la complexation du fer.

Au-delà de pH 7,62 et jusqu'à pH ~ 9 le spectre ne subit pas de modification, ce qui traduit la stabilité du complexe. Ensuite à pH > 9 on observe

une décroissance de l'absorbance à toutes les longueurs d'onde, correspondant à la décomplexation.

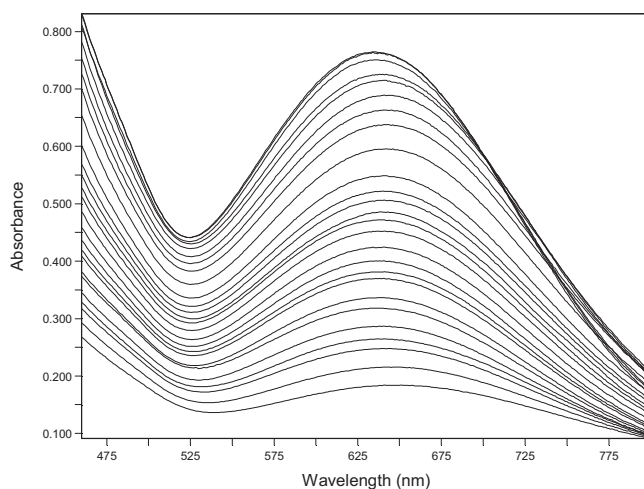


Figure 63 : Spectres UV visible du complexe quinolobactine fluorée/Fer en fonction du pH ; (solution DMSO:H₂O ; 10:90 (% v : v) ; [QF]=4,2 10⁻⁴ M ; [Fe³⁺] = 1,99 10⁻⁴ M ; pH compris entre 4,41 et 7,62 ; T = 20°C ; I = 0,1M (NaClO₄).

Les données sont traitées par le logiciel SPECFIT 32 (entre 460nm et 800nm). Le meilleur ajustement est obtenu en prenant en compte l'espèce [FeL₂] conduisant au spectre calculé (**Figure 64**).

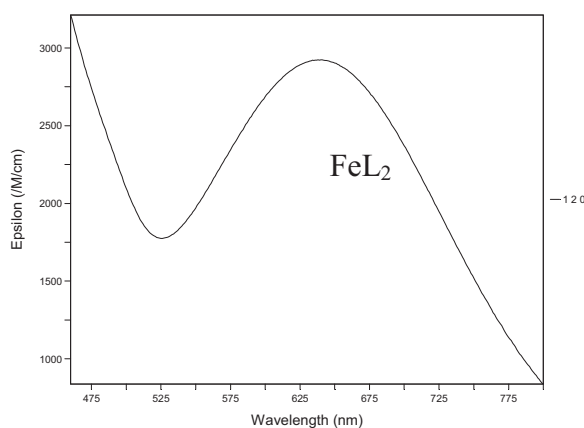


Figure 64 : Spectre calculé de l'espèce FeL₂ du complexe Fe-Quinolobactine fluorée.

La valeur de la constante de complexation suivante a été obtenue :

$\log \beta_{120} = 26,2 \pm 0,2$ avec $\varepsilon = 2925 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 640 \text{ nm}$.

Compte tenu de la valeur de la constante de complexation le Diagramme de répartition est le suivant :

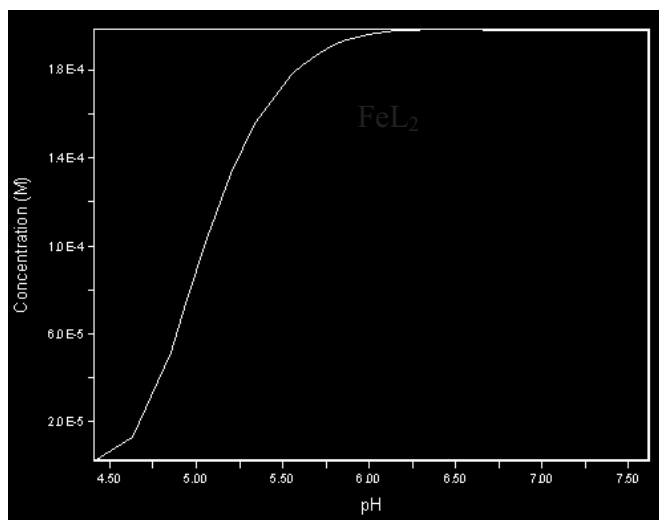


Figure 65 : Diagramme de répartition : (solution DMSO:H₂O ; 10:90 (% v : v) ; [QF]=4,2 10⁻⁴ M ; [Fe³⁺] = 1,99 10⁻⁴ M ; pH compris entre 4,41 et 7,62.

Le pFe a été calculé à pH = 7,4 et pour :

$$[\text{Fe}^{3+}] = \frac{[\text{FeL}]_{\text{tot}} \cdot \alpha_{\text{L}}}{\beta_{\text{FeL}} [\text{L}]_{\text{tot}} \cdot \alpha_{\text{FeL}}}$$

avec $[\text{L}] = [\text{L}]_{\text{tot}} - 2[\text{FeL}_2]_{\text{tot}}$

on obtient pFe = 16,5.

Cette valeur est sensiblement plus faible que celle de la Quinolobactine, 18,2. L'introduction d'un atome de fluor conduit à une diminution de la capacité de complexation du ligand.

CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE D'ENTEROBACTINE ET DE SES ANALOGUES

Dans ce chapitre nous présentons les résultats qui concernent la synthèse de conjugués de l'Entérobactine avec des dérivés du bore, du phosphore et d'un antibiotique modifié, la cyprofloxacine borée. L'objectif de ce travail est de préparer des inhibiteurs potentiels du transport du fer chez les bactéries qui assimilent la ferri-Entérobactine, pour essayer de contrôler la prolifération bactérienne en privant les micro-organismes de fer. Le couplage avec un antibiotique devant illustrer un nouvel exemple de la stratégie dite du « cheval de Troie » présentée dans l'introduction pour développer de nouveaux antibiotiques.

Dans une approche « biomimétique », nous avons réalisé la synthèse d'un analogue synthétique de l'Entérobactine qui comporte des unités chélatrices dérivant de la 8-hydroxyquinoléine en raison des excellentes capacités de complexation de ce système de chélation.

3.1 Synthèse de l'Entérobactine naturelle

Pour aborder ce travail il faut obtenir de l'Entérobactine. Ce composé n'est pas commercial et son extraction de source naturelle est difficile et ne délivre que de très faibles quantités. Nous avons donc abordé sa synthèse totale.

Une analyse rétrosynthétique simple montre que la difficulté principale vient de la formation de la trilactone macrocyclique de la sérine, l'unité chélatante, l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque, étant de source commerciale.

Nous nous sommes fortement inspirés de réactions décrites dans la littérature^{4, 1}, en suivant le schéma de synthèse présenté ci-après (**Figure 66**). L'étape clé restant celle de la transformation du *N*-trityl-*L*-sérinate de méthyle en trilactone de tris(*N*-trityl-*L*-sérine).

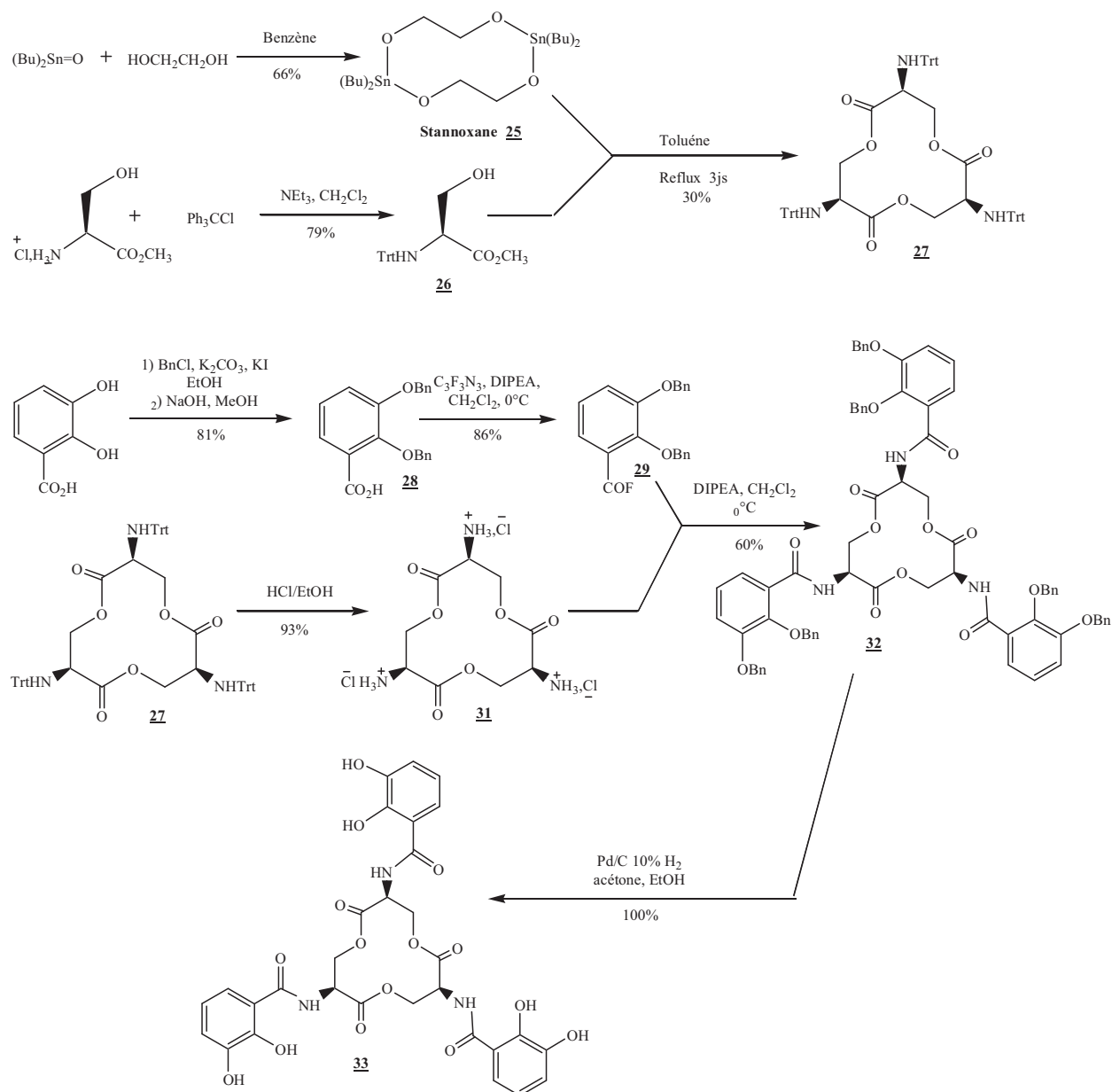


Figure 66 : Synthèse de l'Entérobactine.

4) E R. Marinez, E K. Salmassian, T T. Lau, C G. Gutierrez, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3548.

1) M. Meyer, J. R. Telford, S. M. Cohen, D. J. White, J. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10093.

3.1.1 Synthèse de la trilactone de la sérine

Le produit de départ est la sérine sous forme optiquement pure. En effet, la chiralité de la sérine impose la chiralité du complexe naturel qui est alors obligatoirement un complexe de type delta.

Du point de vue chimique la première étape consiste à protéger l'amine de la sérine par un groupe trityle, afin de permettre l'étape de lactonisation sans interférence de l'azote. Cette réaction de type SN_1 ne présente aucune difficulté particulière. Le rendement est tout à fait satisfaisant et supérieur à celui décrit dans la littérature (79% contre 77%). Nous avons aussi abordé l'étape de macrolactonisation de la sérine *N*-protégée. C'est l'étape qui *a priori* présente du point de vue chimique la plus grande difficulté. En effet, la formation de grands cycles est entropiquement défavorisée. Les solutions qui permettent d'éviter la réaction d'obligomérisation concurrente de la cyclisation sont classiquement la technique de haute dilution et celle qui met en jeu un effet de gabarit (template) (improprement désigné sous le nom d'effet de matrice). La première est contraignante du point de vue de la mise en œuvre (volumes de solvant élevés, addition très lente des réactifs, rendement souvent faible), la deuxième présente souvent pour inconvénients la difficulté de trouver le gabarit adéquat (très souvent un cation métallique) et de pouvoir l'éliminer avec facilité en fin de la réaction.

Ici, une solution originale est apportée. Martinez et Col. emploient un diester de dibutylétain à l'origine de la préorganisation des réactifs (effet entropique).¹ Trois molécules de *L* serinate ester **26**, déjà protégées par le trityle, s'insèrent dans le stannoxane qui active l'attaque électrophile. Ensuite la

1) M. Meyer, J. R. Telford, S. M. Cohen, D. J. White, J. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10093.

condensation et la préorganisation donnent en fin de parcours la trilactone **29**⁸⁵,
⁸⁶ avec un rendement égal à 30%, voir **Figure 67**.

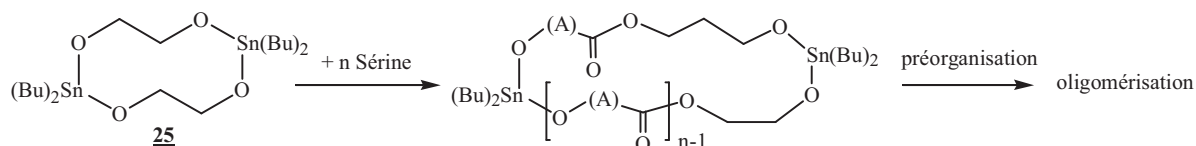


Figure 67 : Mécanisme de la macrolactonisation.

Deux catalyseurs **25**¹ et **25'**⁸⁷ ont été préparés pour réaliser la lactonisation (**Figure 68**).

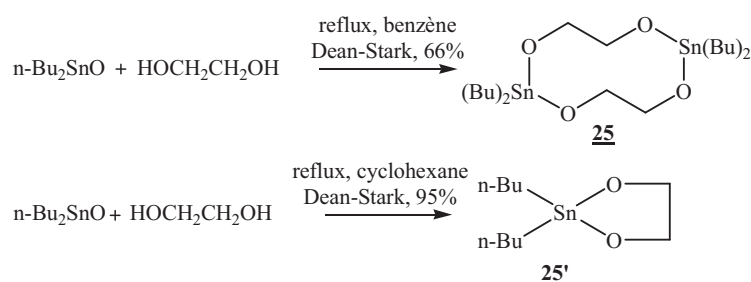


Figure 68 : synthèse des catalyseurs.

Dans la littérature, les auteurs utilisent 0,1 équivalent de catalyseur stannylé, cependant entre nos mains, cette quantité s'est révélée insuffisante et il a fallu employer 0,2 équivalent de **25** ou du **25'**. C'est le 2,2-dibutyl-1,3,2-dioxastannoxane **25'** qui donne le meilleur rendement de 75%, alors que le stannoxane **25** donne seulement 30% de rendement. Nous avons utilisé du toluène à la place de benzène initialement préconisé sans observer un moins bon rendement. Nous avons aussi remarqué la formation d'un solide qui précipite au

85) A. Shanzer, N. Mayer-Shochet, F Frolow, D. Rabinovich, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 4662.

86) H. R. Kricheldorf, S-R Lee, N. Schittenhelm., *Mocromol. Chem. phys.*, **1998**, 199., 273

1) M. Meyer, J. R. Telford, S. M. Cohen, D. J. White, J. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10093.

87) H. Deleuze, B. Maillard, *J. OrganoMet. Chem.*, **1995**, 90, C14-C17.

bout de trois jours de reflux, solide que nous avons identifié à de la trilactone de la sérine par spectrométrie de masse avec la technique l'électrospray (ESI). Cette observation semble expliquer la formation préférentielle de la trilactone.

La suite de la synthèse est l'étape de détritylation de la macrolactone. Pour ce faire, nous avons préparé une solution d'acide chlorhydrique anhydre par réaction du chlorure d'acétyle dans l'éthanol absolu et mis à réagir l'amine protégée. En suivant les conditions opératoires publiées (3 équivalents d'HCl anhydre, au reflux d'éthanol), on n'observe pas de déprotection totale. Nous avons donc augmenté très sensiblement la quantité d'HCl (12 équivalents, reflux) et obtenu la déprotection quantitativement. L'aspect remarquable de cette réaction est que l'on n'observe pas de réaction de transesterification pourtant attendue dans des conditions d'aussi forte acidité, à chaud et en présence d'éthanol pris comme solvant.

3.1.2 Protection et fluoruration de l'acide 1,2-dihydroxybenzoïque

Disposant de la trilactone déprotégée, il restait à coupler l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque. Pour réaliser cette étape, les travaux de la littérature montrent toujours une étape préalable de protection des hydroxyles avant l'étape d'activation de l'acide carboxylique sous forme de chlorure d'acide. Le groupe protecteur est le groupe benzyle introduit simplement par SN entre un catécolate et le chlorure de benzyle.⁸⁸ La réaction de saponification est ensuite réalisée pour libérer l'acide avec un rendement de 81%. Entre nos mains, les essais des chlorurations d'acide **28** avec SOCl₂ ou avec le chlorure d'oxalyle se sont révélés décevants, une dégradation est observée sans que l'on puisse identifier les produits formés. Nous nous sommes alors tournés vers la

⁸⁸ W. H. Rastetter, T. J. Erickson, M. C. Venuti, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 3579.

fluoruration avec le DAST ou le tri-fluorure de cyanuryle. En effet, les fluorures d'acides sont moins électrophiles que les chlorures et donc plus stables. Le fluorure d'acide **29** est donc obtenu sans difficulté et il peut être purifié par chromatographie, ce qui atteste de sa stabilité. On peut conserver **29** au moins un mois et demi sans observer aucune dégradation ni hydrolyse comme le montre les spectres RMN du proton et du fluor (δ : 21.27 (C-F)).

L'étape de fluoruration est tirée d'une procédure similaire décrite dans la littérature.^{89, 90} Le mécanisme général de la réaction de fluoruration avec le trifluorure de cyanuryle est représenté ci –après **Figure 69**.

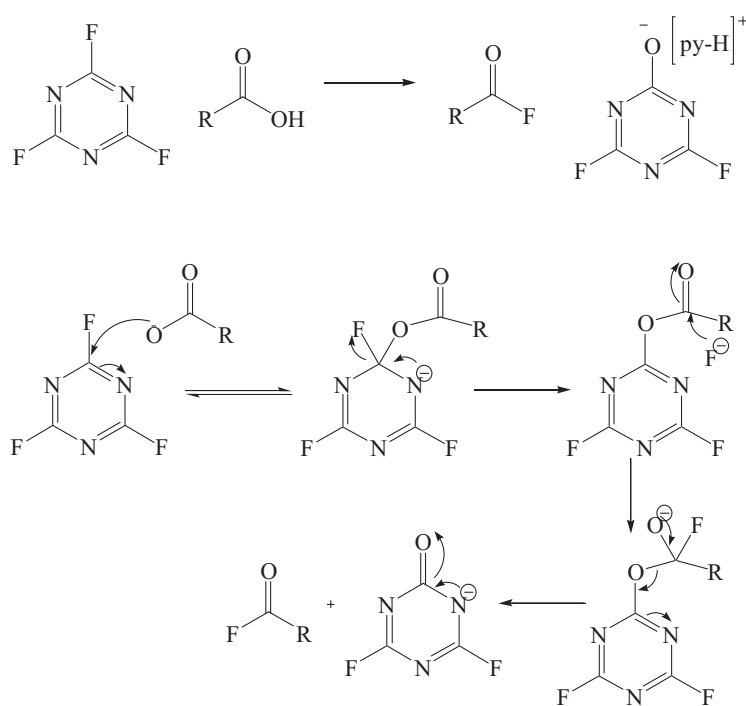


Figure 69 : Mécanisme de formation du fluorure d'acide.

89) S. GroB, S. Laabs, A. Scherrmann, A. Sudau, N. Zhang, U. Nubbemeyer, *J. Prakt. Chem.*, **2000**, 7, 342.

90) M. E. Bluhm, S. S. Kim, E. A. Dertz, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2436.

3.1.3 Couplage trilactone-fluorure d'acide, puis débenzylation

Le fluorure d'acide est ensuite couplé à la trilactone de la sérine dans le dichlorométhane sec en présence de DIPEA (diisopropyle éthyle amine) comme accepteur de proton. Le rendement de couplage est de 60%. Cette réaction conduit à l'Entérobactine hexa-*O*-benzylée qu'il faut finalement déprotéger pour régénérer les catéchols. De façon très classique, l'hydrogénolyse en présence de PdC⁹¹ fournit une déprotection quantitative.

3.1.4 Synthèse directe de l'Entérobactine

Nous avons tenté également la synthèse directe de l'Entérobactine à partir de la formation de fluorure d'acide **30** sans le passage par la protection de groupement phénols, cette méthode devant nous permettre de gagner du temps et du produit. Toujours à l'aide de fluorure de cyanuryle, nous avons obtenu le fluorure d'acide **30** avec un rendement de 40%. Ce fluorure est stable vis à vis d'une réaction d'hydrolyse (dans l'eau froide) et stable en présence des hydroxyles du catéchol. Ce résultat encourageant nous a permis d'aborder la réaction de couplage suivante. Nous faisons réagir ce fluorure d'acide **30** avec la trilactone déprotégé **31** en présence d'une base (DIPEA). Cependant, nous n'obtenons pas le couplage avec **31**, et les réactifs de départ sont dégradés. Ces résultats s'expliquent probablement par une réaction du fluorure d'acide **30** sur lui même par l'activation des phénols en phénates par le DIPEA (voir **Figure 70**).

91) R J. A. Ramirez, L. Karamanukyan, S. Ortiz, C. G. Gutierrez, *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38, 749.

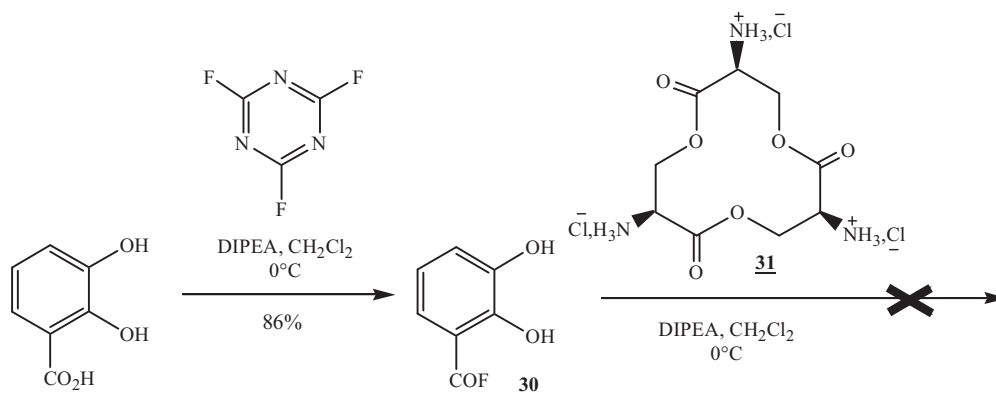


Figure 70 : Tentative de synthèse « directe » de l'Entérobactine.

3.1.5 Conjugaison de l'Entérobactine avec des dérivés du bore et du phosphore : préparation d'inhibiteurs potentiels du transport du fer

L'Entérobactine est sécrétée par des bactéries pathogènes responsables d'infections variées. Par exemple, les entérobactéries *Escherichia coli* et surtout *Salmonella typhimurium* provoquent des intoxications parfois très graves et *Klebsierlla pneumoniae* est responsable de maladies respiratoires. La lutte contre ces micro-organismes reste d'actualité en ces temps où les résistances aux antibiotiques émergent. Il est raisonnable de penser que la formation de complexes (au sens large du terme) d'Entérobactine avec d'autres ions que Fe^{3+} puisse conduire à des antimétabolites qui peuvent interférer avec le processus vital d'assimilation du fer des bactéries et donc d'inhiber leur croissance.

Des travaux ont déjà été effectués en ce sens par Rogers et *al.*⁹² avec des ions métalliques variés : Sc^{3+} , La^{3+} , Y^{3+} , Ti^{4+} , Zr^{4+} , Hf^{4+} , VO^{2+} , Nb^{5+} , Ta^{5+} , Mo^{5+} , W^{6+} , Mn^{2+} , Ru^{3+} , Co^{2+} , Rh^{3+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} et In^{3+} . Seul le complexe Sc^{3+} /Entérobactine présente *in vitro* et *in vivo*, chez la souris, une activité inhibitrice vis-à-vis de la croissance de *Klebsierlla pneumoniae*. Depuis

92) H. J. Rogers, C. Synge, V. E. Woods, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1980, 63.

cette date, l'utilisation chez l'homme de cette molécule n'a pas été attestée. Sans doute, la concentration μ molaire élevée nécessaire à l'activité chez la souris ainsi que la toxicité des sels de lanthanide chez l'homme ont découragé l'expérimentation. C'est dans ce contexte que nous avons décidé de préparer des antimétabolites qui ne contiennent pas d'ions métalliques plus souvent toxiques. L'examen de la nature chimique de l'Entérobactine montre évidemment que le site de liaison préférentiel reste les oxygènes des catéchols. Puisque les acides boroniques sont susceptibles d'engager jusqu'à trois liaisons avec les phénols (ou les catéchols). Notre choix s'est donc naturellement orienté vers des conjugués Entérobactine-acide boronique.^{93, 94, 95} Ce choix était par ailleurs conforté par l'utilisation de support chromatographique⁹⁶ fonctionnalisé par des acides boroniques pour isoler des sidérophores et plus récemment par l'isolement de sidérophores contenant de l'acide borique à l'état naturel.⁹⁷ On pouvait alors espérer une stabilité suffisante pour nos conjugués.

De façon parallèle, nous avons examiné la possibilité d'utiliser simplement un atome pour préparer les antimétabolites et le phosphore nous est apparu comme le candidat le plus judicieux : l'Entérobactine pouvait réagir dans les conditions similaires qui conduisent aux anions TRISPHAT structurellement très proches (**Figure 71**).

93) J. Lacour, A. Londez, C. Goujon-Ginglinger, V. Buss, G. Bernardinelli, *Organic Letters*, **2000**, 2, 4185.

94) F. Favarger, C. Goujon-Ginglinger, D. Monchaud, J. Lacour, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 8521.

95) W. Yeng, X. Gao, G. Spingsteen, B. Wang, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 6339.

96) H. H. Barnes, C. A. Ishimaru, *BioMetals*, **1999**, 12, 83.

97) W. R. Harris, S. A. Amin, F. C. Kupper, D. H. Green, C. J. Carrano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, sous presse.

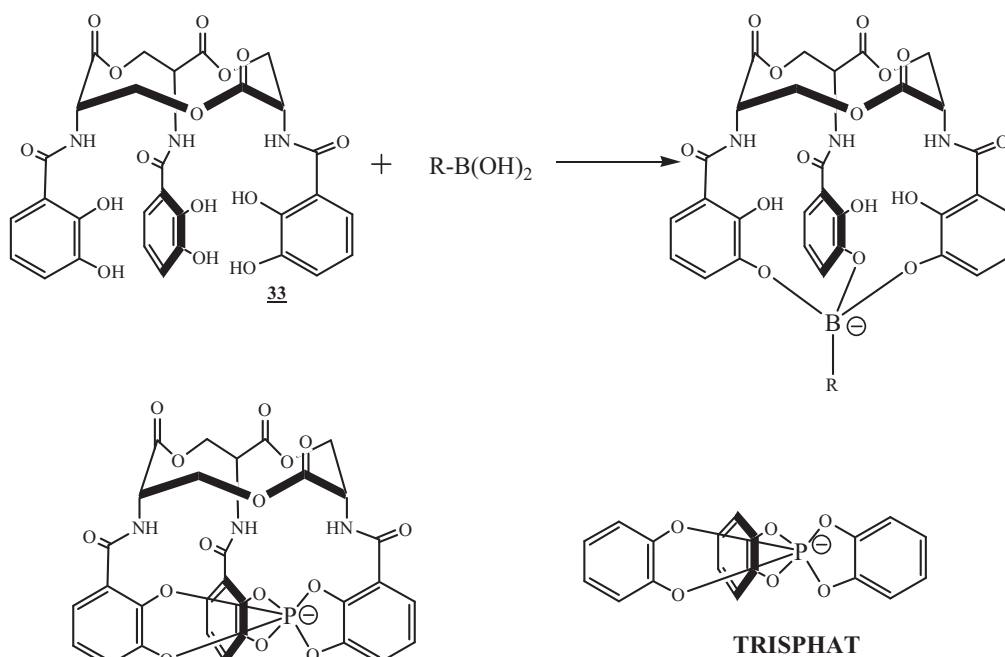


Figure 71 : Conjugués envisagés.

Une fois l'Entérobactine préparée, plusieurs essais de couplage sont réalisés avec les dérivés B et P :

- **Antimétabolites dérivant du phosphore**

Les travaux de l'équipe de Lacour⁹⁴ font référence sur la synthèse et l'utilisation des anions chiraux dérivant des catéchols et de l'acide phosphorique. Nous avons donc transposé les conditions de synthèse des TRISPHAS à l'Entérobactine. En partant de PCl_5 , de l'Entérobactine avec une amine pour capter l'acidité relarguée au cours du processus de phosphatation, tous les essais ont abouti à un mélange de produits qui contient l'espèce attendue mais en faible quantité comme le montre l'analyse du brut de réaction (analyse spectre de masse ESI, **Figure 72**).

94) F. Favarger, C. Goujon-Ginglinger, D. Monchaud, J. Lacour, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 8521.

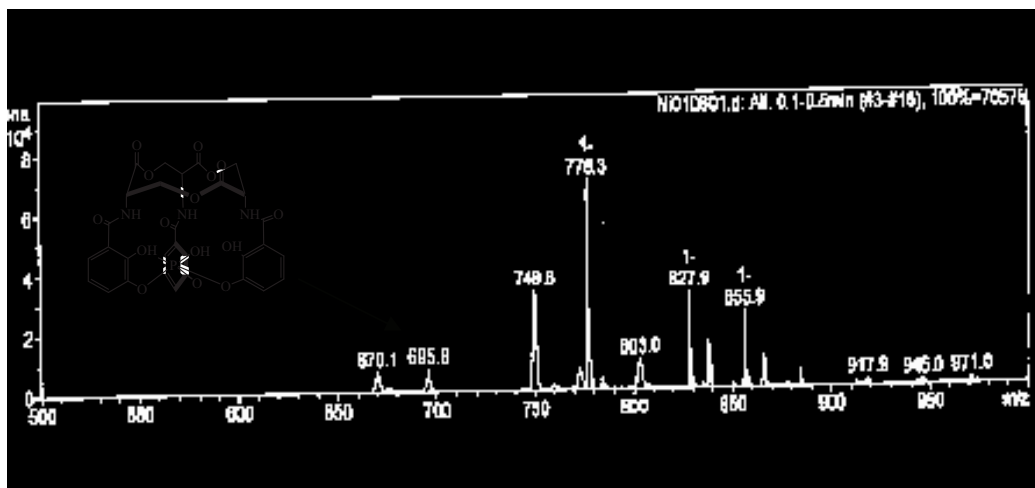


Figure 72 : Spectre de masse ESI du couplage entre Entérobactine et PCL₅

La purification par précipitation (avec ou sans cation lipophile R₄N⁺) ou par chromatographie en phase liquide s'est révélée impossible et c'est pourquoi nous avons tenté d'utiliser POCl₃ dans l'espoir d'aboutir à une espèce différente des anions TRISPHAT (**Figure 73, a**) où le phosphore est pentavalent avec un groupe P=O cette fois. Les résultats sont à nouveau décevants, le produit attendu n'est pas observé. Une dernière tentative est effectuée avec (Me₂N)₃P comme donneur de phosphore trivalent sans plus de succès.

Nous avons alors pensé utiliser POCl₃ mais avec une Entérobactine simplifiée ne comportant que trois phénols à la place des trois catéchols dans l'espoir que la formation de l'*ortho*-phosphore pentavalent serait plus aisée (**Figure 73, b**).

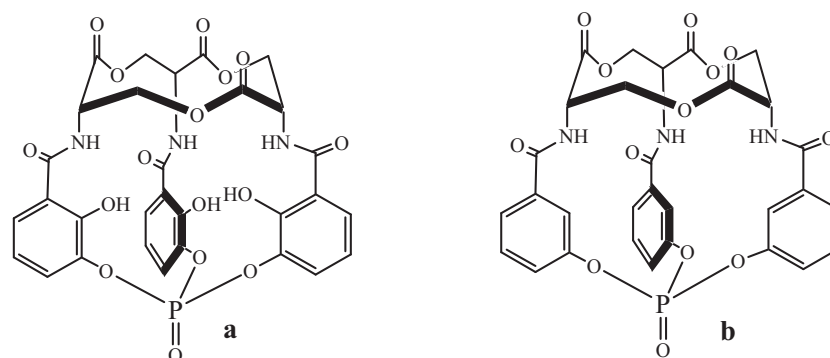


Figure 73 : Tentative de formation de l'*ortho*-phosphore pentavalent.

Ceci nous a conduit à préparer l'analogue phénolique de l'Entérobactine que nous avons nommé Salibactine car elle dérive de l'acide salicylique.

3.2 Synthèse de la Salibactine

Cette synthèse est connue⁹⁸ et nous avons simplement changé l'étape d'activation de l'acide **44** en utilisant le trifluorure de cyanurile (**Figure 74**).

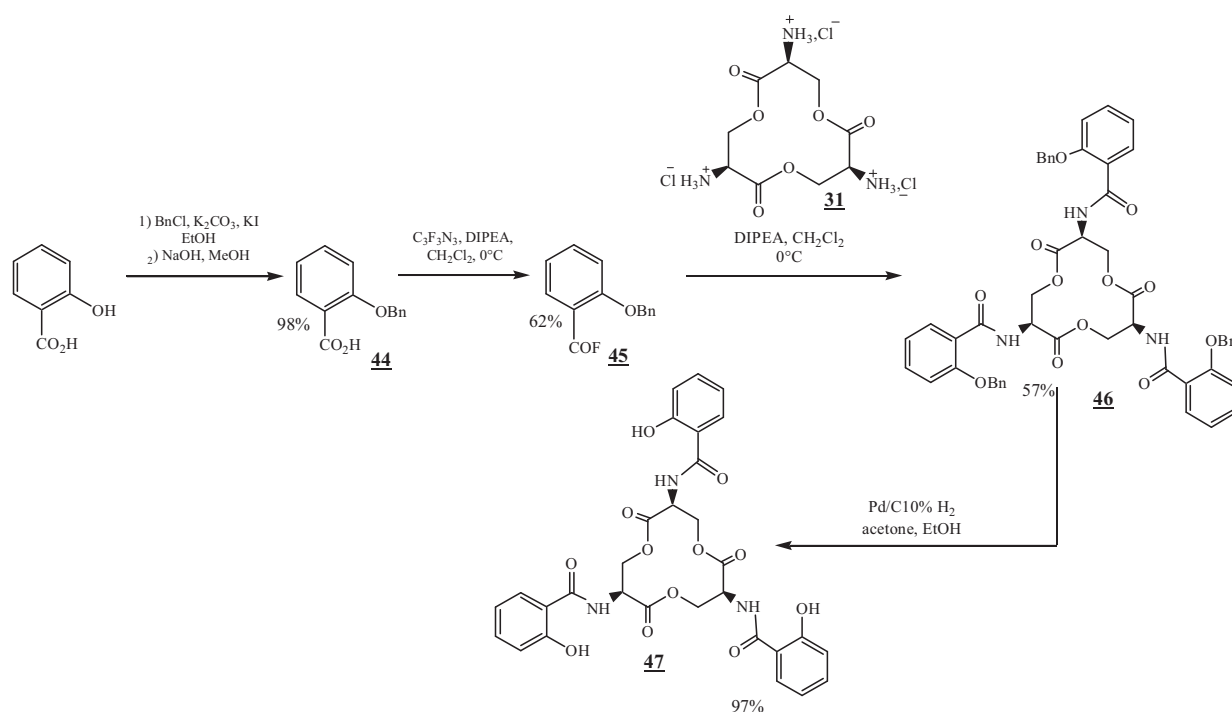


Figure 74 : Synthèse de la Salibactine.

Cette synthèse est très proche de celle de l'Entérobactine, le rendement global est de 33% contre 42% pour l'Entérobactine.

98) R. J.Abergel, J. A. Wamer, D. K. Shuh, K. N. Raymond., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128., 8920.

3.2.1 Essais des couplages Salibactine-POCl₃

En faisant réagir la Salibactine avec POCl₃ les résultats obtenus sont surprenants. L'analyse par RMN du proton du brut réactionnel est très ardue en raison des couplages supplémentaires apportés par le phosphore. L'analyse par RMN du phosphore est plus simple avec trois pics majoritaires à $\delta = 4,25$ ppm qui est attribué à POCl₃ et deux pics à $-1,73$ ppm et $7,33$ ppm dont les proportions varient au cours de temps. Le pic à $-1,73$ ppm est majoritaire à $t = 12$ heures de formation dans le toluène puis diminue au profit du pic situé à $7,33$ ppm qui devient majoritaire au bout de 4 jours. L'analyse par spectrométrie de masse des bruts réactionnels qui correspondent à ces différentes étapes (**Figure 75**) permet d'assimiler ces espèces aux structures indiquées de la **Figure 76**. Les profils isotopiques théoriques et expérimentaux (signature de ³⁵Cl et ³⁷Cl) ne laissent pas d'ambiguïté quant à la nature de ces structures dont le mécanisme de la formation reste à étudier.

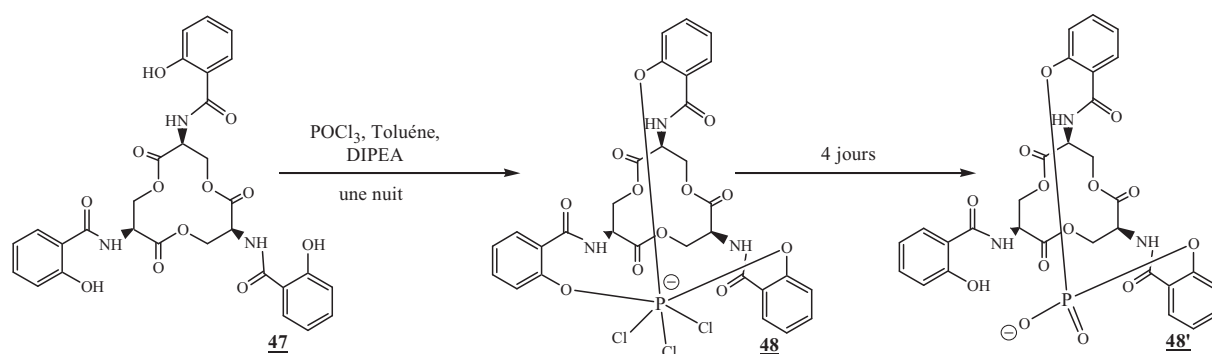


Figure 75 : Couplage entre la Salibactine et le POCl₃.

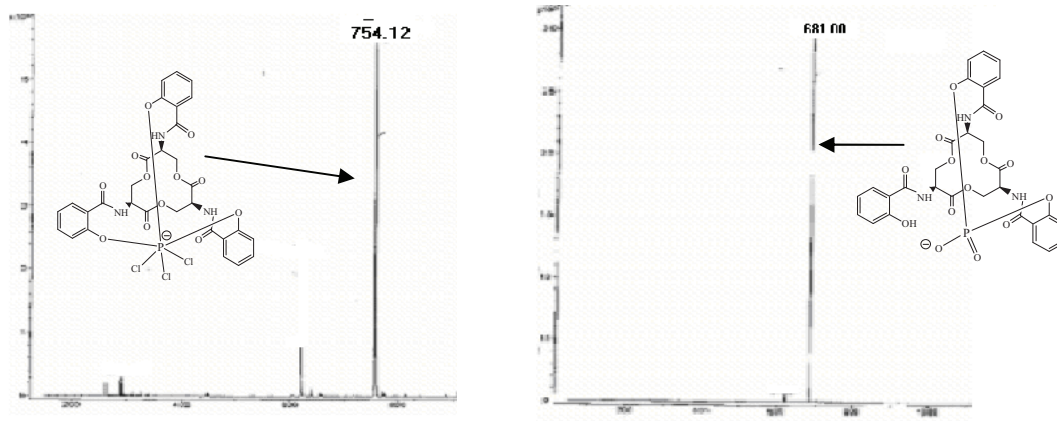


Figure 76 : Spectre ESI de couplage entre la Salibactine et la POCl_3 .

En regardant les travaux de Lacour, on remarque que la stabilité des anions de type TRISPHAT est grandement accrue par la présence de groupes très électroattracteurs qui appauvrissent en électrons les catéchols. Peut-être l'échec de la préparation de l'hexaphosphate de l'Entérobactine provient de la richesse en électrons « excessive » des catéchols. C'est pourquoi nous avons abordé la synthèse de dérivés polyhalogènes de l'Entérobactine. La présence de chlore ou de fluor fortement électronégatifs devrait faciliter la formation de l'hexaphosphate.

Le schéma de synthèse reste celui de l'Entérobactine mais en substituant à l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque les acides 2,3-difluoro-5,6-dihydroxybenzoïque ou 2,3-dichloro-5,6-dihydroxybenzoïque qu'il faut préparer. Les précurseurs commerciaux de ces acides sont le 1,2-difluoro-4,5-diméthoxybenzène et le 4,5-dichloro catéchol. Ces composés doivent être carboxylés (**Figure 77 a et b**).

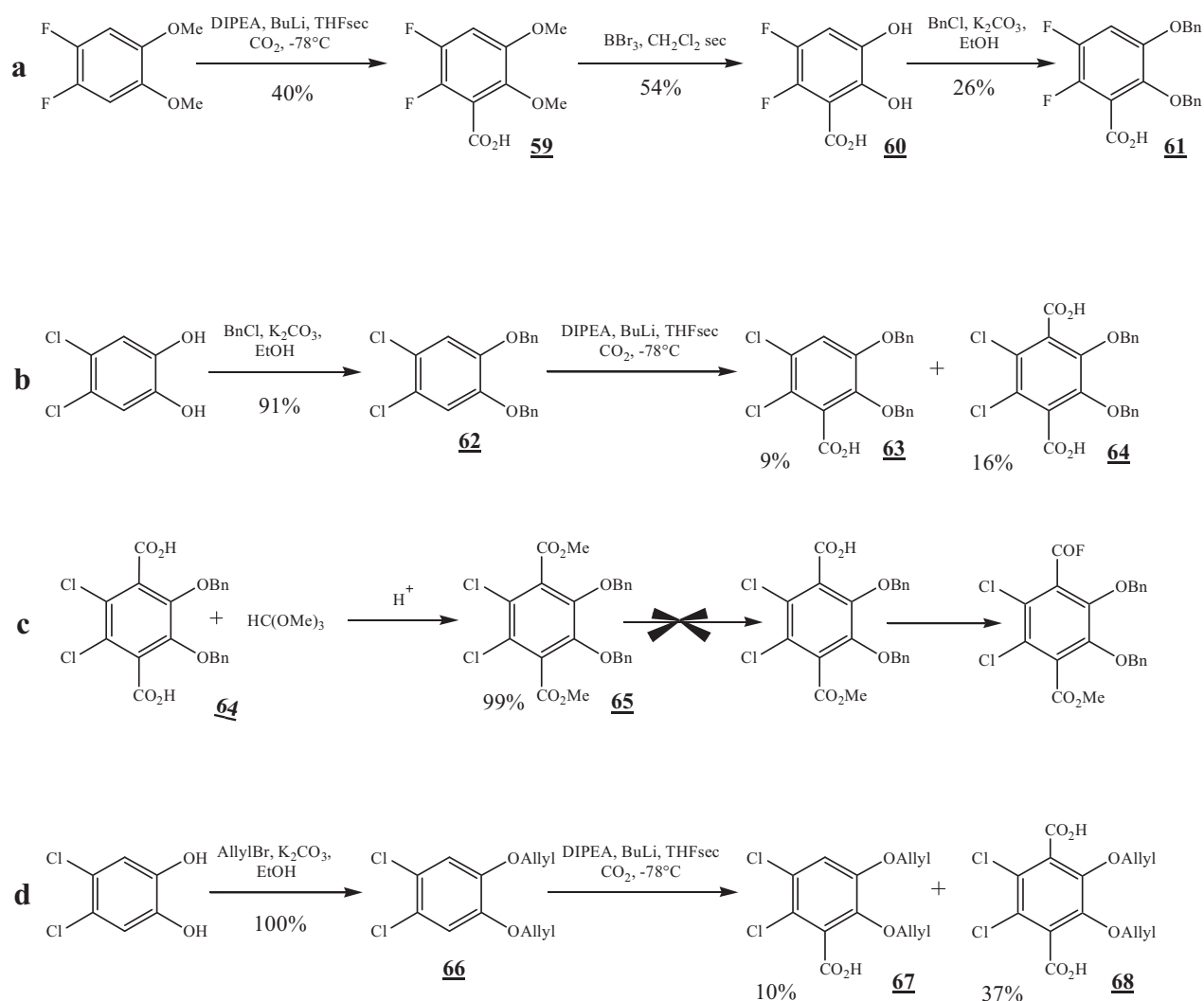


Figure 77 : Essai de la synthèse des analogues halogénés de l'Entérobactine.

Pour cela nous nous sommes inspiré des travaux de Weitzl et al.⁹⁹. L'étape de carboxylation est obtenue par une séquence d'*ortho*-lithiation avec BuLi/DIPEA (diisopropyl amine) suivie de barbotage de CO₂. On obtient **59** avec un faible rendement de 40% mais qui est suffisant pour obtenir le catéchol fluoré **60** (34%) par déméthylation avec BBr₃. La benzylation des oxygènes conduit à un faible rendement en **61** de 26% probablement en raison de la S_NAr des fluor en milieu basique. Au total le rendement n'est que de 4% ce qui nous a empêché de continuer cette synthèse en série fluorée.

99) F. I. Weitzl, K. N. Raymond, P. W. Durbin, *J. Med. Chem.*, **1981**, 24, 203.

Pour la série chlorée, le dichlorocatéchol commercial est préalablement benzylée (91%) pour permettre la carboxylation suivant le même mode opératoire BuLi/DIPEA puis CO₂. Cette fois ci on recueille deux produits de cette réactions : le monoacide **63** et le diacide **64** et avec des rendements très faibles (9% et 16% respectivement). Le diacide étant le plus abondant nous avons décidé de l'exploiter à la place de **63** obtenu en trop faible quantité. La diestérification de **64** suivie d'une tentative de mono-saponification doit permettre de retourner a un analogue de l'Entérobactine chlorée (**Figure 77 c**). Cependant la saponification sélective n'a pas été possible.

Pour tenter de revenir à de bons rendements en produit de monocarboxylation, nous avons essayé le groupe allyle à la place de groupe benzyle plus réactif vis-à-vis des organolithiens. Dans ces conditions la synthèse aboutit bien à **67** avec des rendements supérieurs mais il est toujours accompagné du produit de dicarboxylation **68**. Finalement, les quantités de produit **67** sont toujours insuffisantes pour pouvoir suivre la synthèse des analogues halogénés de l'Entérobactine si bien que nous avons abandonné définitivement l'obtention des antimétabolites phosphorés de l'Entérobactine.

Devant les difficultés expérimentales que nous avons rencontrées en série phosphorée, nous avons préféré nous focaliser sur la formation des conjugués avec les dérivés du bore.

- **Formation d'antimétabolites dérivant des acides boronique et borique**

Depuis quelques années la chimie des dérivés des acides boroniques s'est beaucoup développée en raison de la forte affinité que présentent ces composés

pour les diols vicinaux qui permet de les utiliser pour la reconnaissance des saccharides, en tant que ligand d'affinité pour la séparation des sucres, des glycoprotéines ou des sidérophores. Ces acides boroniques forment des boronates où l'atome de bore est tétravalent et dont la stabilité dépend du pH du milieu, de la nature du solvant mais aussi de la nature chimique de l'acide boronique. Une étude détaillée due à Nang et Springsteen^{100, 101} permet d'appréhender les deux premières variables de cette stabilité des boronates. Elle montre que le pH optimal pour la stabilité des boronates se situe en dessous de la valeur du pKa des acides boroniques utilisés et non pas au pKa de ces acides comme le laissaient suggérer des études antérieures. Ainsi pour « complexer » le rouge d'Alizarine S le pH optimum est égal à 6,5 pour l'acide 3-chloro-4-fluorophényl boronique de pKa = 7,8.

La nature électronique des substituants du bore influe bien évidemment sur le pKa : les substituants donneurs augmentent les pKa et inversement les substituants attracteurs diminuent les pKa. En conséquence les acides boroniques avec substitués attracteurs forment des boronates à plus bas pH que ceux avec substitués donneurs. De plus les Kavaux de Basu¹⁰² indiquent une stabilisation des boronates par la présence de groupes électroattracteurs qui dispersent la charge anionique.

Nous avons testé deux acides boroniques comportent un groupe donneur (l'acide méthylboronique) et un groupe fortement électroattracteur (l'acide 3-chloro-4-fluorophényl-boronique). En chauffant l'Entérobactine et l'acide boronique dans le toluène à léger reflux, l'analyse par spectrométrie de masse ESI des « bruts » de réaction montrent la formation du produit attendu. Dans le

100) G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5291.

101) J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11205.

102) H. R. Mulla, N. J. Agard, A. Basu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 25.

cas de l'acide méthylboronique, le boronate observé à $M = 692,37$ g/mol est accompagné par des pics qui n'ont pas été identifiés (**Figure 79**).

La purification de ce boronate n'a pas été possible : par chromatographie, il s'ensuit une dégradation et les tentatives de recristallisation ont été négatives même en présence de contre ion de type R_4N^+ ($R = \text{Me}$ ou Bu). Il faut aussi signaler que ce conjugué n'est pas stable dans les alcools (MeOH et EtOH) qui régénèrent l'Entérobactine libre.

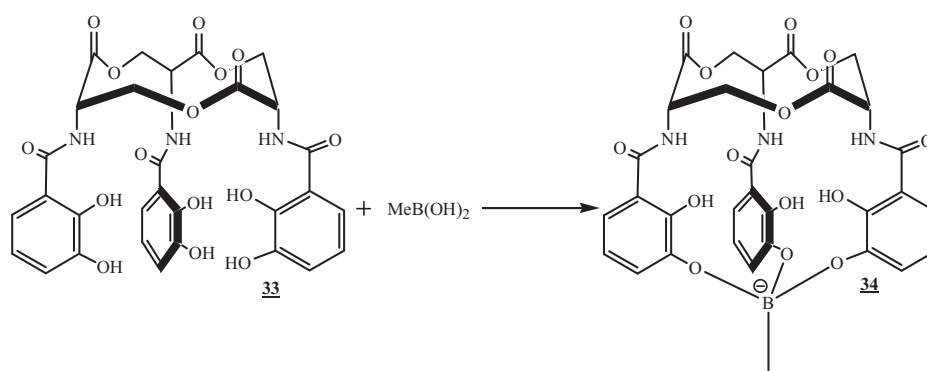


Figure 78 : Couplage entre l'Entérobactine et le MeB(OH)_2 .

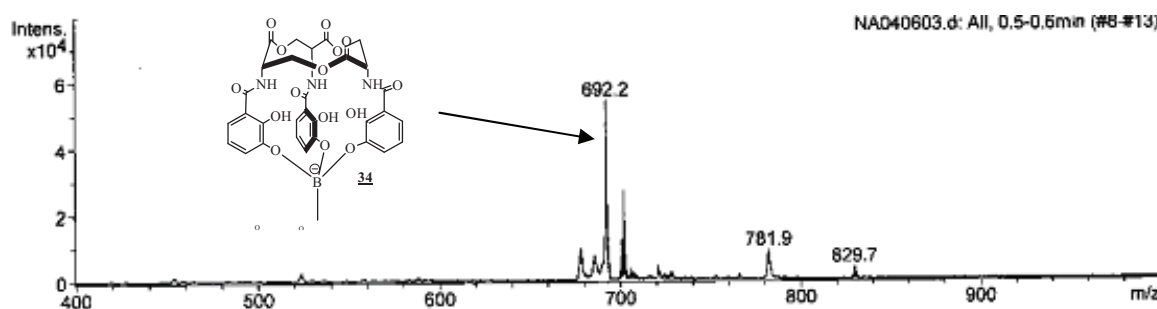


Figure 79 : Spectre ESI de couplage entre l'Entérobactine et MeB(OH)_2 .

Dans le cas de l'acide 3-chloro-4-fluorophényl boronique, la réaction est beaucoup plus propre, le spectre ESI montre que le conjugué attendu est très

majoritaire ($M = 806,6$ g/mol), accompagné d'un petit pic situé à $M = 896,00$ g/mol qui n'a pas pu être identifié (**Figure 81**).

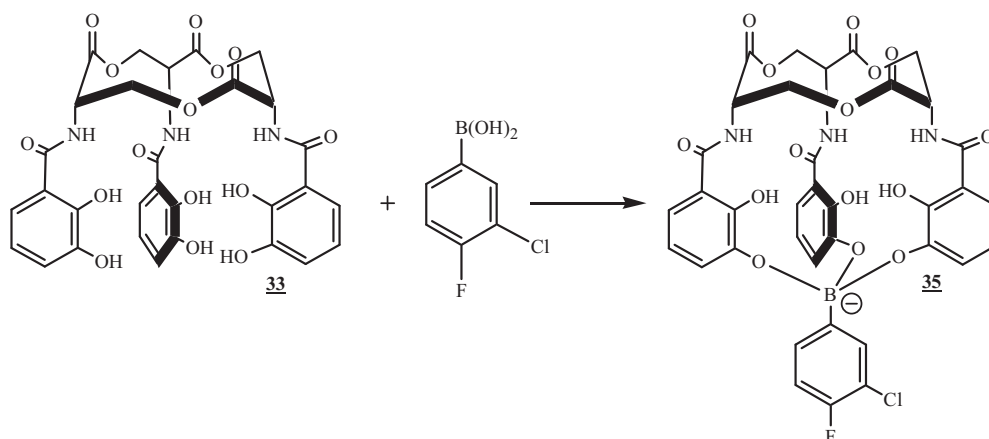


Figure 80 : Couplage entre l'Entérobactine et l'acide 4-fluoro 3-chlorophényl boronique.

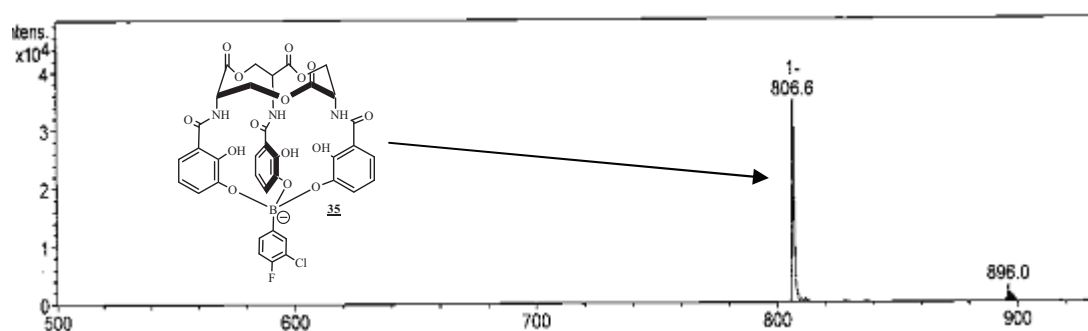


Figure 81 : Le spectre ESI de couplage entre l'Entérobactine et l'acide 4-fluoro 3-chlorophényl boronique.

Pour caractériser davantage le composé **35**, nous avons réalisé la RMN du proton : elle est identique à celle de l'Entérobactine libre ! Pourtant l'analyse par spectrométrie de masse ESI de la solution ayant servi à réaliser la RMN du proton ^1H ne montre que le pic à $806,6$ g/mol et pas celui de l'Entérobactine libre ($M_{\text{Entérobactine}} = 669,1$ g/mol). Cette dernière « sort » pourtant très bien en spectrométrie de masse ESI comme nous l'avons vérifié. L'identification de spectres RMN ^1H de **33** et **35** s'explique probablement par la très faible

différence de conformation entre 33 et 35. Des essais de caractérisation par RMN du bore ne se sont pas révélés interprétables en raison de la largeur considérable des bandes en RMN du ^{10}B . Mais compte tenu de la bonne pureté de notre échantillon de 35, nous avons évalué sa stabilité dans le méthanol. Même en chauffant plusieurs heures, on n'observe pas de dégradation par solvolysse (réaction de transestérification).

La comparaison de la stabilité de 34 et 35 dans le méthanol confirme l'effet positif des groupes électroattracteurs sur la facilité de formation et la stabilité des boronates. Cette stabilité encourageante de 35 dans le méthanol, nous a permis de le sélectionner comme candidat potentiel d'antimétabolite.

Pour conclure quant à l'intérêt de 35 comme antimétabolite, il reste à aborder l'étude de sa stabilité vis-à-vis d'un compétiteur « extrême » le Fe^{3+} . Cette partie sera abordée en fin de chapitre.

La question du site de fixation de l'acide boronique se pose. En effet, deux sites de fixations symétriques sont possible : en liaison avec les 3 oxygènes *ortho* ou en liaison avec les 3 oxygènes *méta*. Comme du point de vue stérique le deuxième choix semble le plus probable, nous avons repris la Salibactine préparée précédemment. Tous les essais de couplages avec les acides boroniques se sont soldés par échecs (**Figure 82**).

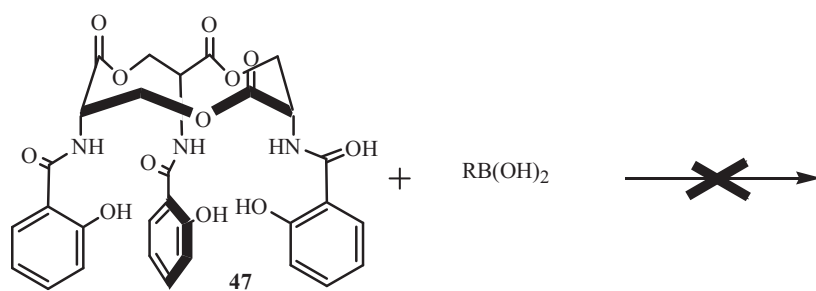


Figure 82 : Couplage entre la Salibactine et les acides boroniques.

Ces résultats indiquent bien l'impossibilité stérique de lier le bore aux oxygènes situés en *ortho* du lien amide de **47** et donc de **33**. Pour confirmer que les oxygènes en *mé*ta du lien amide sont les oxygènes de liaison, la synthèse de la *mé*ta-Salibactine a été envisagée (**Figure 83**).

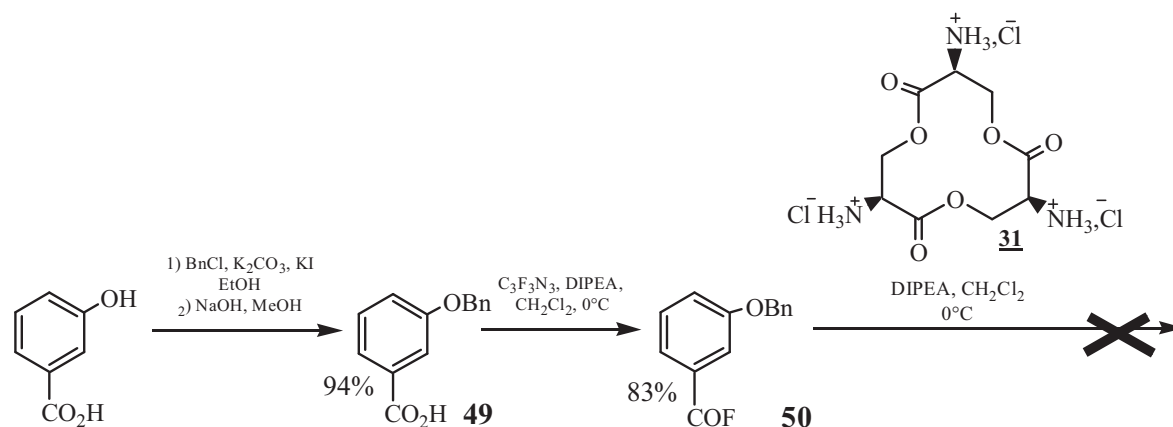


Figure 83 : Essai de synthèse d'analogue de la Salibactine.

A partir de l'acide 3-benzyloxy-benzoïque **49** que nous avons préparé, une synthèse similaire à celle de l'Entérobactine a été réalisée. Si l'on obtient bien le fluorure d'acide **50**, celui-ci conduit à la coupure de la lactone **31** sans que nous puissions observer de *N*-benzoylation. Cette différence de réactivité du fluorure d'acide **50** par rapport à son isomère **45** est surprenante. Peut être que la moindre conjugaison du groupe fluorocarboxyle situé en *mé*ta du groupe +*M* augmente sa réactivité et donc sa dureté d'où une préférence pour la *O*-benzoïlation *versus* *N*-benzoïlation.

L'échec de la synthèse de la *mé*ta-Salibactine ne laisse pourtant guère de doute quant au lieu de fixation de l'atome de bore des acides boroniques.

Nous avons essayé de coupler l'Entérobactine avec l'ester triéthylborique, le plus simple des composés du bore.

Le spectre ESI de masse montre la présence du produit **42** (M = 677,33 g/mol) mais il n'est pas stable dans le méthanol non plus.

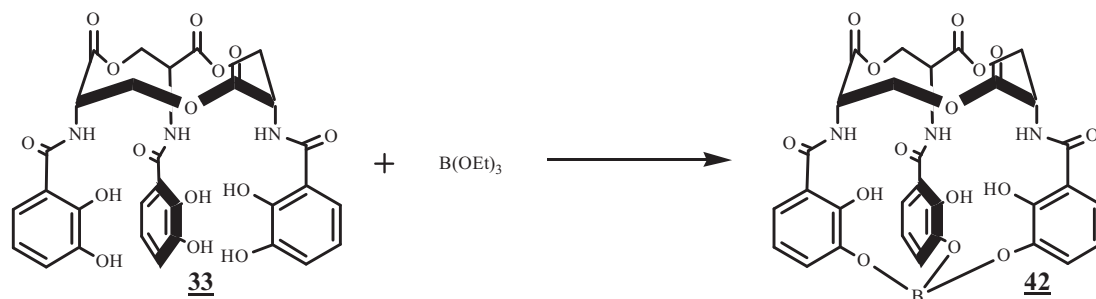


Figure 87 : Couplage entre le triéthylborate et l'Entérobactine.

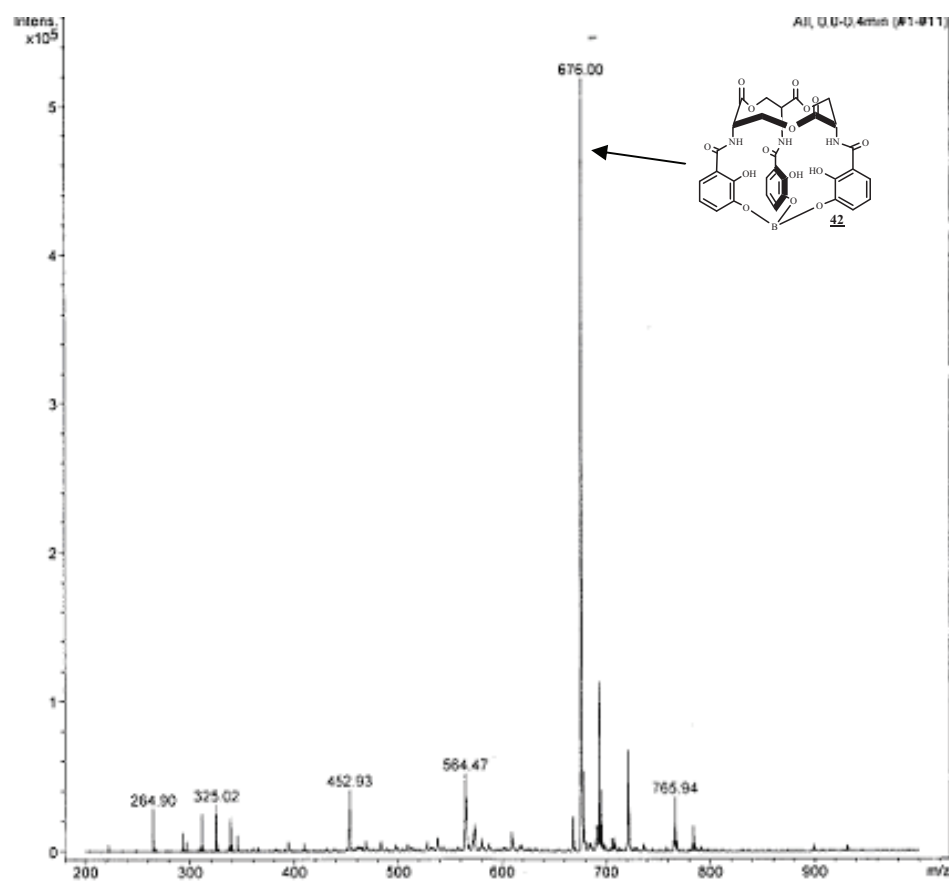


Figure 88 : Spectre ESI du couplage entre le triéthylborate et l'Entérobactine.

La spectrométrie de masse (ESI), réalisé dans le MeOH, du composé **42** montre q'il y a en une transestérification (voir **Figure 89**).

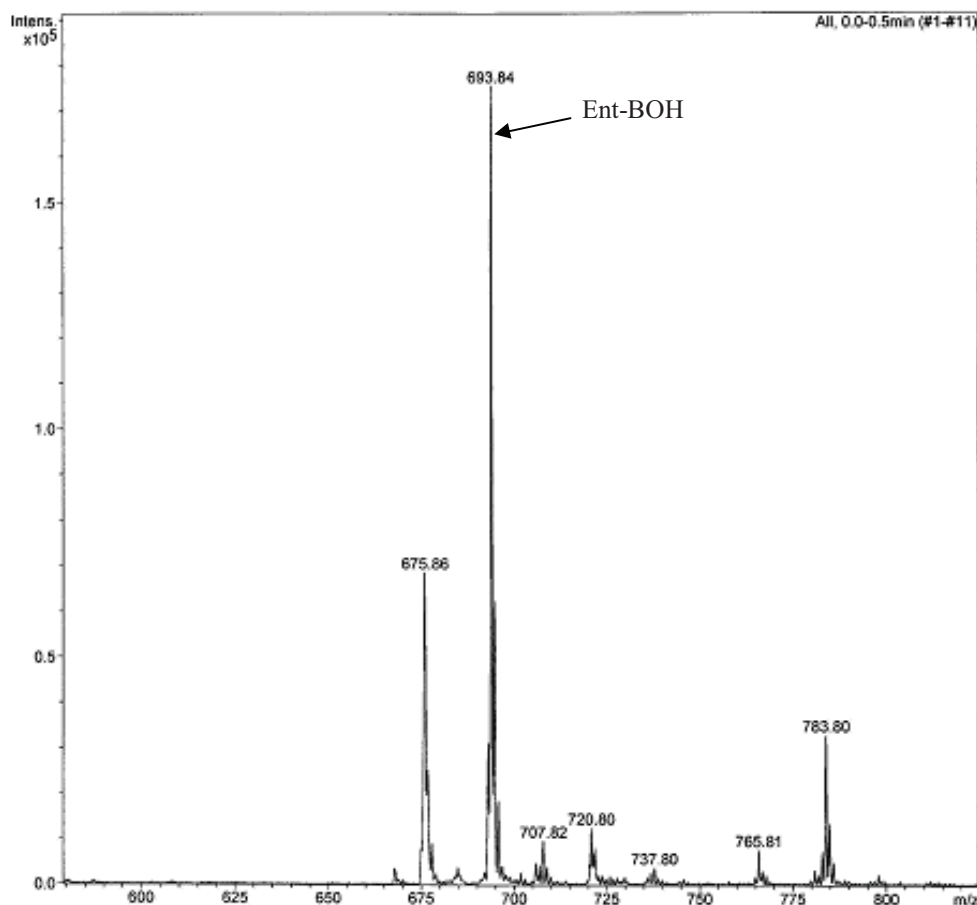


Figure 89 : Le spectre ESI du couplage entre l'acide triéthylborique et l'Entérobactine dans MeOH.

En considération de ces résultats, il nous a semblé alors possible d'exploiter l'Entérobactine pour en faire un cheval de Troie d'antibiotique. En effet, il devrait suffire de modifier un antibiotique connu en dérivé d'acide boronique et de la coupler à **33** (Entérobactine). L'encombrement stérique de l'antibiotique ne devrait pas gêner le couplage puisque celui-ci se fait sur les oxygènes en *méta* plus dégagés. La nature de l'acide boronique ne devait pas être quelconque car seuls les acides boroniques comportant un groupe électroattracteurs donnent de boronates stables. C'est pourquoi nous avons

choisi un acide benzoïque boronique où le noyau phényle et la fonction acide en position 4 exercent un effet $-I$ et $-M$ important. Le groupe CO_2H nous permet d'établir en outre un lieu covalent fort avec l'antibiotique choisi via un amide.

3.3 Synthèse de l'Entérobactine-Cyprofloxacin un cheval de Troie potentiel

Nous avons retenu la Ciprofloxacine un antibiotique de la famille de quinolone qui contient un atome de fluor (antibiotique fluoro quinolone), qui possède une activité biologique touchant un large spectre de bactéries pathogènes¹⁰³.

La fixation de l'antibiotique sur l'atome de bore est réalisée par le schéma de synthèse original suivant (Figure 84) :

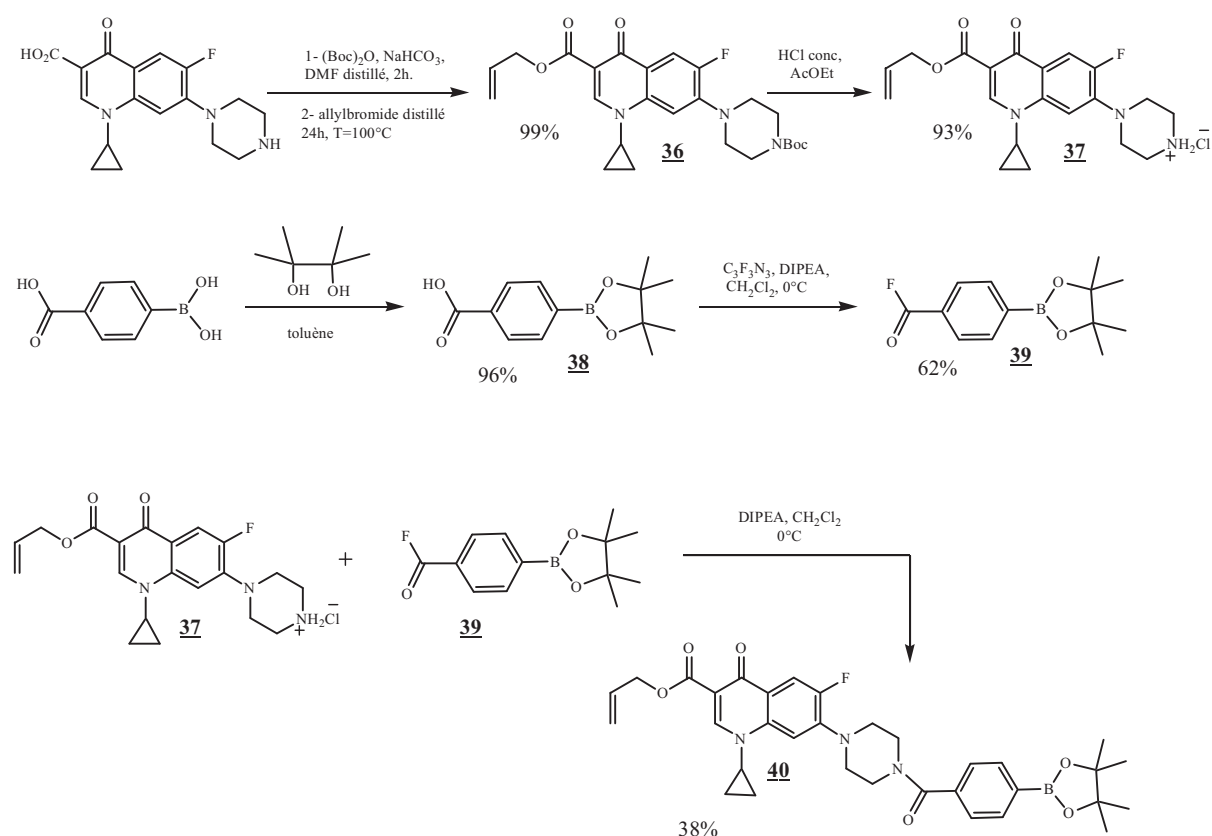


Figure 84 : Couplage entre la Ciprofloxacine et l'acide boronique.

103) P. Herczegh, T. B. Buxton, J. C. Mcpherson, A. Kovacs-Kulyassa, P. D. Brewer, F. Sztaricskai, G. G. Stroebel, K. M. Plowman, D. Farcasiu, J. F. Hartmann, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2338.

La Ciprofloxacine subit une réaction de protection des acides par le groupe allyle et l'amine par un groupement Boc (99%) qui est suivie d'une déprotection de l'amine par le HCl d'un rendement égal à 93%^{104, 105}. Pour former sélectivement l'amide entre **37** et l'acide boronique choisit, il fait protéger préalablement le bore sous forme d'ester de pinacol¹⁰⁶. L'obtention de **38** se fait avec très bon rendement 96%. L'activation de l'acide carboxylique sous forme de fluorure et à nouveau réalisée par le fluorure de cyanurile avec un rendement satisfaisant de 62%. En dernière étape, le couplage entre le composé **37** et le fluorure d'acide **39** donne l'antibiotique **40** fixé sur le bore avec un rendement de 38%. Ce composé n'est pas très stable à température ambiante et il faut le conserver au froid.

Le couplage de **40** avec l'Entérobactine est réalisé en chauffant simplement ces deux réactifs en quantité stoechiométrique dans le toluène. L'acidité des catéchols semble suffisante pour catalyser cette étape de transestérification. L'analyse par spectrométrie de masse ESI (**Figure 86**) indique bien la présence de **41** (M = 1151,84 g/mol) accompagné du pic de masse de l'Entérobactine (M = 667,8 g/mol). Pourtant, la réaction est totale si on en juge par l'examen de la RMN du fluor 19, un seul pic est détecté à -124.46 ppm alors que l'antibiotique non couplé sort à -124,76 ppm. L'observation du pic de masse correspondant à l'Entérobactine provient certainement des conditions d'ionisation en technique électrospray. La caractérisation par RMN du proton n'est toujours pas concluante en ce qui concerne les déplacements chimiques de l'Entérobactine qui restent pratiquement non affectés par la conjugaison, comme on l'avait déjà remarqué avec les autres acides boroniques.

104) M. E. Jung, E. C. Yang, B T. Vu, M. Kiankarimi, E. Spyrou, J. Kaunitz, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3899.

105) W. R. Baker, S. Cai, M. Dimitroff, L. Fang, K. K. Huh, D. R. Ryckman, X. Shang, R. M. Shawar, J. H. Therrien, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 4693.

106) A de Filippis, C. Morin, C. thimon, *Synthetic Communication*, **2002**, 32, 2669.

On note cependant une disparition du signal des protons méthyliques du groupe pinacol ($\delta = 1,35$ ppm) alors que le reste des signaux de la partie antibiotique est elle aussi peu affectée par la conjugaison.

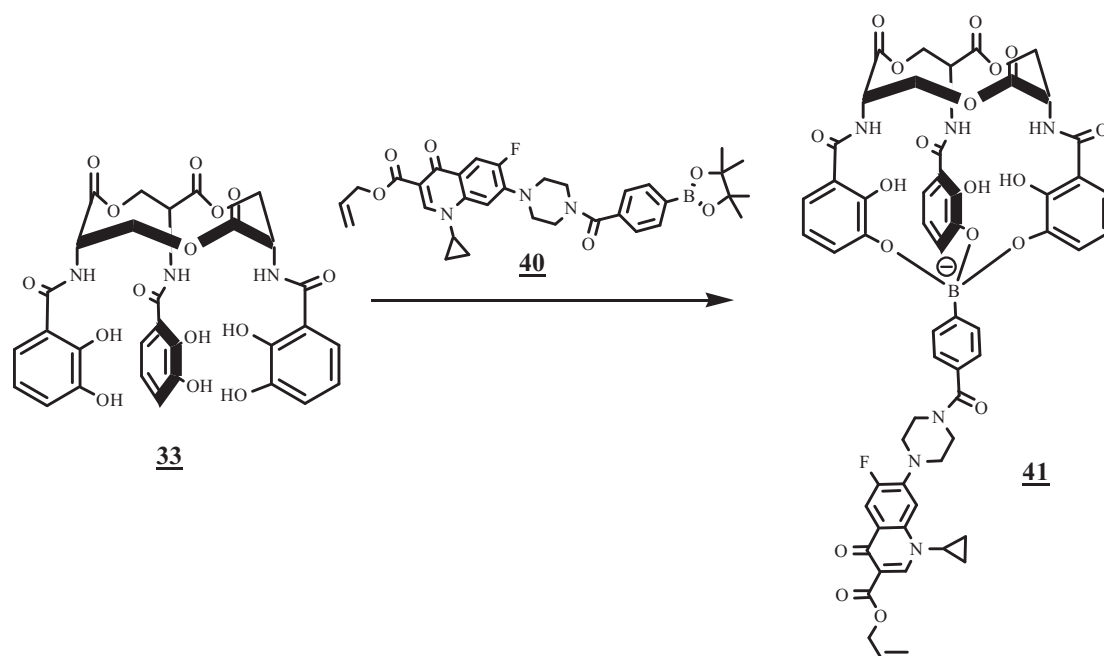


Figure 85 : Couplage entre l'antibiotique et l'Entérobactine.

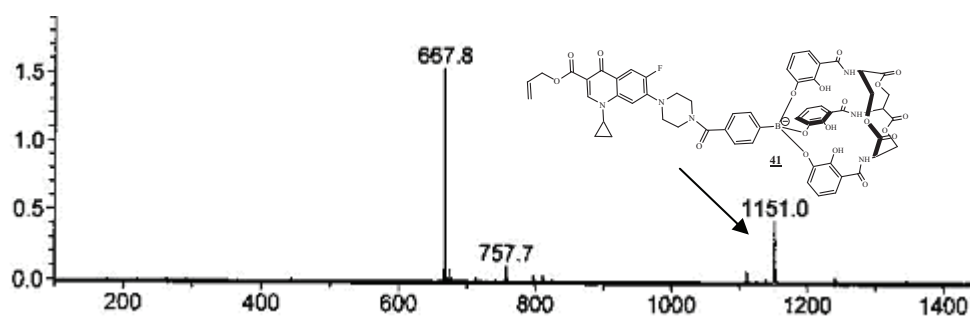


Figure 86 : Spectre ESI du couplage entre l'Entérobactine et l'antibiotique.

Ces résultats montrent qu'il est possible de réaliser des antimétabolites potentiels fondés sur l'atome de bore et qui permet aussi la formation de conjugués de type « Cheval de Troie ». La stabilité *ex vivo* et *in vivo* devra être évaluée pour confirmer l'intérêt biologique de cette nouvelle stratégie.

Remarque

Des essais biologiques sont actuellement en cours pour évaluer l'activité biologique des composés **35** et **41** chez *E. Coli* en collaboration avec le CEA de Grenoble (Equipe du Dr I. Michaud-Sauret).

3.4 Synthèse de l'Oxinobactine

La 8-hydroxyquinoléine (oxine) forme des ligands tripodaux très efficaces pour la complexation du fer. Mais ces ligands sont organisés autour d'espaceurs abiotique tels que la tris(aminoéthyl)-amine ou l'espaceur tris(aminopropyl)méthane. Il était donc tentant d'évaluer la capacité de complexation de l'oxine, abiotique, avec la trilactone de la sérine apparemment parfaitement architecturée pour la complexation du fer. Nous avons alors accommodé le schéma de synthèse décrit pour l'Entérobactine en substituant l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque par l'acide 7-carboxy-8-hydroxyquinoléique **51** (Figure 90). Ce dernier composé n'est pas commercial est il faut donc le préparer.

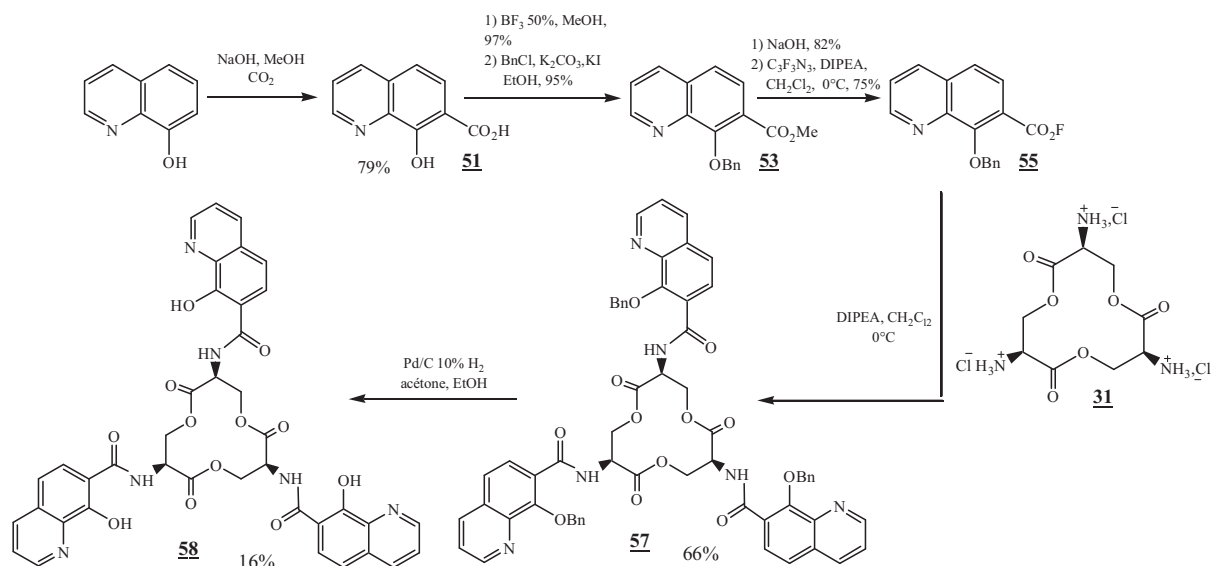


Figure 90 : Synthèse de l'Oxinobactine.

3.4.1 Obtention de la 7-carboxy-8-hydroxyquinoléine 51

Ce composé est le plus simplement obtenu en une seule étape, à partir de 8-hydroxyquinoléine commerciale par la réaction de Kolbe-Schmidt.^{107, 108} Cette méthode nous a permis d'obtenir des quantités importantes de produit avec un rendement très satisfaisant (jusqu'à 90%) à la condition seule que le phénate de sodium, nécessaire à la réaction, soit obtenu de façon rigoureusement anhydre. L'eau est connue pour inhiber la réaction de Kolbe-Schmidt.

L'aspect régio-sélectif en *ortho* de cette réaction est expliqué par l'ancrage des réactifs autour du cation sodium : l'oxygène du CO₂ et le phénolate forment un cycle à six très favorable. Il y a donc une *ortho*-carboxylation exclusivement (**Figure 91**).

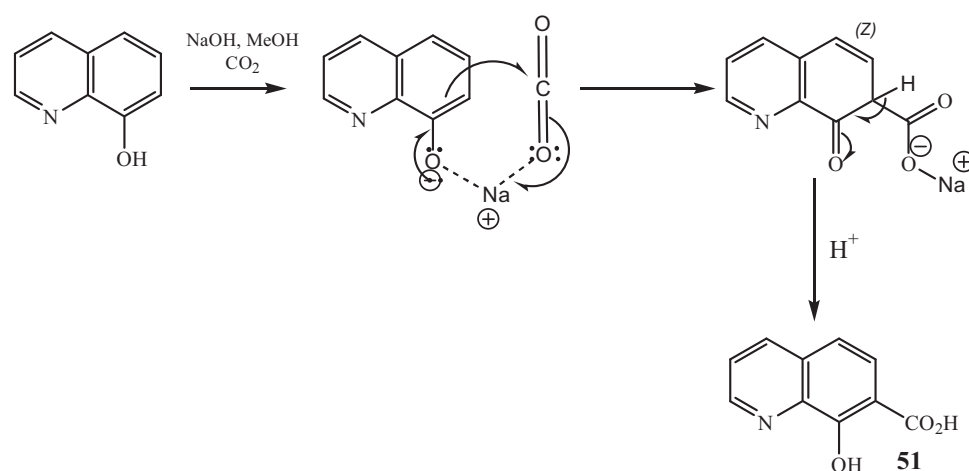


Figure 91 : Réaction de Kolbe sur l'oxine.

107) R. Schmidt, F. Engelmann, *Ber.*, **1887**, 20, 12177.

108) A. S. Lindsey, H. Jeskey., *Chem. Rev.*, **1957**, 57, 583.

3.4.2 Obtention de la 7-carboxy-8-dibenzyloxyquinoléine

De même que précédemment, il faut protéger le groupe hydroxyle pendant l'étape de couplage et le groupe benzyle est à nouveau retenu.

Le 7-carboxy-8-dibenzyloxyquinoléine **54** est obtenue en 3 étapes à partir de la 7-carboxy-8-dihydroxyxyquinoléine **51** par l'application de la procédure développée au laboratoire. Il faut d'abord, transformer **51** en ester **52** par l'utilisation de l'acide de Lewis BF_3/MeOH dans un excès du MeOH. Le 8-hydroxyquinoléine-7-carboxylate de méthyle **52** réagit ensuite avec le chlorure de benzyle en présence d'excès de K_2CO_3 pour fournir le 8-benzyloxyquinoléique-7-carboxylate de méthyle **53**. Enfin, la réaction de saponification de l'ester **53** par l'action du KOH suivit d'acidification, mène à l'acide 7-carboxy-8-benzyloxyquinoléique **54** désiré. Le rendement de 75% pour les trois étapes est très satisfaisant (Figure 92).

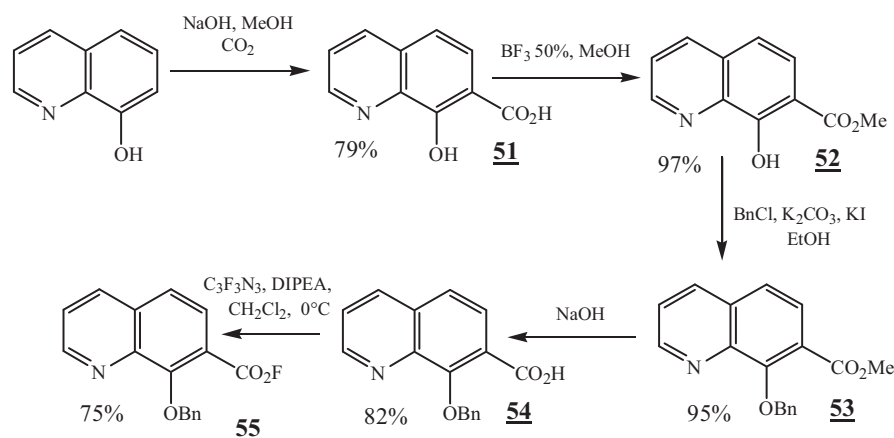


Figure 92 : Synthèse de la 7-fluorocarboxy-8-benzyloxyquinoléine.

3.4.3 Obtention du fluorure d'acide

L'activation de l'acide 54 sous forme de fluorure 55 est de nouveau réalisée par le fluorure de cyanuryle. On remarque ici encore la stabilité relativement importante du fluorure qui est isolable malgré la présence de l'atome d'azote nucléophile de la quinoléine. Cependant, ce fluorure doit être conservé à -18°C pour limiter son inexorable dégradation.

3.4.4 Obtention de l'oxinobactine benzylée

Toujours en nous inspirant des conditions décrites pour l'Entérobactine, nous avons couplé le fluorure d'acide 55 avec la trilactone de la sérine. La purification du brut réactionnel s'est révélée particulièrement ardue : c'est un fait habituel avec les dérivés hydroxy-quinoléiques qui conduisent à de très nombreux sous-produits, qui ne sont pas toujours en quantité importante, mais qui sont très fortement colorés et fluorescents. A ce niveau, plusieurs composés sont obtenus et identifiés notamment par ESI parmi lesquels le composé d'ouverture de la trilactone 57' ($M = 1077,10 \text{ g/mol}$; $M_{\text{calculé}} = 1076,00 \text{ g/mol}$) et le composé 57'' ($M = 783,78 \text{ g/mol}$; $M_{\text{calculé}} = 783,00 \text{ g/mol}$). Ce dernier composé est intéressant car il permet de greffer un autre groupe complexant comme le catéchol. On peut aussi espérer évaluer des propriétés de complexation de l'Entérobactine (tout catéchol) vers l'Oxinobactine (tout hydroxyquinoléine) via l'intermédiaire des chélateurs mixtes catéchol/hydroxyquinoléine.

Nous avons donc essayé de synthétiser l'Oxinobactine mixte 57''' ($M_{\text{théorique}} = 1100,13 \text{ g/mol}$), à partir du composé 57'' et du fluorure d'acide 29. Le spectre ESI montre la présence d'oxinobactine mixte (voir **Figure 93**).

Le spectre ESI montre la présence du produit **57**'''' mais en faible quantité. Nous n'avons pas optimisé cette synthèse qui montre seulement la faisabilité chimique de la préparation des sidérophores mixtes catéchol-hydroxyquinoléine.

Nous avons cependant isolé le produit attendu l'oxinobactine protégée **57** avec un rendement de 66%. L'Oxinobactine est obtenue après la réaction de débenzylation avec PdC à 10% réalisée à la pression de H₂ pendant 6 h à 40°C¹⁰⁹. Cependant on obtient un très faible rendement de 16% car on observe ici une réduction partielle des quinoléines en dihydroquinoléine, réduction difficile à empêcher sans inhiber aussi la débenzylation.

3.4.5 Synthèse direct de l'Oxinobactine

Pour essayer d'augmenter le rendement en supprimant les étapes de protection et de déprotection des benzyles, la formation d'Oxinobactine est tentée directement à partir de l'acide 8-hydroxy-quinoléique fluoré **56**. Malheureusement, comme nous l'avons constaté avec la synthèse « directe » de l'Entérobactine et la Salibactine, le couplage avec la trilactone déprotégée se solde par un échec.

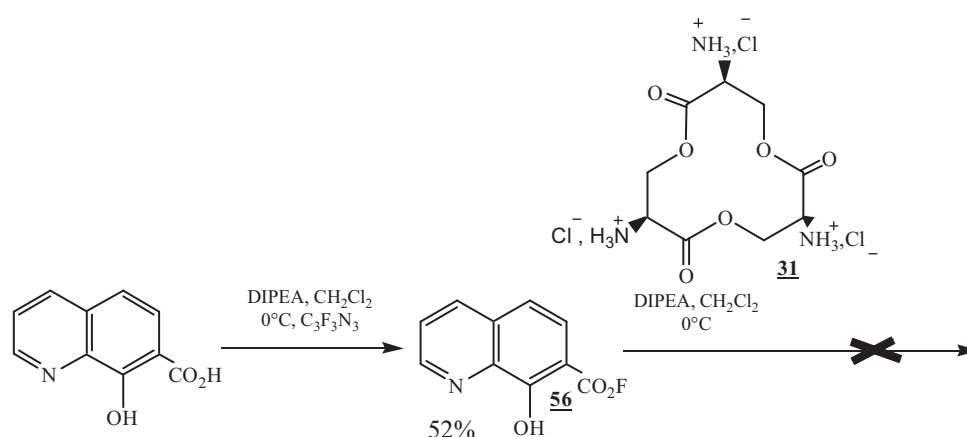


Figure 95 : Essai de synthèse directe de l'Oxinobactine.

109) F. Zouhri, M. Danet, C. Bénard, M. Normand-Bayle, J-F Mouscadet, H. Leh, C. M. Thomas, G. Mbemba, J. D'Angelo, D. Desmaele, *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 2201.

3.5 Etude spectrophotométrique UV-Visible de l'Entérobactine et de ses analogues

Les ligands et leurs « complexes » ferriques ou boronique pour **35** ont été caractérisés par spectrophotométrie UV-Visible dans des mélanges eau-méthanol pour des raisons de solubilité.

3.5.1 Etude du ligand Entérobactine et son ester **35**

La titration spectrophotométrique UV-Visible est utilisée pour étudier le complexe ENT/Fe³⁺ et la compétition entre ENTB **35** et Fe³⁺ (avec ENT : Entérobactine **33**, ENTB : le composé **35**) dans un intervalle de pH compris entre 3 – 7, l'objectif est d'étudier la stabilité de l'ester boronate **35** en présence de Fe³⁺ (**Figure 96**).

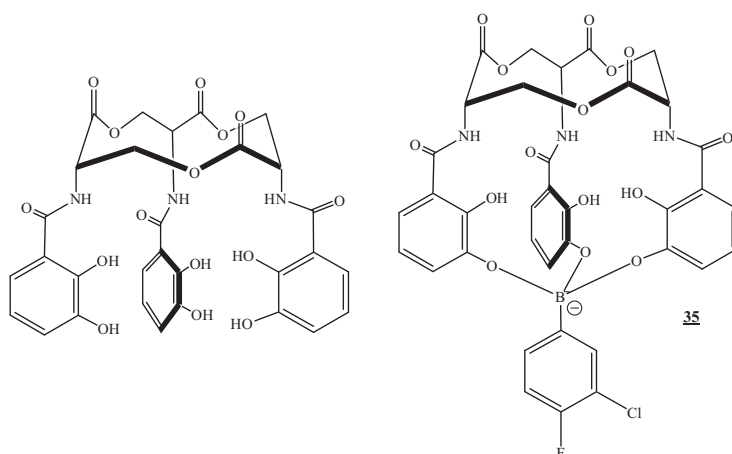


Figure 96 : ENT et ENTB

➤ Complexation Entérobactine/Fer

L'ENT est hexadenté et forme un complexe connu de stœchiométrie 1:1 avec Fe^{3+} .

Il a été montré ⁵¹ qu'en milieu acide ($\text{pH} < 3$) la coordination est de type salicylate, c'est-à-dire avec les atomes d'oxygène du groupe carboxyle et du groupe hydroxyle en *ortho*. Cela correspond à la réaction de formation du complexe $\text{Fe}(\text{ENTH}_3)$ suivant :



Ensuite, plusieurs états de déprotonation peuvent être observés par augmentation du pH correspondant aux équilibres suivants :



Cela se traduit par un déplacement des bandes d'absorption UV-Visible du complexe vers les plus courtes longueurs d'onde : le complexe tris-salicylate absorbe vers 540 nm et le complexe tris-catécholates vers 490 nm.

Nous avons dû redéterminer les caractéristiques du complexe $\text{ENT}/\text{Fe}^{3+}$ dans le mélange méthanol-eau qui n'était connues qu'en milieu aqueuse. L'étude du complexe $\text{ENT}/\text{Fe}^{3+}$ est effectuée dans un mélange $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} ; 20 : 80$ (% v : v) dans un intervalle de pH compris entre 3,5 – 7,4.

51) L. D. Loomis, K. N. Raymond., *Inorg. Chem.*, **1991.**, 30., 906.

Mesures de pH

Le calibrage de l'électrode est effectué en utilisant des solutions tampons préparées dans le mélange H₂O : MeOH 80 : 20 (% v : v) de valeur de pH 4,00 et 7,77.¹¹⁰

La **Figure 97** montre l'évolution des spectres dans ce domaine de pH :

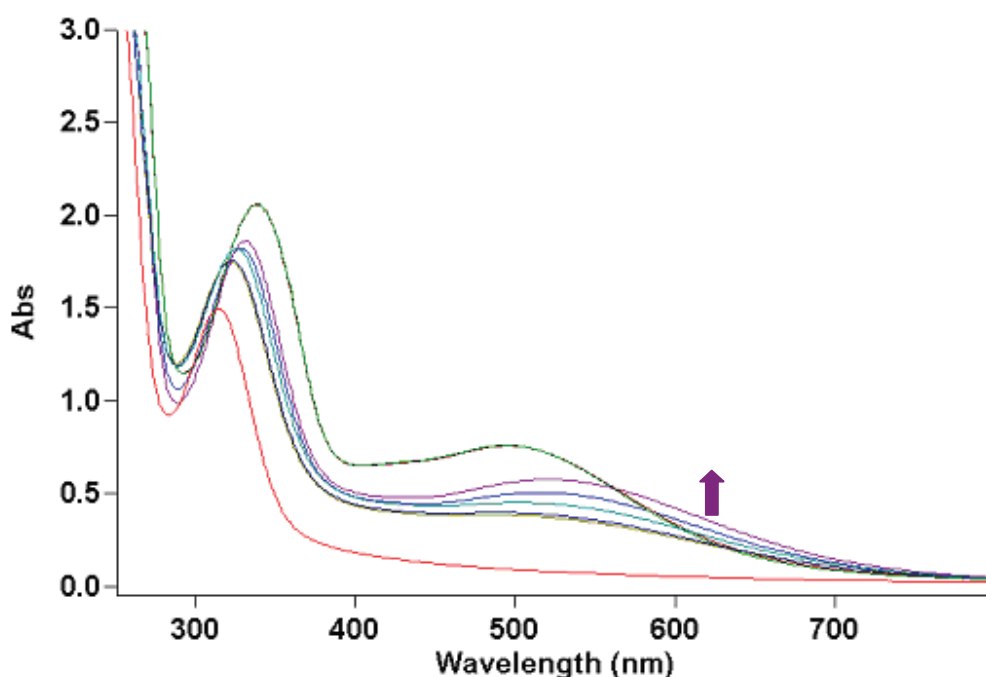


Figure 97 : Spectres UV visible du complexe ENT/Fe en fonction du pH ; (solution MeOH : H₂O ; 20 : 80 (% v : v) ; [ENT] = 2 10⁻⁴ M ; [Fe³⁺] = 1,96 10⁻⁴ M ; de bas en haut : ENT à pH = 3,7, ENT/Fe à pH = 3,5 ; 3,8 ; 4,3 ; 5,8 ; 6,3 ; 7,4 ; T = 20°C.

On obtient les caractéristiques suivantes pour les bandes principales :

Entérobactine seule à pH = 3,7 $\epsilon = 7450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 314 \text{ nm}$.

Entérobactine/Fer à pH = 7,4 $\epsilon = 10300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 338 \text{ nm}$

$\epsilon = 3800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$.

110) I. Canals, F. Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatography A*, **2001**, 191.

On constate que les valeurs de ϵ pour le complexe ferrique de l'entérobactine sont plus faibles que celles obtenues en solution aqueuse⁵¹.

Tableau 1

	λ_{\max} 337 nm	λ_{\max} 501 nm
ENT/Fe ³⁺ dans H ₂ O (pH = 7)	$\epsilon = 15500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
ENT/Fe ³⁺ dans H ₂ O/MeOH (pH = 7,4)	$\epsilon = 10300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon = 3800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Tableau 1

Pour vérifier si cette diminution est due à la présence de MeOH, on a redéterminé les caractéristiques du complexe ferrique d'un ligand tricatéchol, TRENCAMS (**Figure 98**), dans le mélange MeOH:H₂O et 20:80 (% v : v).

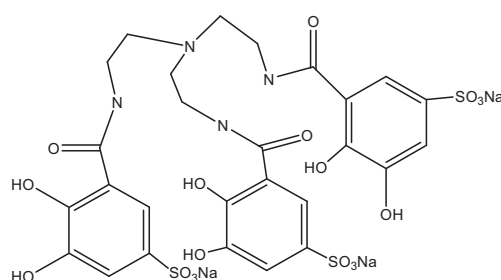


Figure 98 : TRENCAMS

La **Figure 99** montre les résultats obtenus pour le TRENCAMS dans l'eau 100% :

51) L. D. Loomis, K. N. Raymond., *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 906.

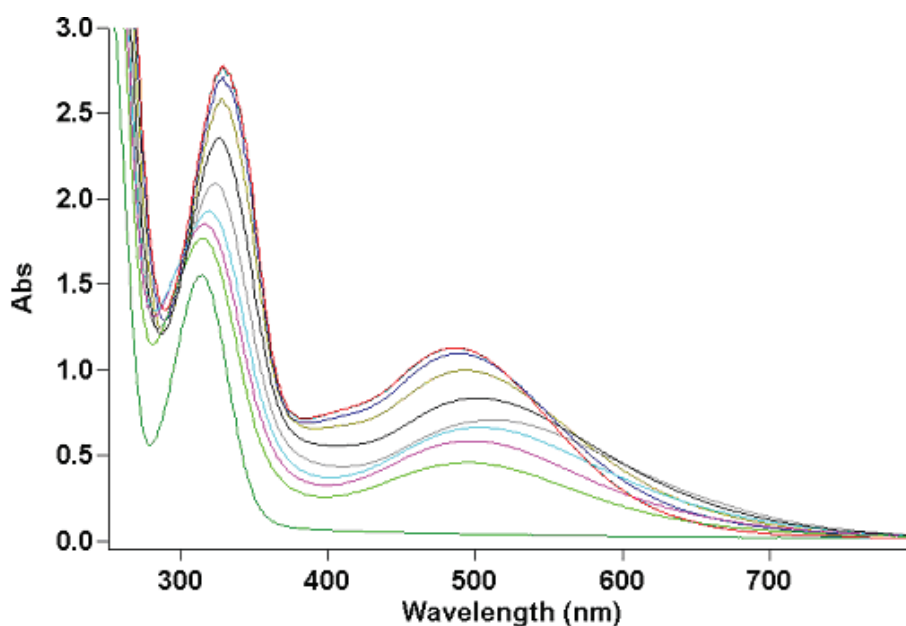


Figure 99 : Spectres UV visible du complexe TRENcAMS/Fe en fonction du pH dans l'eau ; [TRENcAMS] = $1,9 \cdot 10^{-4}$ M ; $[\text{Fe}^{3+}] = 1,96 \cdot 10^{-4}$ M ; de bas en haut : TRENcAMS à pH = 3,4, TRENcAMS/Fe à pH = 3,44 ; 3,67 ; 4,08 ; 4,57 ; 4,87 ; 5,25 ; 7,9 ; T = 20°C).

La Figure 100 montre les résultats obtenus pour le TRENcAMS dans le mélange MeOH:H₂O et 20:80 (% v : v) :

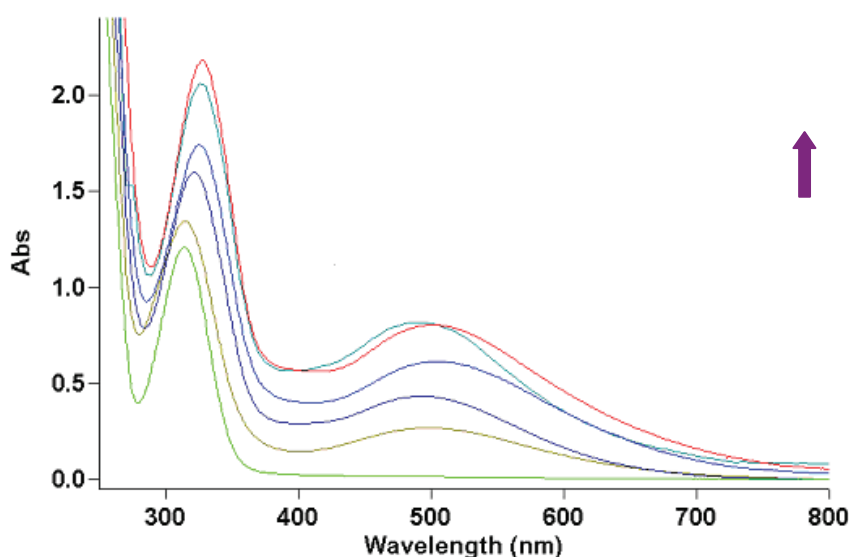


Figure 100 : Spectres UV visible du complexe TRENcAMS/Fe en fonction du pH ; (solution MeOH:H₂O, 20%:80% ; [TRENcAMS] = $1,8 \cdot 10^{-4}$ M ; $[\text{Fe}^{3+}] = 1,96 \cdot 10^{-4}$ M ; de bas en haute : TRENcAMS à pH = 3,4, TRENcAMS/Fe à pH = 3,4 ; 3,5 ; 3,8 ; 4,4 ; 5,3 ; 7,8 ; T = 20°C.

Les valeurs de ϵ obtenues sont rassemblées dans le **Tableau 2**.

	λ_{\max} 328 nm	λ_{\max} 486 nm
TRENCAMS dans H ₂ O (pH = 7)	$\epsilon = 14600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon = 5700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
TRENCAMS dans H ₂ O : MeOH ; 80 : 20 (% v : v) (pH = 7,9)	$\epsilon = 11400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon = 4100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Tableau 2

La comparaison des valeurs de ϵ montre que la présence de MeOH diminue sensiblement l'absorption du complexe, ce qui confirme les valeurs de ϵ obtenues pour le complexe ferrique de l'Entérobactine.

➤ **Complexe ENTB/Fer**

Le spectre UV-Visible de l'ester boroné **35** de l'entérobactine a été réalisé à pH = 3,7 (**Figure 101**), il présente les mêmes caractéristiques que celui de l'Entérobactine.

La compétition avec Fe^{3+} à été étudiée par spectrophotométrie. Les spectres UV-Visible d'un mélange contenant l'ester boroné **35** et Fe^{3+} en concentrations équivalentes ont été enregistrés dans le domaine de pH 3,7 - 7,4.

Les spectres sont représentés sur la **Figure 101** :

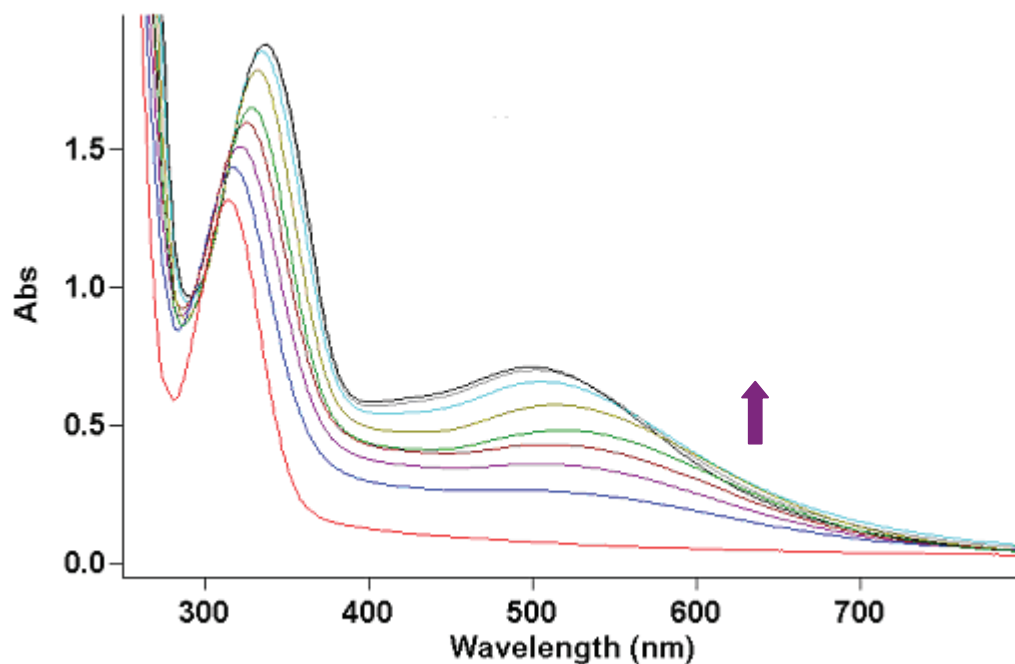


Figure 101 : Spectres UV visible du mélange ENTB/Fe en fonction du pH ; (solution MeOH:H₂O et 20:80 (% v : v) ; [ENTB] = 2 10⁻⁴ M ; [Fe³⁺] = 1,96 10⁻⁴ M ; de bas en haut : ENTB à pH = 3,7 ; ENTB /Fe à pH = 3,7 ; 3,9 ; 4,4 ; 5,0 ; 5,7 ; 6,5 ; 6,9 ; 7,6 ; T = 20°C.

Le spectre de l'Entérobactine boré à pH = 3,7 est présenté sur la **Figure 101**. Il est quasiment identique à celui de l'Entérobactine $\lambda_{\max} = 315 \text{ nm}$; $\varepsilon = 6550 \text{ M.cm}^{-1}$. L'ajout de Fe³⁺ à la solution conduit à l'apparition de la bande de transfert de charge du complexe ENT/Fe³⁺. A pH 7.45 on obtient $\lambda_{\max} = 501 \text{ nm}$ et $\varepsilon = 3600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Les valeurs sont très proches de celle du complexe ENT/Fe³⁺ dans les mêmes conditions. Elles indiquent que Fe³⁺ a remplacé rapidement le bore du dérivé de l'Entérobactine. La valeur de $\varepsilon = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 501nm, légèrement plus faible que pour le complexe ENT/Fe³⁺, pourrait indiquer qu'il subsiste un peu d'Entérobactine borée (environ 5%). Cependant, les expériences sont réalisées à pH = 3,7 où le fer III+ est soluble. Dans les conditions physiologiques le pH est centré sur 7 où le fer III+ n'est présent qu'à l'état de traces. Dans ces conditions, l'ester **35** pourrait « survivre » à cette compétition.

De plus à pH = 7, l'échange Fe/B est peut-être beaucoup plus lent en raison de la formation des hydroxydes ferriques.

3.5.2 Etude de la Salibactine

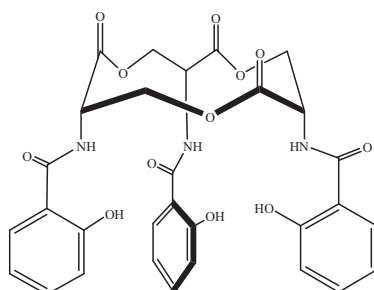


Figure 102 : Salibactine

L'étude du complexe Salibactine/ Fe^{3+} est effectuée dans un mélange MeOH : H_2O ; 37 : 63 (% v : v) pour des raisons de solubilité et dans un intervalle de pH compris entre 4,87 et 7,45 (Figure 103).

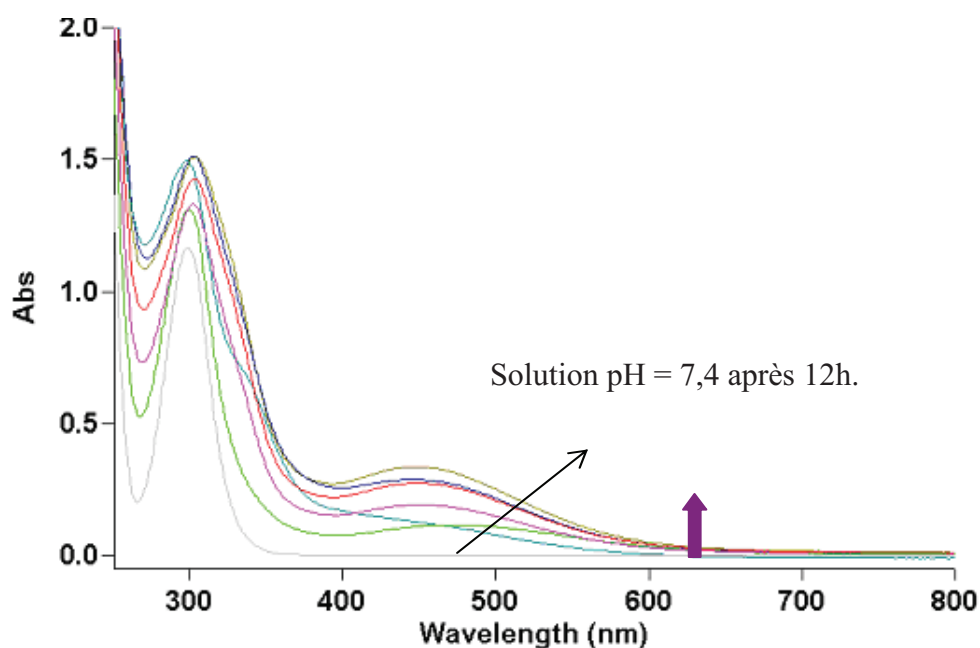


Figure 103 : Spectres UV visible du complexe Salibactine/Fe en fonction du pH ; (solution MeOH : H_2O et 37 : 63 (% v : v) ; [Salibactin] = 10^{-4} M ; [Fe^{3+}] = $0,98 \cdot 10^{-4}$ M ; pH compris entre 4,8 ; 5,2 ; 5,8 ; 6,1 ; 6,5 ; 7,4 ; T = 20°C.

Les caractéristiques spectrales sont les suivantes :

Salibactine seul à pH = 3,8 $\epsilon = 11600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$.

Salibactine /Fe³⁺ à pH = 7,45 $\epsilon = 15200 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 305 \text{ nm}$.

$\epsilon = 3400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$.

Cependant, la complexation n'est pas stable car la bande à 447 nm disparaît avec le temps, ce qui n'est pas étonnant si l'on considère que ce ligand n'est pas hexadenté mais tridenté.

3.5.3 Etude de l'Oxinobactine

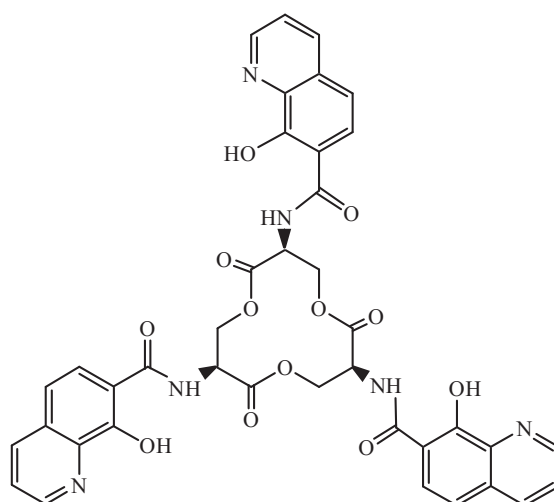


Figure 104 : oxinobactine.

L'étude du complexe Oxinobactine/Fe³⁺ a été effectuée dans MeOH pur pour des raisons de très faible solubilité du ligand.

Une étude complète des équilibres de complexation Fer-Oxinobactine n'a pas pu être réalisée dans le temps imparti à ce travail de thèse. Nous présentons

une caractérisation spectrophotométrique UV-Visible du complexe ferrique et sa comparaison avec celui de l'Entérobactine.

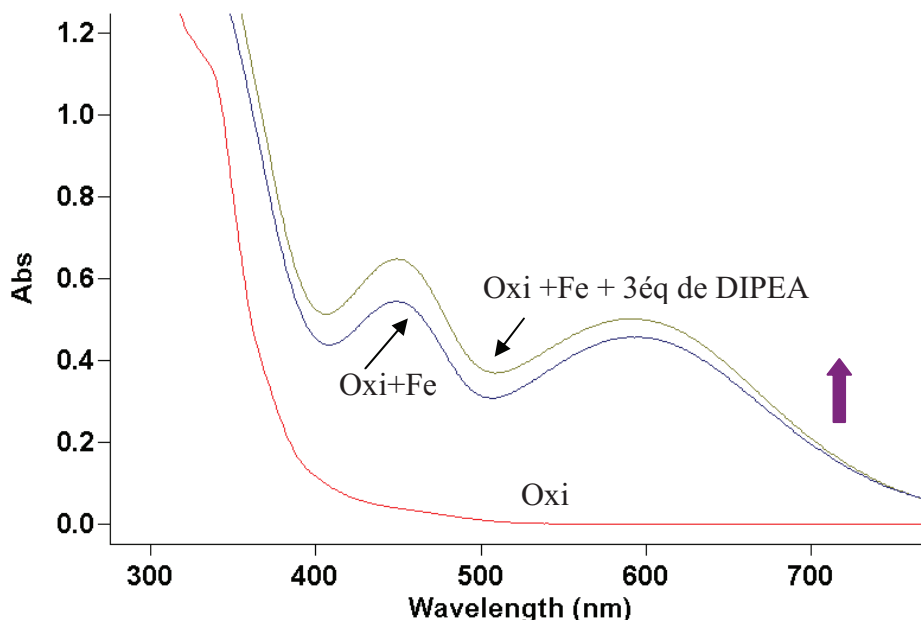


Figure 105 : Spectres UV visible du complexe Oxinobactine/Fe en fonction du pH ;
(solution MeOH ; [Oxinobactine] = 10^{-4} M ; $[\text{Fe}^{3+}] = 0,98 \cdot 10^{-4}$ M ; 3éq de DIPEA T =
20°C.

La **Figure 105** présente les spectres de l'Oxinobactine seule, l'Oxinobactine et Fe^{3+} en proportions 1/1 et avec ajout de 3 équivalents d'une base la DIPEA (diisopropyl éthyle amine) qui permet la déprotonation des hydroxyles et facilite la complexation.

On observe les bandes caractéristiques à 449 nm et 595 nm d'une coordination tris (8-hydroxyquinolinate) autour de Fe^{3+} . On peut constater que la complexation est quasiment complète dès les pH acide (pH = 3) lors de l'ajout de Fe^{3+} à la solution de ligand. L'addition de 3 équivalents de base DIPEA augmente légèrement l'absorbance. C'est un résultat conforme à ceux déjà obtenus au laboratoire montrant que les groupes 8-hydroxyquinolinate sont fortement complexants en milieu acide.

Les caractéristiques spectrales sont les suivantes :

Oxinobactine /Fe³⁺ $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 449 \text{ nm}$.

$\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$.

Ces valeurs ont été comparée au complexe ferrique du ligand O-TRENSEX étudié précédemment au laboratoire. C'est un ligand de type tripode tris(8-hydroxyquinoléines) construit sur un espaceur triéthylamine et jonctions amide (voir **figure 106**).

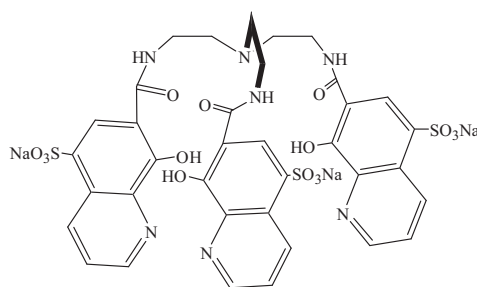


Figure 106 : O-TRENSEX.

Pour le complexe Fe/O-Trensox dans le MeOH : les caractéristiques spectrales sont $\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ nm}$ et $\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 605 \text{ nm}$. Le complexe Oxinobactine/Fe³⁺ présente donc des caractéristiques spectrales proches.

Pour évaluer la capacité de complexation de l'Oxinobactine, nous avons étudié la compétition de ce ligand avec l'Entérobactine vis-à-vis de Fe³⁺ par spectrophotométrie UV-Visible. Les résultats sont présentés dans les **Figures 107 et 108**. La compétition a été étudiée dans les deux sens, c'est-à-dire Entérobactine + complexe Oxinobactine-fer et Oxinobactine + complexe Entérobactine-fer. Nous avons également examiné l'effet de l'ajout de 3 équivalents de base DIPEA.

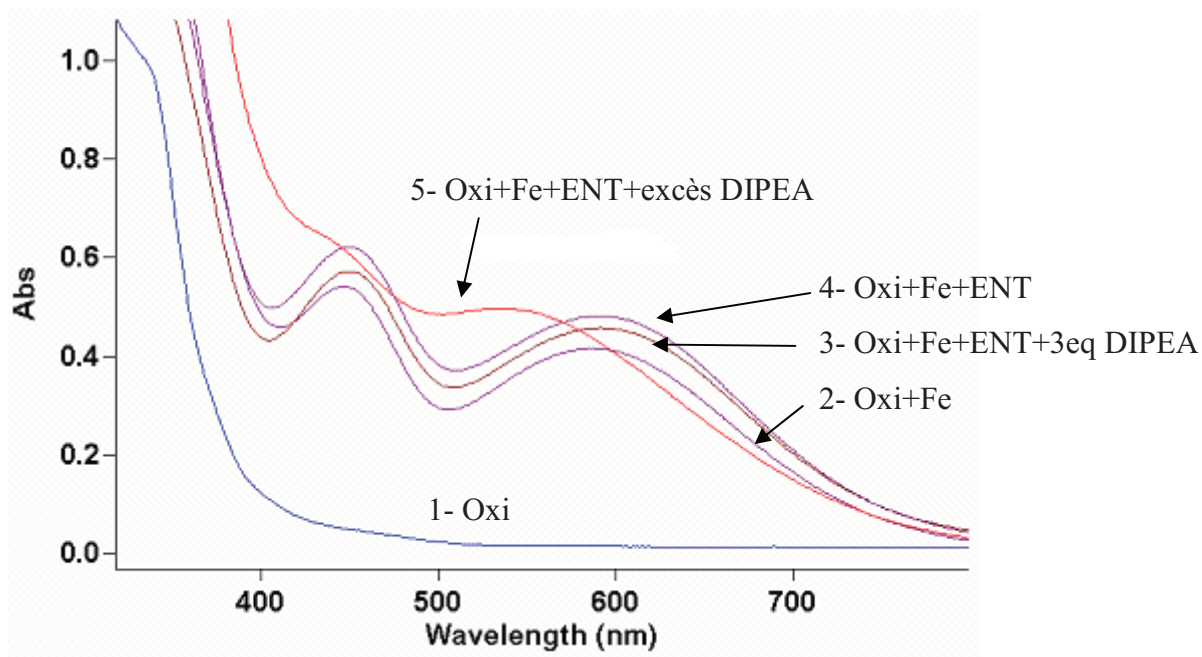


Figure 107 : Spectres UV visible du mélange Oxi-Fe + ENT; (solution MeOH ; [Oxinobactine] = $1,2 \cdot 10^{-4}$ M ; $[\text{Fe}^{3+}] = 0,98 \cdot 10^{-4}$ M ; [ENT] = $1,1 \cdot 10^{-4}$ M ; et avec ajout de 3éq de DIPEA T = 20°C.

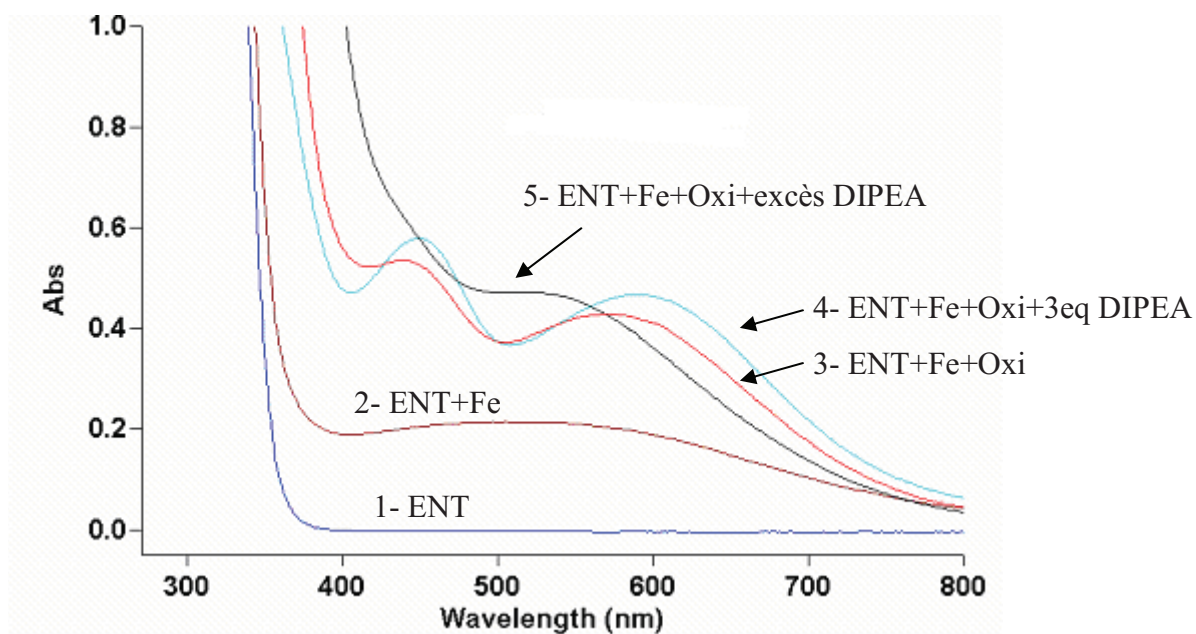


Figure 108 : Spectres UV visible du mélange ENT-Fe + Oxi ; (solution MeOH ; [ENT] = $1,4 \cdot 10^{-4}$ M ; $[\text{Fe}^{3+}] = 0,98 \cdot 10^{-4}$ M ; [Oxinobactine] = $1,2 \cdot 10^{-4}$ M ; et avec ajout de 3éq de DIPEA T = 20°C.

L'ajout d'un équivalent d'Entérobactine au complexe Oxinobactine-fer ne conduit pas à une modification de spectre (**Figure 107** spectre 4), montrant que l'Oxinobactine est plus fort complexant en milieu acide (pH ~ 3) et ce jusqu'à pH ~ 5 après ajout de 3 équivalents de DIPEA. Il faut ajouter un excès de base et amener le pH à environ 9 pour observer un changement de spectre. La bande obtenue centrée sur 546 nm est intermédiaire entre celle du complexe Oxinobactine-fer et celle du complexe Entérobactine-fer. Cela suggère un transfert *partiel* du fer vers l'Entérobactine conduisant à un mélange des deux complexes.

L'ajout d'un équivalent d'Oxinobactine à une solution du complexe Entérobactine-fer (pH ~ 3) se traduit par l'apparition des bandes du complexe Oxinobactine-fer à 450 et 595 nm. On observe donc un déplacement total de Fe^{3+} vers l'Oxinobactine. Lorsque la base est ajoutée en excès, on observe comme précédemment la bande centrée à 546 nm. Les résultats obtenus sont donc identiques quelque soit l'ordre dans lequel les réactifs (Oxinobactine, entérobactine, fer) ont été ajoutés.

On peut donc conclure que l'Oxinobactine est meilleur complexant de Fe^{3+} que l'entérobactine en milieu acide jusqu'à légèrement acide. A pH neutre, la force de complexation de chaque ligand est à très voisine. C'est un résultat important car l'entérobactine est connu pour être le plus fort complexant du fer à pH ~ 9. Le remplacement de groupes catéchols par des groupes 8-hydroxyquinoléine donne donc un ligand de force de complexation proche de celle de l'entérobactine à pH voisin de 9. Une étude quantitative complète des équilibres de complexation Oxinobactine-fer est cependant nécessaire pour confirmer ces résultats.

CHAPITRE 4 : PARTIE EXPERIMENTALE

4.1. Généralités

4.1.1. Chromatographies

Les chromatographies analytiques sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de silice sur feuille d'aluminium Merck-60 F254. Les plaques sont révélées aux ultraviolets et au moyen d'un révélateur coloré : solution à 10% d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol.

Les chromatographies Préparatives sur couche mince ont été effectuées sur des plaques préparées au laboratoire. Une plaque de verre de 20 cm/20 cm et recouverte d'une suspension composé de 27 g de gel de silice MN Kieselgel N-HR/UV 254 et 9 g de sulfate de calcium dihydraté Fluka dans 64 ml d'eau distillée elle sont séchées à l'étuve avant l'utilisation.

Les chromatographies sur colonnes ont été réalisées sous pression d'air sur gel de silice Merck Kieselgel Geruran S160 (0.040-0.063).

4.1.2. Résonances Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à température ambiante sur les appareils suivants :

Bruker AC 200 (fréquences : 200 MHz pour ^1H).

Bruker AV 300 (fréquences : 300.12 MHz pour ^1H).

Bruker AV 300 (fréquences : 300.13 MHz pour ^1H).

Les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm, avec comme référence le TMS pour ^1H et C_6H_6 pour ^{19}F .

Les abréviations utilisées sont les suivantes :

s = singulet

d = doublet

J = constante de couplage en Hz

t = triplet

m = multiplet

4.1.3. Point de fusion

Les points de fusion ont été déterminés en tube capillaire ouverts sur appareil *Büchi B-545*, ils ne sont pas corrigés.

4.1.4. Spectre de masse

Les spectres de masse par ionisation chimique (DCI, mélange ammoniac et isobutane,) ou par la technique de l'électrospray ESI ont été enregistrés sur appareil *Polaris Q Thermo Finnigan*.

4.1.5. Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires ont été effectuées au service de micro-analyses Département de Chimie Moléculaire (DCM).

4.1.6. Rayons X

Les rayons X ont été réalisés au Département de Chimie Moléculaire (DCM) par M C Philouze et A. Durif

AADC : Acide acétylène dicarboxyli.

BuLi : Butyllithium.

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane.

DIPEA : Diisopropyléthylamine.

DMF : Diméthylformamide.

DMS : Diméthylsulfoxyde.

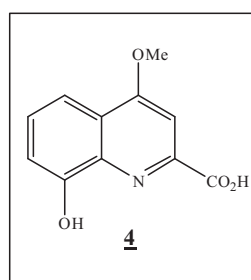
EtOH : Ethanol.

MeOH : Méthanol.

TRISPHAT : Tris catéchol phosphate.

4.2. Acide 8-hydroxy-4-méthoxy-quinoline-2-carboxylique (Quinolobactine)

4



De l'acide xanthurénique (1,02 g ; 5 mmol) est placé dans un ballon en suspension dans 5 ml de SOCl₂, le mélange est porté à reflux une nuit, jusqu'à la dissolution de l'acide. Après la distillation de SOCl₂, on ajoute 10 ml de MeOH anhydre. On porte le mélange à reflux pendant 2h puis on évapore le solvant. Le solide obtenu est redissous dans 30 ml de MeOH anhydre, et du MeONa (1,25 g ; 23 mmol) est additionné par petites doses (réaction exothermique), le mélange est encore porté à reflux une nuit puis évaporé à sec. On obtient un résidu rouge qui contient de l'ester 3 de la quinolobactine 4 qui est directement utilisé dans l'étape suivante.

On porte à reflux le mélange en suspension de ce résidu avec 0,643 mg NaOH (16 mmol) dans 20 ml de MeOH et 5 ml d'eau pendant 30 min. Puis on verse sur un minimum de glace et une solution concentrée de HCl est additionnée jusqu'au pH = 2, un précipité apparaît progressivement. Ce solide est filtré, lavé avec de l'eau, puis séché sous vide. La quinolobactine **3** est obtenue sous forme d'un solide rouge-orange (0,910 g ; 4,15 mmol ; 85%).

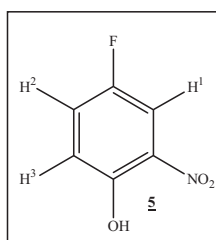
$$F = 224^{\circ}\text{C}$$

RMN ^1H (DMSO, 200 MHz) : δ 4.14 (s, 3H, O-CH₃) ; 7.22 (m, 1H, H Ar) ; 7.59 (m, 3H, H Ar).

RMN ^{13}C (DMSO, 75 MHz) : δ 57 (O-CH₃) ; 99.5, 111.6, 112.8 (CH Ar) ; 122.7 (C_q Ar) ; 129.7 (CH Ar) ; 137.5, 145.9, 154.0 et 164.1 (C_q Ar) ; 165.5 (C=O).

MS (ESI) m/z : 220 [M+H]⁺ 100%.

4.3. 4-fluoro-2-nitro -phénol **5**

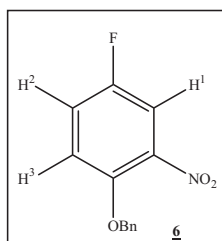


Du 4-fluoro-phénol (4,41 g ; 40 mmol) et de l'anhydride acétique (3,72 ml ; 40 mmo) sont dissous dans 80 ml de chloroforme. On refroidit la solution à 0°C, le mélange est laissé sous agitation pendant 15 min, puis 1,51 ml d'acide nitrique fumant sont additionnés goutte à goutte (40 mmol) sur le mélange. On suit la réaction par CCM (éluant : CH₂Cl₂). Après 15 min, on observe la disparition du produit de départ. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de SiO₂ (éluant : CH₂Cl₂),

on obtient le produit **5** sous forme d'un solide jaune (5.89 g ; 37.30 mmol ; 94%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 7.16 (dd, ³J_{H₂H₃} = 8.7 Hz, J_{H₂F} = 3.6 Hz, 1H, H² Ar) ; 7.25 (m, 1H, H Ar) ; 7.81 (d, 1H, ³J_{H₃H₂} = 8.7 Hz, H³ Ar) ; 10.34 (s, 1H, OH).

4.4. 1-benzyloxy-4-fluoro-2-nitro-benzène **6**



On porte à reflux un mélange du composé **5** (5.6 g ; 35,44 mmol), de chlorure de benzyle (4,6 g ; 36,54 mmol), de K₂CO₃ (5,51 g ; 39,69 mmol) et de NaI (0,24 g ; 1,75 mmol) dans 150 ml d'éthanol absolu pendant une nuit. Après l'évaporation du solvant, on ajoute 50 ml d'eau puis on extrait avec 3 volumes de CH₂Cl₂ (3x30 ml). La phase organique est séchée sur du Na₂SO₄, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. On obtient le composé **6** sous forme d'un solide jaune après la purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂) (7,63 g ; 31 mmol ; 87%).

F = 45°C.

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 5.21 (s, 2H, CH₂) ; 7.05 (dd, ³J_{H₁H₂} = 9.2 Hz, J_{H₁F} = 4.4 Hz, 1H, H¹ Ar) ; 7.16-7.43 (m, 6H, H² + H Bn) ; 7.63 (dd, ³J_{H₃H₂} = 7.8 Hz, J_{H₃F} = 3 Hz, 1H, H³ Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 72.3 (CH₂-Ph) ; 113 (²J_{CH-CF} = 27.5 Hz, CH Ar) ; 117.3 (³J_{CH} = 7.5 Hz, CH Ar) ; 121.1 (²J_{CH-CF} = 22.7 Hz, CH Ar) ;

127.4, 128.7, 129.1 ($\underline{\text{C}}\text{H Bn}$) ; 135.7, 156.2, 148.8 ($\underline{\text{C}}\text{q}$) ; 155.8 ($^1J_{\underline{\text{C}}\text{F}} = 243 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{q-F Ar}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) : δ -121.39 ($\underline{\text{C-F}}$).

MS (DCI , $\text{NH}_3/\text{isobutane}$) m/z : 265 [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$ 100%.

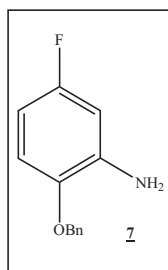
IR (KBr) cm^{-1} : 3024 (νCH_2) ; 991 ($\nu\text{C-O-}$) ; 690 ($\nu\text{C-F}$).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 63.16 ; % H = 4.08 ; % N = 5.67.

Trouvée : % C = 62.92 ; % H = 4.14 ; % N = 5.79.

4.5. 2-benzyloxy-4-fluoro-2-aniline 7



Le produit 6 (7,41 g ; 30 mmol) est dissout dans 200 ml de MeOH, à 0°C. On ajoute du SnCl_2 (24 g ; 126,98 mmol) et 80 ml d'une solution concentrée de HCl. Le mélange est laissé une nuit sous agitation. Après évaporation à sec du solvant sous pression réduite, 200 ml de l'eau sont additionnés, puis on extrait par 3 volumes de CH_2Cl_2 (3x30 ml), la phase organique est séchée par du Na_2SO_4 . Une huile rouge est obtenue après l'évaporation du solvant ; c'est le produit 7 (5,971 g ; 27,5 mmol ; 91%) qui est suffisamment pur pour être utilisé dans l'étape suivante.

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ 5.01 (s , 2H, CH_2) ; 6.33-6.46 (m, 2H, H Ar) ; 6.76 (dd, $^3J = 8.9 \text{ Hz}$, $^4J = 5.2 \text{ Hz}$, 1H, H Ar) ; 7.34-7.41 (m, 5H, H Bn).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 71.5 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Ph}$) ; 102.4 ($^2J_{\underline{\text{C}}\text{H-CF}} = 27.4 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$) ; 103.6 ($^2J_{\underline{\text{C}}\text{H-CF}} = 23 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$) ; 113.2 ($^3J_{\underline{\text{C}}\text{H}} = 10 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$) ; 127.9,

128.5, 128.9 ($\underline{\text{C}}\text{H Bn}$) ; 137.4, 138.4, 142.9 ($\underline{\text{C}}\text{q}$) ; 158.3 ($^1J_{\underline{\text{C}}\text{F}} = 235.5 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{q-F Ar}$).

RMN¹⁹F (CDCl_3 , 188 MHz) : δ -121.79 ($\underline{\text{C-F}}$).

MS (DCI , $\text{NH}_3/\text{isobutane}$, 150°C) m/z : 218 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 100%.

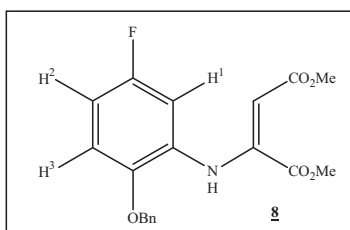
IR (KBr) cm^{-1} : 3468 (νCH_2) ; 3380 (νNH_2) ; 1210 ($\nu\text{C-O-}$) ; 691 ($\nu\text{C-F}$).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 71.88 ; % H = 5.57 ; % N = 6.45.

Trouvée : % C = 71.23 ; % H = 5.57 ; % N = 6.40.

4.6. 2-(2-benzyloxy-5-fluoro-phenylamino)-but-2-énedioate de diméthyle **8**



Le produit **7** (5,64 g ; 26 mmol) et l'acétylène dicarboxylate de diméthyle (3,69 g ; 26 mmol) sont dissous dans 60 ml de MeOH, le mélange est porté à reflux durant 3 h. Puis par évaporation du MeOH, on obtient le produit **8** après purification sur gel de silice (éluant : CH_2Cl_2) sous forme d'une huile jaune (6,5 g ; 18,10 mmol ; 70%).

RMN¹H (CDCl_3 , 300 MHz) : δ 3.72 (s, 3H, CH_3) ; 3.73 (s, 3H, CH_3) ; 5.08 (s, 2H, CH_2) ; 5.47 (s, 1H, CH) ; 6.48 (dd, 1H, $^4J_{\text{H}_2\text{H}_1} = 14.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}_2\text{F}} = 3.9 \text{ Hz}$, $\text{H}^2 \text{ Ar}$) ; 6.56 (ddd, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, $^4J = 4.5 \text{ Hz}$, 1H, H Ar) ; 6.77 (dd, $^3J_{\text{H}_3\text{H}_2} = 13.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}_3\text{F}} = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^3 \text{ Ar}$) ; 7.33-7,41 (m, 5H, H Bn) ; 9.66 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl_3 ; 75 MHz) : δ 51.6, 53.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ; 71.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$) ; 95.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C-}$) ; 107.3 ($^2J_{\underline{\text{C}}\text{H-CF}} = 26.1 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$) ; 109.7 ($^2J_{\underline{\text{C}}\text{H-CF}} = 22.7 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$) ; 114.5 ($^3J_{\underline{\text{C}}\text{H}} = 9.3 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H Ar}$) ; 127.6, 128.3, 128.8 ($\underline{\text{C}}\text{H Bn}$) ; 131.6 ($^3J_{\underline{\text{C}}\text{q}} = 10.3$

Hz, \underline{C}_q Ar) ; 136.8, 146, 147 (\underline{C}_q) ; 157.3 ($^1J_{CF} = 237.8$ Hz, \underline{C}_q -F Ar) ; 164.7, 169.7 ($\underline{C}=\text{O}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) : δ -122.56 (C-F).

MS (DCI, $\text{NH}_3/\text{isobutane}$) m/z : 360 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 100%.

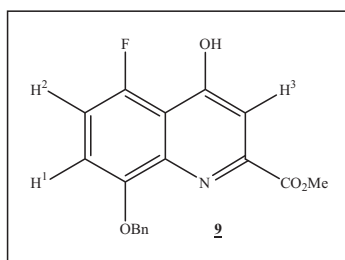
IR (KBr) cm^{-1} : 3276 (νCH_3), 2947 (νNH_2) ; 1736-1671 ($\nu\text{C}=\text{O}$) ; 1139 ($\nu\text{C}-\text{O}$) ; 783 ($\nu\text{C}-\text{F}$).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 63.51 ; % H = 5.05 ; % N = 3.90.

Trouvée : % C = 63.59 ; % H = 5.17 ; % N = 3.95.

4.7. 8-benzyloxy-5-fluoro-4-hydroxy-quinoline-2-carboxylate de méthyle 9



Le mélange du composé **8** (6 g ; 16,7 mmol) et de 70 ml de diphényle éther est chauffé jusqu'à 250°C pendant 1 h. On laisse refroidir le mélange. On ajoute 50 ml d'hexane pour obtenir un précipité, après filtration et lavage par un peu d'éther on obtient le composé **9** sous forme d'un solide beige (2,27 g ; 7 mmol ; 41%).

F = 160°C.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) : δ 4.00 (s, 3H, CH_3) ; 5.24 (s, 2H, CH_2) ; 6.86 (dd, $^3J_{H_2H_1} = 11.1$ Hz, $J_{H_2F} = 8.7$ Hz, 1H, H^2 Ar) ; 6.90 (s, 1H, H Ar) ; 7.04 (dd, 1H, $^3J_{H_1H_2} = 8.7$ Hz, $J_{H_1F} = 3.6$ Hz, H^1 Ar) ; 7.38-7.42 (m, 5H, H Bn).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 54.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ; 72 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$) ; 109.1 ($^2J_{\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CF}} = 23$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar) ; 113.4 ($^3J_{\underline{\text{C}}\text{H}} = 9.2$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar) ; 114 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar) ; 127.8, 129, 129.3

(CH Bn) ; 132.4 (Cq) ; 135.7 ($^2J_{Cq-CF} = 19.5$ Hz, Cq Ar) ; 143.5, 143.5 (Cq) ; 157.1 ($^1J_{CF} = 268.5$ Hz, Cq-F Ar) ; 163.2 (Cq) ; 178.3 (C=O).

RMN ^{19}F (CDCl₃, 188 MHz) : δ -124.08 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 328 [M+H]⁺ 100%.

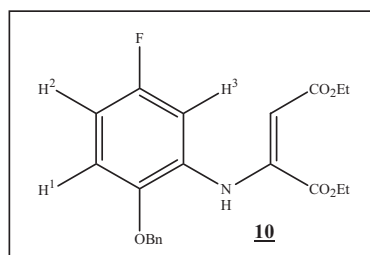
IR (KBr) cm⁻¹ : 3402 et 3380 (ν O-H libre ou associée) ; 2958 (ν CH₃) ; 1736 (ν C=O) , 1052 (ν C-O-) ; 739 (ν C-F).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 66.05 ; % H = 4.31 ; % N = 4.28.

Trouvée : % C = 65.88 ; % H = 4.24 ; % N = 4.07.

4.8. 2-(2-benzyloxy-5-fluoro-phenylamino)-but-2-énedioate de diéthyle 10



On suit le même mode opératoire adopté pour obtenir le composé 8, avec les quantités suivantes de réactifs :

Le composé 7 (3,04 g ; 14 mmol), l'oxaloacétate de diéthyle (3,36 g ; 14 mmol), 30 ml de EtOH et 30 ml de AcOH.

Le produit 10 est obtenu après purification par chromatographie sur colonne de silice (éluant : pentane/CH₂Cl₂ : 11/7, pentane/CH₂Cl₂ : 1/1, CH₂Cl₂) sous forme d'une huile orange (2 g ; 5,1 mmol ; 37%).

RMN 1H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 1.15 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃) ; 1.29 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃) ; 4.22 (q, 4H, 2CH₂) ; 5.08 (s, 2H, CH₂) ; 5.46 (s, 1H, =CH) ; 6.56 (dd, $^3J_{H_2H_1} = 6.3$ Hz, $J_{H_2F} = 3$ Hz, 1H, H² Ar) ; 6.65 (ddd, $^3J = 8.1$ Hz, $^4J = 4.5$ Hz, 1H, H Ar) ; 6.83 (dd, 1H, $^3J_{H_3H_2} = 5.8$ Hz, $J_{H_3F} = 3.4$ Hz, H³ Ar) ; 7.25-7.41 (m, 5H, H Bn) ; 9.74 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 13.8, 14.4 (CH_3) ; 60.1, 62.1, 71.6 (CH_2) ; 95.2 ($\text{CH}=\text{C}-$) ; 107.4 ($^2J_{\text{CH}-\text{CF}} = 26.4$ Hz, CH Ar) ; 109.8 ($^2J_{\text{CH}-\text{CF}} = 22.6$ Hz, CH Ar) ; 114.2 ($^3J_{\text{CH}} = 9.2$ Hz, CH Ar) ; 127.3, 128 et 128.6 (CH Bn) ; 131.5 ($^3J_{\text{Cq}} = 10.3$ Hz, Cq Ar) ; 136.6, 145.8, 147 (Cq) ; 156.3 ($^1J_{\text{CF}} = 224.8$ Hz, $\text{Cq}-\text{F}$ Ar) ; 164 et 169.2 ($\text{Cq}=\text{O}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) : δ -122.75 ($\text{C}-\text{F}$).

MS (DCI, $\text{NH}_3/\text{isobutane}$) m/z: 388 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 100%

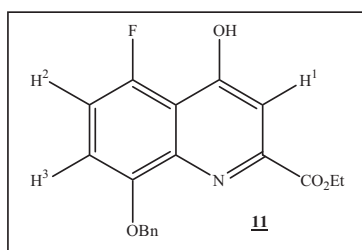
IR (ATR) cm^{-1} : 3239 ($\nu\text{CH}=\text{}$, νEt) ; 3000 (νNH) ; 1728 -1594 ($\nu\text{C}=\text{O}$) ; 1197 ($\nu\text{C}-\text{O}$) ; 735 ($\nu\text{C}-\text{F}$).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 65.11 ; % H = 5.73 ; % N = 3.62.

Trouvée : % C = 65.07 ; % H = 5.74 ; % N = 3.65.

4.9. 8-benzyloxy-5-fluoro-4-hydroxy-quinoline-2-carboxylate d'éthyle 11



On suit le même mode opératoire que pour le composé 9, avec les quantités suivantes de réactifs :

Composé 10 (620 mg ; 1.6 mmol) et 6 ml de diphenyle éther.

Après refroidissement, 50 ml d'hexane sont ajoutés. On filtre le précipité puis on le lave avec de l'éther. On obtient le composé 11 sous forme d'un solide beige (140 mg ; 0,41 mmol ; 30%).

F = 83°C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 1.46 (t, ³J = 10.8 Hz, 3H, CH₃) ; 4.51 (q, 2H, CH₂) ; 5.26 (s, 2H, CH₂) ; 6.86 (dd, ³J_{H₂H₃} = 16.2 Hz, J_{H₂F} = 6.6 Hz, 1H, H² Ar) ; 6.97 (s, 1H, H¹ Ar) ; 7.06 (dd, 1H, ³J_{H₃H₂} = 12.9 Hz, J_{H₃F} = 5.4 Hz, H³ Ar) ; 7.49 (m, 5H, Bn).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 14.3 (CH₃) ; 63.6, 71.9 (CH₂) ; 109.1 (²J_{CH-CF} = 23 Hz, CH Ar) ; 113.3 (³J_{CH} = 9.6 Hz, CH Ar) ; 113.9 (CH Ar) ; 127.5, 128.9, 129.2 (CH Bn) ; 135.7 (³J_{Cq} = 8.6 Hz, Cq Ar) ; 142.5, 143.5, 153.7 (Cq) ; 155.4 (¹J_{CF} = 197.5 Hz, Cq-F Ar) ; 162.6 (Cq) ; 206.9 (C=O).

RMN ¹⁹F : (CDCl₃, 188 MHz) : δ -124.16 (C-F)

MS : (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 342 [M+H]⁺ 100%.

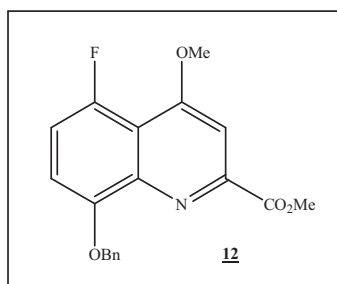
IR ATR cm⁻¹: 3386 (νNH) ; 3033 (νOH, νEt) ; 1717-1626 (νC=O) , 1245 (νC-O-) ; 695 (νC-F).

Analyse élémentaire : le composé **11** + H₂O

Calculée : % C = 64.04 ; % H = 4.24 ; % N = 3.93.

Trouvée : % C = 63.85 ; % H = 4.68 ; % N = 3.89.

4.10. 8-benzyloxy-5-fluoro-4-méthoxyquinoline-2-carboxylate de méthyle **12**



Sous argon, on place dans un ballon le composé **9** (488 mg ; 1.5 mmol), du MeI (1.2 ml ; 2 mmol) et du MeONa (0,72 g ; 1.5 mmol) dans 15 ml de MeOH sec. Le mélange est laissé sous agitation pendant 2h, le méthanol est évaporé, puis 20 ml d'eau sont ajoutés. On acidifie ensuite avec une solution d'HCl concentré jusqu'à obtenir pH = 2, un précipité apparaît progressivement.

Ce solide est filtré, lavé avec de l'eau, puis séché (393 mg). Ce solide est dissous dans 30 ml de MeOH sec avec 2 gouttes d'H₂SO₄, puis porté à reflux une nuit. Après l'évaporation de MeOH, on ajoute 20 ml du CH₂Cl₂ et on lave par 2x20 ml avec une solution saturée de NaHCO₃, la phase organique est séchée par Na₂SO₄. Après l'évaporation du solvant, le composé **12** est obtenu sous forme d'un solide jaune (100 mg, 0,23 mmol, 25%).

F = 135°C.

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 4.52 (s, 3H, CH₃) ; 4.12 (s, 3H, CH₃) ; 5.39 (s, 2H, CH₂) ; 7.00-7.04 (m, 2H, H Ar) ; 7.38 (q, 3H, H Ar) ; 7.55 (d, ³J = 12 Hz, 2H, H Ar) ; 7.65 (s, 1H, H Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 53.2 (CH₃) ; 56.4 (CH₃) ; 71.9 (CH₂) ; 101.7 (CH Ar) ; 111.4 (³J_{CH} = 8.6 Hz, CH Ar) ; 112.4 (²J_{CH-CF} = 23 Hz, CH Ar) ; 127.2, 127.8, 128.5 (CH Bn) ; 130.9, 136.7, 148.7, 153.4 (Cq) ; 151.3 (¹J_{CF} = 221.3 Hz, Cq-F Ar) ; 164.1 (Cq) ; 166 (C=O).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) : δ - 121,67 (C-F).

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z: 342 [M+H]⁺ 100%.

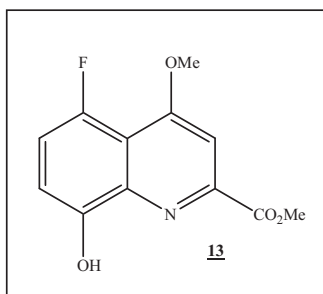
IR ATR cm⁻¹ : 3592 (νCH₃) ; 3233 (νOH) ; 2957 (νCH₃) ; 1723 (νC=O) ; 1051 (νC-O) ; 786 (νC-F).

Analyse élémentaire :

Calculée : %C = 66.86 ; %H = 4.73 ; %N = 4.11.

Trouvée : %C = 66.01 ; %H = 4.82 ; %N = 4.11.

4.11. 5-fluoro-8-hydroxy-4-méthoxyquinoline-2-carboxylate de méthyle **13**



Le composé **12** (200 mg, 0,46 mmol) est dissous dans 40 ml de MeOH, 82 mg de Pd/C à 10% sont additionnés. Le mélange est laissé sous agitation pendant 2 h sous légère pression d'hydrogène (~ 1 atm). Le mélange est filtré sur une couche d'alumine. Après l'évaporation du solvant, le composé **13** est obtenu sous forme d'un solide marron (0,289 g ; 1,15 mmol ; 96%).

F = 163°C-164°C.

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 4.06 (s, 3H, CH₃) ; 4.14 (s, 3H, CH₃) ; 7.13-7.19 (m, 2H, H Ar) ; 7.58 (s, 1H, H Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 53.4, 56.6 (CH₃) ; 106.4 (²J_{CH-CF} = 23.4 Hz, CH Ar) ; 112 (³J_{CH} = 9.6 Hz, CH Ar) ; 117.7 (²J_{Cq-CF} = 11.4 Hz, Cq Ar) ; 119.4 (CH Ar) ; 122.8, 129.4 (CH Ar) ; 138.8, 146.8 (Cq Ar) ; 154.3 (³J_{Cq-CF} = 6.4 Hz, Cq Ar) ; 156.3 (¹J_{CF} = 212.7 Hz, Cq-F Ar) ; 164.2 (Cq Ar) ; 166 (C=O).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) : δ -123.90 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 252 [M+H]⁺ 100%

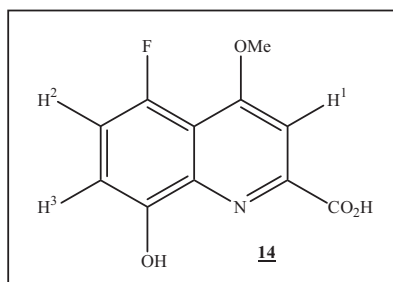
IR (ATR) cm⁻¹ : 3592 (νCH₃) ; 3233 (νOH) ; 2957 (νCH₃) ; 1723 (νC=O) ; 1051 (νC-O) ; 786 (νC-F).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 57.37 ; % H = 4.01 ; % N = 5.58.

Trouvée : % C = 56.87 ; % H = 4.46 ; % N = 5.33.

4.12. Acide 5-fluoro-8-hydroxy-4-méthoxyquinoline carboxylaique 14



On porte à reflux le mélange en suspension du composé 13 (280 mg ; 1,11mmol) avec du NaOH (200 mg ; 5 mmol) dans 10 ml MeOH et 1.5 ml d'eau pendant 30 min. Puis on verse sur un minimum de glace. Une solution concentrée de HCl est alors additionnée jusqu'au pH = 2. Un précipité apparaît progressivement. Ce solide est filtré, lavé avec de l'eau, puis séché. Le composé 14 est obtenu sous forme d'un solide beige (0,173 g ; 0,72 mmol ; 65%).

F = 246 - 247°C.

RMN¹H (DMSO, 200 MHz) : δ 4.10 (s, 3H, CH₃) ; 7.15 (dd, ³J_{H₂H₃} = 8.4 Hz, J_{H₂F} = 4.4 Hz, 1H, H² Ar) ; 7.34 (dd, ³J_{H₃H₂} = 12.4 Hz, J_{H₃F} = 8.8 Hz, 1H, H³ Ar) ; 7.59 (s, 1H, H¹ Ar) ; 9.94 (s, 1H, -OH).

RMN¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 61.9 (CH₃) ; 105.3 (³J_{CH} = 7.7 Hz, CH Ar) ; 117.7 (²J_{Cq-CF} = 11.4 Hz, Cq Ar) ; 119.1 (²J_{CH-CF} = 22.6 Hz, CH Ar) ; 120.2 (CH Ar) ; 151.7, 153.7 (Cq Ar) ; 155.4 (³J_{Cq} = 5.4 Hz, Cq Ar) ; 157.03 (¹J_{CF} = 250 Hz, Cq-F Ar) ; 169.8 (Cq Ar) ; 170.4 (C=O).

RMN¹⁹F (DMSO, 188 MHz) : δ -124.65 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 238 [M+H]⁺ 100%

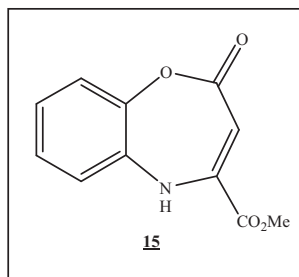
IR (ATR) cm⁻¹ : 3242 (νOH) ; 1727 (νC=O) ; 1046 (νC-O) ; 762 (νC-F).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 55,71 ; % H = 3,40 ; % N = 5,91.

Trouvée : % C = 54.83 ; % H = 3.55 ; % N = 5.79.

4.13. 6-Oxo-7-9-dihydro-5-oxa-9-aza-benzocycloheptène-8-carboxylate de méthyle 15



On introduit dans un ballon de 2-hydroxy-phénylamine (109 mg ; 1 mmol), de l'acétylène dicarboxylate de diméthyle (142 mg ; 1 mmol) et 20 ml de MeOH. On laisse le mélange sous agitation 30 min. On lave le mélange avec une solution saturée de NaHCO₃ (10 ml) et avec 20 ml d'eau et on extrait par 3x20 ml de l'éther éthylique, séché avec du Na₂SO₄, puis on laisse évaporer le solvant. On obtient le composé 15 sous forme d'un solide jaune (200 mg ; 0,932 mmol ; 91.32%).

F = 94 - 95°C.

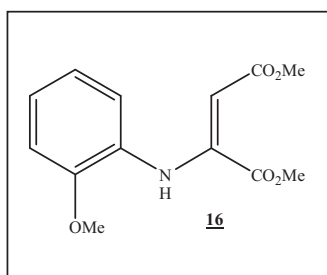
RMN¹H : (CDCl₃, 300Hz) : δ 3.79 (s, 3H, CH₃) ; 5.94 (s, 1H, CH=C) ; 7.02 (m, 2H, H Ar) ; 7.17 (t, ³J = 9 Hz, 2H, H Ar).

Essais des cyclisations avec des acides de Lewis

- A 0°C, on ajoute goutte à goutte 0,283 ml de BBr₃ (3 mmol) au mélange du composé 15 (0,219 g ; 1 mmol) et 15 ml de CH₂Cl₂ sec. Pendant 3 jours le mélange est laissé sous agitation. Le mélange est lavé par 20 ml d'une solution saturée de NaHCO₃ et 20 ml d'eau, puis extrait par (3x20 ml) d'éther éthylique. Après séchage par Na₂SO₄ et évaporation du solvant, la RMN ne montre que le produit de départ.

- Mode opératoire identique à ceci près qu'on porte le mélange à reflux une nuit, on récupère toujours le produit de départ.
- 219 mg de composé **15** et 522 mg de AlCl_3 (4 mmol) dissous dans 20 ml de CH_2Cl_2 sec sont portés à reflux pendant 4 h. Le CCM montre le produit de départ seulement.
- On place dans un ballon 219 mg du composé **15** (1 mmol), 350 mg de P_2O_5 (2,5 mmol) et 10 g de MeSO_3H (114 mmol), sous agitation une nuit. On verse sur 38 g de la glace et on extrait par (3x20 ml) de CH_2Cl_2 . On ne trouve que le produit de départ.
- A -75°C , on introduit dans un ballon 219 mg du composé **15** (1 mmol), 597 mg de trifluorométhane sulfonate de samarium (1 mmol) et 139 μl de Et_3N dans 5 ml de toluène. Après deux jours sous agitation, on lave par 185 ml d'eau et on extrait par 3x15 ml de AcOEt . On récupère toujours le produit de départ.

4.14. 2-(2-méthoxy-phénylamino)-but-2-énedioate de diméthyle ; **16**



On suit le même mode opératoire que pour le composé **8**, avec les quantités suivantes de réactifs :

Anisidine (4,186 g ; 34 mmol), acétylène dicarboxylate de diméthyle (5,31 g ; 37,4 mmol) et 100 ml de MeOH .

Après l'évaporation du MeOH , le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CH_2Cl_2), pour donner le composé **16** sous forme d'un solide jaune (6,88 g ; 25,96 mmol ; 76%).

F = 73.5°C – 74°C.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 3.63 (s, 3H, CH₃), 3.66 (s, 3H, CH₃), 3.83 (s, 3H, CH₃) ; 5.38 (s, 1H, CH=C) ; 6.75-6.87 (m, 3H, H Ar) ; 7.07 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, H Ar) ; 9.66 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 51.4, 52.9, 55.9 (CH₃) ; 93 (CH=C) ; 111.4, 120.4, 121, 124.8 (CH Ar) ; 129.8, 148.1, 150.9 (Cq Ar) ; 165.1, 170.1 (C=O).

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 266 [M+H]⁺ 100% ; 264 [M-H]⁻ 100%

IR (KBr) cm⁻¹ : 3315 (νCH₃) ; 3315 (νNH) ; 2942 (νCH=C) ; 2832 (νCH₃) ; 1726-1671 (νC=O) ; 1227 (νC-O-).

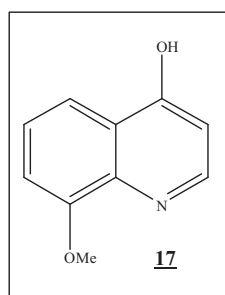
Analyse élémentaire :

Calculée : %C = 58.87 ; %H = 5.7 ; %N = 5.29.

Trouvée : %C = 58.86 ; %H = 5.8 ; %N = 5.29.

Modes opératoires des essais de cyclisation du composé 16 avec des acides de Lewis

• **8-Méthoxy-quinoline-4-ol : 17**



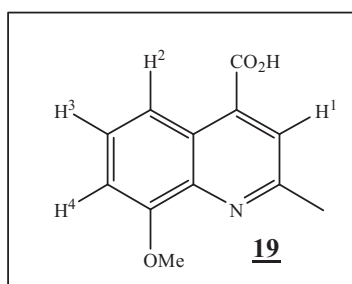
Une quantité de 1,06 g du composé 16 (4 mmol) est dissoute dans 60 ml de CH₂Cl₂ sec. A 0°C, on ajoute goutte à goutte 1,13 ml de BBr₃ (12 mmol) et on laisse le mélange sous agitation une nuit. On ajoute 2ml du H₂O, puis on laisse évaporer des solvants. On ajoute 20 ml d'eau et on acidifie avec une solution concentrée de HCl jusqu'au pH = 6. On obtient le composé 17 par la filtration sous forme d'un solide orange (200 mg ; 1,14 mmol ; 29%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 3.80 (s, 3H, CH₃) ; 6.77 (m, 4H, H Ar).

MS (DCI, NH₃/*isobutane*) m/z : 234 [M + *isobutane*]⁺.

- On place dans un ballon 265 mg du composé **16** (1 mmol) dans 15 ml de CH₂Cl₂. A 0°C, on ajoute 1,19 g de trifluorométhane sulfonate de samarium (2 mmol). Après 45 min, la CCM ne montre que le produit de départ. On porte le mélange à reflux 3 jours, la CCM montre des traces du composé **17**. Après la purification par chromatographie sur colonne de gel de silice on obtient 3% du composé **17** (20 mg ; 0,11 mmol).
- On ajoute au mélange de 465 mg du composé **16** (1,75 mmol) dans 10 ml de toluène 638 mg de ZnI₂ (2 mmol) et 625 mg de Me₂SBBBr₃ (2 mmol) à -75°C, puis on laisse sous agitation une nuit. Après l'évaporation du toluène, on ajoute 10 ml de H₂O, puis on extrait par (3x10 ml) le AcOEt. On ne récupère que Produit de départ.
- On place dans un ballon 530 mg du composé **16** (2 mmol) dans 5 ml d'acide acétique, sous agitation pendant 8 h. Après l'évaporation de l'acide acétique et la purification par chromatographie sur colonne de silice, on obtient le produit de départ et l'anisidine.

4.15. Acide 8-Méthoxy-2-méthylquinoline-4-carboxylique **19**



- Sous une hotte, on place dans un ballon ouvert de l'anisidine (123 mg ; 1 mmol) et de l'acide acétylène dicarboxylique (228 mg ; 2 mmol) dans 5 ml de MeOH (ou 5 ml d'acide acétique). On laisse le mélange sous agitation pendant deux jours. Le MeOH (ou l'acide acétique) s'évapore. On ajoute alors 20 ml d'éther éthylique, le composé **19**, qui précipite au fond du ballon, est obtenu après la filtration sous forme d'un solide beige (111 mg ; 0,51 mmol ; 51%).

F = 232°C.

RMN ¹H (DMSO, 300 MHz) : δ 2.61 (s, 3H, CH₃) ; 3.92 (s, 3H, CH₃) ; 7.09 (d, ³J_{H₂H₃} = 7.8 Hz, 1H, H² Ar) ; 7.38 (t, ³J_{H₃H₄} = 15 Hz, 1H, H³ Ar) ; 7.43 (s, 1H, H¹ Ar) ; 8.06 (d, ³J_{H₄H₃} = 8.7 Hz, 1H, H⁴ Ar).

RMN ¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 25.6, 56.3 (CH₃) ; 108.6, 119.1, 121.3 (CH Ar) ; 125.1 (Cq Ar) ; 126.1 (CH Ar) ; 140.5, 145.6, 155.4 et 157.5 (CH Ar) ; 170.3 (C=O).

MS (ESI) m/z : 218 [M+H]⁺ 100% ; 216 [M-H]⁻ 100%

IR (KBr) cm⁻¹ : 3408 (ν OH, CH₃) ; 1602 (ν C=O) ; 1025 (ν C-O-).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 66.35 ; % H = 5.10 ; % N = 6.45.

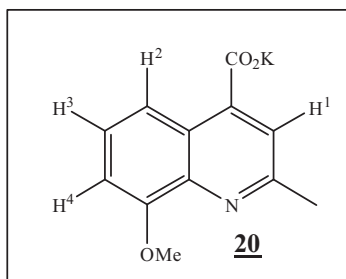
Trouvée : % C = 65.49 ; % H = 5.28 ; % N = 6.52.

- Le même produit est obtenu quand on remplace l'acide acétylène dicarboxylique par l'acide pyruvique : l'acide pyruvique (176 mg ; 2 mmol), l'anisidine (246 mg ; 2 mmol) et 10 ml de MeOH sont placés dans un ballon. Après 4 jours, on obtient le composé **19** (130 mg ; 0.59 mmol ; 30%).
- On porte à reflux le mélange d'anisidine (123 mg ; 1 mmol) et d'acétaldéhyde (44 g ; 1 mmol) pendant 1h, puis on ajoute l'acide

pyruvique (88 g ; 1 mmol), On laisse le mélange sous agitation pendant 2 jours, on obtient le même produit **19** avec 44%.

- Avec l'acétaldéhyde et l'AADC, la réaction ne donne pas de résultat.

4.16. 8-Méthoxy-2-méthylquinoline-4-carboxylate de potassium **20**



Ce composé est obtenu suivant le mode opératoire utilisé pour le composé **19**, avec les quantités suivantes de réactifs :

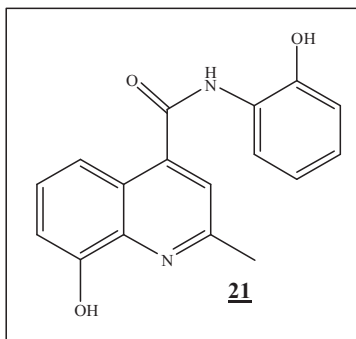
Anisidine (1,54 g ; 13,5 mmol), acide acétylène dicarboxylique mon K (2,12 g ; 13,5 mmol) et 60 ml d'acide acétique.

Après une nuit de réaction, on évapore l'acide acétique, on obtient une huile rouge, on triture cette huile par 3x20 ml d'acétone, pour éliminer le reste d'acide acétique et d'anisidine. On obtient le composé **20** après la filtration sous forme d'un solide beige (1,86 g ; 7.2 mmol ; 54%).

RMN ¹H (DMSO, 300 MHz) : δ 2.61 (s, 3H, CH₃) ; 3.92 (s, 3H, CH₃) ; 7.09 (d, ³J_{H₂H₃} = 7.8 Hz, 1H, H² Ar) , 7.38 (t, ³J_{H₃H₄} = 7.8 Hz 1H, H³ Ar); 7.43 (s, 1H, H¹ Ar) ; 8.06 (d, ³J_{H₄H₃} = 7.5 Hz, 1H, H⁴ Ar).

RMN ¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 25.6, 56.3 (CH₃) ; 108.6, 119.1, 121.3 (CH Ar) ; 125.1 (Cq Ar) ; 126.1 (CH Ar) ; 140.5, 145.6, 155.4 et 157.5 (CH Ar) ; 170.3 (C=O).

4.17. 8-hydroxyphénylamide de l'acide 8-hydroxy-2-méthylequinoline-4-carboxylique 21



De manière identique, ce composé est obtenu suivant le mode opératoire utilisé pour le composé 19, avec les quantités suivantes de réactifs :

Phénylamine (109 mg ; 1 mmol), acide acétylène dicarboxylique (114 mg ; 1 mmol) et 5 ml de MeOH (ou d'acide acétique).

On laisse 4 jours puis on évapore le MeOH (ou l'acide acétique), on ajoute 20ml d'éther éthylique. On obtient le composé 21 après filtration (29 mg ; 0,098 mmol ; 10%)

F = 255 – 256.5°C.

RMN ¹H (DMSO, 300 MHz) : δ 2.75 (s, 3H, CH₃) ; 6.87 (t, $J = 13.8$ Hz, 1H, H Ar) ; 6.94 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H Ar) ; 7.08-7.13 (m, 2H, H Ar) ; 7.43 (t, $^3J = 13.7$ Hz, 1H, H Ar) , 7.59-7.63 (m, 2H, H Ar) ; 7.77 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, H Ar).

RMN ¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 25.5 (CH₃) ; 112.2, 115.9, 116.8, 119.7, 121.3 (CH Ar) ; 124.2 (Cq Ar) ; 125.2 (CH Ar) ; 126.2 (Cq Ar) ; 126.9, 127.9 (CH Ar) ; 139.1, 143, 150.4, 153.5, 157.2 (Cq Ar) ; 166.52 (C=O).

MS (ESI) m/z : 361 [M+3Na]⁺ 100%.

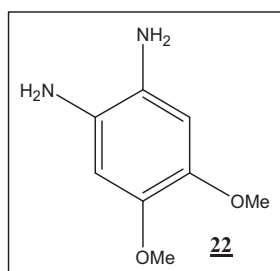
IR (KBr) cm⁻¹ : 3326 (ν NH) ; 3064 (ν OH) ; 2865 (ν CH₃) ; 1654 (ν C=O).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 69.38 ; % H = 4.79 ; % N = 9.52.

Trouvée : % C = 67.47 ; % H = 4.77 ; % N = 9.30.

4.18. 1,2- diméthoxy-4,5-diamino-benzène 22

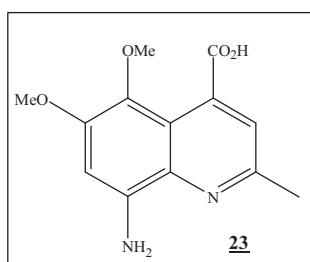


Le 1,2-diméthoxy-4,5-dinitro-benzène (2.28 g ; 10 mmol) et 560 mg de Pd/C à 10% sont mis en suspension dans 30 ml de MeOH. Le mélange est laissé agité sous légère pression d'hydrogène pendant deux jours (~ 1 atm). Après filtration du mélange sur une couche de silice puis l'évaporation de MeOH, le 1,2-diméthoxy-4,5-diaminobenzène 22 est obtenu sous forme d'un solide noir (1.60 g ; 9.52 mmol ; 95%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 3.78 (s, 6H, CH₃) ; 6.37 (s, 2H, CH Ar).

RMN ¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 57.1 (CH₃) ; 104.3 (CH Ar) ; 128.1, 143.5 (Cq Ar).

4.19. Acide 8-amino-5,6-diméthoxy-2-méthylquinoline-4-carboxylique 23



On suit le même mode opératoire que pour le composé **19**, avec les quantités suivantes de réactifs :

1,2-diméthoxy-4,5-diamine-benzène **22** (170 mg ; 1 mmol), acide acétylène dicarboxylique (1,824 g ; 12 mmol) et 15 ml de MeOH.

Après 2 jours de réaction, le composé **23**, qui précipite au fond du ballon, est obtenu par filtration sous forme d'un solide beige (136 mg ; 0,51 mmol ; 51%).

F = 214°C.

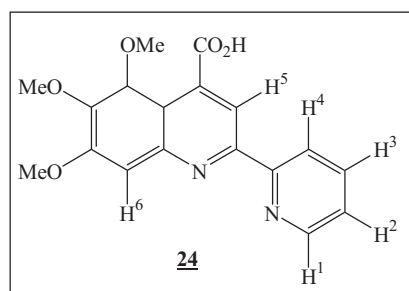
RMN ¹H (DMSO, 200 MHz) : δ 2.34 (s, 3H, CH₃) ; 3.81 (s, 6H, CH₃) ; 6.76 (s, 1H, H Ar) , 7.20 (s, 1H, H Ar).

RMN ¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 21, 56.5, 56.6 (CH₃) ; 97.8 (CH Ar) ; 110.2, 126.7 (Cq Ar) ; 127.5 (CH Ar) ; 146.4, 151.5, 155.7 (Cq Ar) ; 156.2 (C=O).

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 221 [M- CO₂]⁺ 100%.

IR (ATR) cm⁻¹ : 2916.36 (ν NH) ; 2829.30 (ν OH) ; 1663.19 (ν C=O) ; 1253.04-1148.80 (ν C-O).

4.20. Acide 5,6,7-Triméthoxy-2-(pyridin-2-yl)-quinoline-4-carboxylique **24**



On porte à reflux le mélange de pyridine-2-carbaldéhyde (103 mg ; 1 mmol) et de 3,4,5-Triméthoxy-phenylamine (183 mg ; 1 mmol) dans 20 ml de MeOH pendant une heure. Puis on ajoute de l'acide pyruvique (129 mg ; 1,5

mmol) au mélange après refroidissement. Le mélange est laissé sous agitation pendant quatre jours à température ambiante.

Le composé **24**, qui précipite au fond de ballon, est obtenu par filtration sous forme d'un solide jaune (150 mg ; 0,44 mmol ; 44%).

F = 245°C.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 3.90 (s, 3H, CH₃) ; 3.96 (s, 3H, CH₃) ; 3.97 (s, 3H, CH₃) ; 7.29-7.31 (m, 2H, H Ar) ; 7.76 (t, ³J_{H₂H₃} = 15.3 Hz, 1H, H² Ar) ; 8.30 (s, 1H, H⁵ Ar) ; 8.46 (d, ³J_{H₄H₃} = 3.6 Hz, 1H, H⁴ Ar) , 8.63 (s, 1H, H⁶ Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 56.4, 61.3, 61.6 (CH₃) ; 105.1, 114.7, 121.7, 124.4, 137.2 (CH Ar) ; 137.7, 139.6, 142.1, 146.4, 147.2 (Cq Ar) ; 149.5 (CH Ar) ; 155.4, 156.6 (Cq Ar) ; 171.6 (C=O).

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 341 [M-H⁺] 100%.

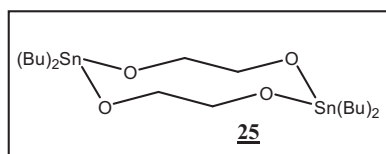
IR (ATR) cm⁻¹ : 3073 (νOH) ; 2937 (νCH₃) ; 1705 (νC=O) ; 1236 (νC-O).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 63,53 ; % H = 4.74 ; % N = 8,24.

Trouvée : % C = 63.81 ; % H = 4.85 ; % N = 8.38.

4.21. [1,3,6,8]-tétraoxa-[2,7]-distannedecane-2,7-dioxyde : Stannoxane **25**



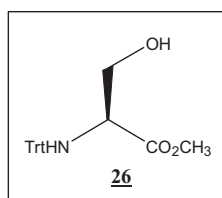
Dans un ballon équipé d'un condensateur de type Dean-Stark, on porte à reflux le mélange d'oxide de dibutylétain (100 g ; 0,4 mol) et d'éthylène glycol (25 g ; 0,4 mol) dans 500 ml de benzène pendant une nuit. Le mélange est refroidi jusqu'à 4°C à l'aide un bain de glace. Il se forme alors des cristaux.

Après filtration, lavage par 2x40 ml de benzène et séchage, on obtient le stannoxane **25** sous forme de cristaux blancs (155 g ; 0,264 mol; 66%). On obtient 10ml d'eau dans le condensateur.

$$F = 222.5 - 224^{\circ}\text{C}$$

RMN ¹H (CDCl₃, 200Hz) : δ 0.88-0.95 (m, 12H, CH₃) ; 1.30-1.42 (m, 12H, CH₂) ; 1.61-1.65 (m, 8H, CH₂) ; 3.55-3.69 (m, 8H, CH₂).

4.22. *N*- tristrityl -*L*-serinate de méthyle **26**

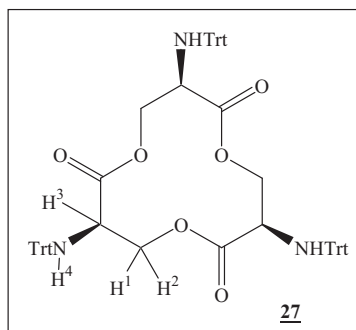


A 0°C, du chlorhydrate de *L*-sérinate de méthyle (25 g ; 160 mmol) et de la triéthylamine (66,8 ml ; 0,49 mol) sont dissous dans 250 ml de CH₂Cl₂. Puis pendant 2 h toujours, à cette même température, on rajoute par portion 50 g de chlorure de triphénylméthane (180 mmol). Le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit à température ambiante. On lave le mélange avec 3x100 ml d'acide citrique (5%), 3x100 ml d'eau et 3x100 ml d'une solution saturée de NaCl. On sèche avec du Na₂SO₄, recristallise dans un mélange : hexane-benzène. On obtient le produit **26** sous forme de cristaux beige (46 g ; 127 mmol ; 79%).

$$F = 146^{\circ}\text{C}$$

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 3.28 (s, 3H, CH₃) ; 3.57 (m, 2H, CH₂) ; 3.69 (m, 1H, H) ; 7.50 (m, 15H, H Ar).

4.23. *N,N',N''*-tristrityl-3,7,11-triamino-1,5,8-trioxa-cyclododécane-2,6,10-trione 27



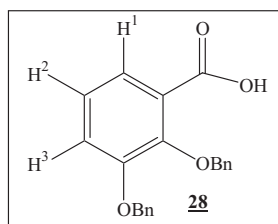
Dans un ballon équipé d'un condensateur de Dean-Stark recouvert par un tamis moléculaire (4 Å), on porte à reflux le mélange de *L*-serinate méthyle protégé 26 (45 g ; 0,124 mol) et de stannoxane 25 (12 g ; 17,8 mol) dans 250 ml de toluène pendant 3 jours. Le mélange est refroidi le solvant est évaporé. Après purification par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CH₂Cl₂) le produit 27 est obtenu sous forme d'un solide blanc (35,15 g ; 0,035 mol ; 30%).

Avec le stannoxane 25' la même procédure conduit à 75% de rendement.

F > 260°C

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 2.65 (d, $J_{H^4H^3} = 9.6$ Hz, 3H, NH) ; 3.40 (m, 6H, CH₂) ; 4.05 (t, $J_{H^3H^2} = 10.2$ Hz, 3H, CH) ; 7.45 (m, 45H, H Ar).

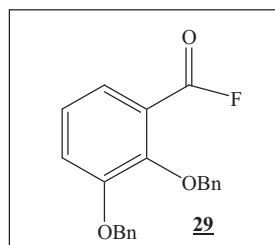
4.24. Acide 2,3-dibenzyloxy-benzoïque 28



On porte à reflux un mélange d'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (9,8 g ; 63,22 mmol), de chlorure de benzyle (25,29 g ; 208 mmol), de K_2CO_3 (53,9 g ; 0,38 mol) et de NaI (0,48 g ; 3,08 mmol) dans 300 ml de EtOH et 50 ml d'acétone pendant deux jours. Après évaporation des solvants, on rajoute 30 ml de MeOH et 50 ml d'une solution de NaOH (5 M). On porte alors le mélange à reflux pendant 3h. Après évaporation des solvants, le produit **28** est obtenu par traitement acido-basique sous forme d'un solide blanc (17 g ; 51,35 mmol ; 81%).

RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz) : δ 5.10, 5.17 (s, 4H, CH_2) ; 6.69 (t, $^3J_{H_2H_3} = 8.2$ Hz, 1H, H^2 Ar) ; 7.41-7.47 (m, 11H, H Bn) ; 7.17 (dd, $^3J_{H_1H_2} = 7.4$ Hz, $^4J_{H_1H_3} = 1.6$ Hz, 1H, H^1 Ar).

4.25. Fluorure de 2,3-bis-benzyloxy-benzoïque **29**



On dissous de l'acide 2,3-benzyloxy-benzoïque **28** (1,5 g ; 4,5 mmol) dans 20 ml de CH_2Cl_2 sec. A $0^\circ C$, on rajoute une solution constituée de fluorure de cyanurile (0,5 ml ; 2,25 mmol) et de *N,N*-diisopropyl éthyl amine (0,35 ml ; 2,25 mmol) dans 3 ml de CH_2Cl_2 sec. Le mélange est laissé sous agitation 15 min à $0^\circ C$ et 2 h à $20^\circ C$. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2), on obtient le produit **29** sous forme d'un solide beige, (1,3 g ; 4 mmol ; 86%).

F = $57^\circ C$.

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 5.13 (s, 2H, CH₂) ; 5.15 (s, 2H, CH₂) ; 7.11-7.42 (m, 13H, H Ar, Bn).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 71.8, 76.1 (CH₂) ; 121 , 124.6 , 127.9 (CH Ar) ; 128.6 , 129 (CH Bn) ; 129.2 (Cq Bn) ; 136, 137 (Cq Ar) ; 160 (¹J_{C-F} = 241.7 Hz, C=O).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) : δ 32.66 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 354 [M+NH₄⁺]⁺ 100%.

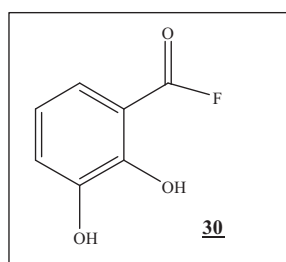
IR (ATR) cm⁻¹ : 3033 (νCH₂) ; 1808 (νCF) ; 1786 (νC=O) ; 1248 (νO-).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 74.99 ; % H = 5.10.

Trouvée : % C = 74.97 ; % H = 5.17.

4.26. Fluorure de 2,3-bis-hydroxy-benzoïque **30**



On suit le même mode opératoire que pour le composé **29**, avec les quantités suivantes de réactifs :

Acide 2,3-dihydroxy-benzoïque (1,5 g ; 4,5 mmol), fluorure de cyanuryle (0,5 ml ; 2,25 mmol), *N,N*-diisopropyl éthyl amine (0,35 ml ; 2,25 mmol) et 20 ml de CH₂Cl₂ sec.

Le solvant est évaporé sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂), on obtient le produit **30** sous forme d'un solide blanc (1,3 g ; 4 mmol ; 86%).

F= 57°C.

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ 5.82 (s, 1H, OH) ; 6.91 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H Ar) ; 7.32 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2$, Hz, 2H, H Ar) ; 10.34 (d, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, OH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 120.1 , 121.6 , 123.1 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$) ; 135.4, 136.5 ($\underline{\text{C}}\text{q Ar}$) ; 159.8 ($^1J_{\underline{\text{C}}-\text{F}} = 251.9$ Hz, $\underline{\text{C}}=\text{O}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 282.1 MHz) : δ 21.27 (C-F)

MS (DCI, $\text{NH}_3/\text{isobutane}$) m/z : 155 [$\text{M}-\text{H}^+$] 100%.

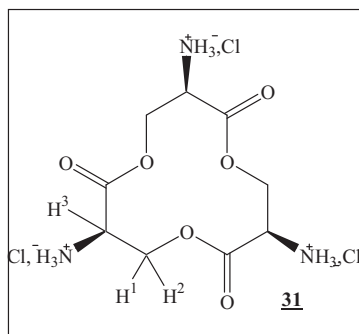
IR (ATR) cm^{-1} : 3348 (νOH) ; 1737 (νCF) ; 1696 ($\nu\text{C}=\text{O}$).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 53.86 ; % H = 3.20.

Trouvée : % C = 53.89 ; % H = 3.28.

4.27. Tri-chlorhydrate de 3,7,11-triamino-1,5,8-trioxa-cyclododécane-2,6,10-trione **31**

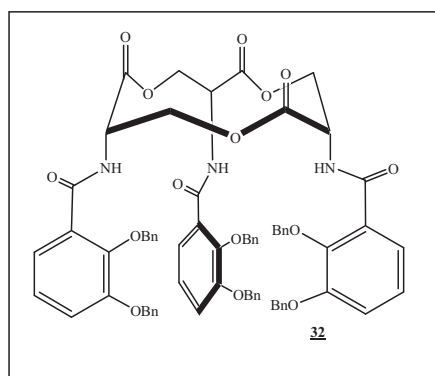


Une solution de HCl (3 éq) est préparée à partir de 3,3 mmol de CH_3COCl dans 1,5 ml de EtOH sec. On porte à reflux le mélange de trilactone **27** (1,1 g ; 1,1 mmol), la solution de HCl préalablement préparée et 22,5 ml de EtOH sec pendant 15 min. Le mélange est refroidi à l'aide un bain de glace, puis concentré de moitié. Le composé **31**, qui précipite au fond du ballon, est obtenu après filtration et lavage avec 20 ml de EtOH, 20 ml de CHCl_3 et 20 ml d'éther éthylique sous forme d'un solide beige (340 mg ; 1,02 mmol ; 93%).

F > 260°C

RMN ¹H (DMSO, 200 MHz) : δ 4.35(d, ³J_{H1H3} = 4.1 Hz, 3H, CH₂) ; 4.59 (s, 3H, CH) ; 5.13 (d, ³J_{H2H3} = 4 Hz, 3H, CH₂) ; 9.30 (m, 9H, NH).

4.28. N-[7,11-bis(2,3-dibenzyloxybenzoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxacyclododec-3-yl]2,3-dibenzyloxy benzoxylamide : L'Entérobactine benzylée
32

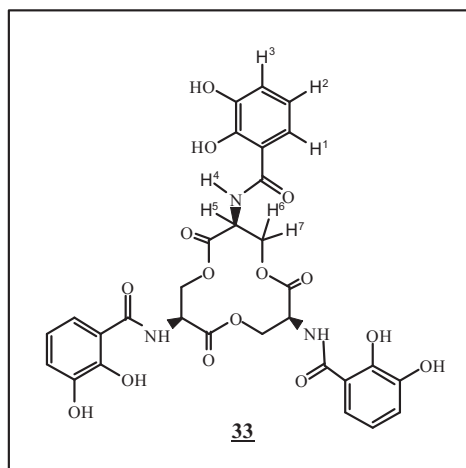


Sous argon à 0°C, on place dans un ballon la trilactone déprotégée (320 mg ; 0,96 mmol) **31** et 7 ml de CH₂Cl₂ sec. Après agitation pendant 15 min, on rajoute une solution constituée de DIPEA (0,85 ml ; 3,5 mmol) et de fluorure d'acide 2,3-dibenzyloxy-benzoïque (1,1 g ; 3,27 mmol) dans 10 ml de CH₂Cl₂ sec. On agite 15 min à cette température puis 2 h à température ambiante. L'entérobactine protégée **32** est obtenue après purification par chromatographie sur une colonne de silice (éluants : CH₂Cl₂) sous forme d'un solide blanc (0,7 g ; 0,58 mmol ; 60%).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 4.14-4.32 (m, 4H, CH₂) ; 5.06-5.12 (m, 8H, CH) ; 7.12-7.68 (m, 32H, H Bn) ; 7.66-7.68 (m, 2H, H Ar) ; 8.44 (d, ³J = 7.2 Hz, 3H, H Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 51.6 (CH) ; 64.3, 71.5 (CH₂) 117.9, 123.4, 124.4 (CH Ar) ; 126.6 (Cq Ar) ; 127.8, 128.6, 128.7, 128.8, 129 (CH Bn) ; 136.2, 136.5 (Cq Bn) ; 147.2, 151.8 (Cq Ar) ; 165.1, 169.2 (C=O).

4.29. *N*-[7,11-*bis*(2,3-dihydroxybenzoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxacyclododec-3-yl]-2,3-dihydroxy benzoxylamide : Entérobactine **33**



L'entérobactine protégée **32** (81mg ; 0,67mmol) est dissoute dans 40 ml de MeOH puis 200 mg de Pd/C à 10% sont additionnés. Le mélange est laissé sous agitation pendant trois jours sous légère pression d'hydrogène (~ 1 atm). Après filtration du mélange sur des cotons et papier filtre et évaporation du solvant, l'entérobactine **33** est obtenue sous forme de cristaux blanc (0,435 g ; 0.67 mmol ; 100 %).

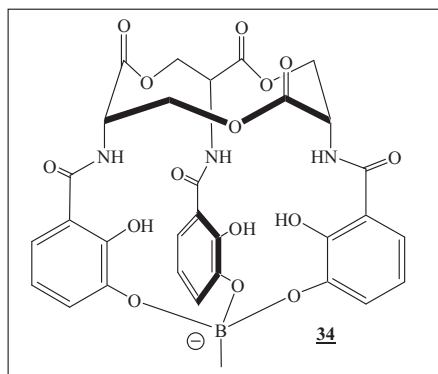
RMN ¹H (Acétone, 300 MHz) : δ 4.86-4.89 (m, 6H, CH₂) ; 5.25-5.32 (m, 3H, CH) ; 6.85 (t, ³*J*_{H₂H₁} = 7.8 Hz, 3H, H² Ar) ; 7.17 (dd, ³*J*_{H₃H₂} = 8.7 Hz, ⁴*J*_{H₃H₁} = 1.5 Hz, 3H, H³ Ar) ; 7.40 (dd, ³*J*_{H₁H₂} = 7.2 Hz, ⁴*J*_{H₁H₃} = 1.2 Hz, 3H, H¹ Ar) ; 8.60 (d, ³*J*_{H₄H₅} = 6.9 Hz, 3H, NH).

RMN ¹³C (Acétone, 75 MHz) : δ 53.6 (CH) ; 85.9 (CH₂) ; 115.6 (CH₂ Ar) ; 118.8, 120, 120.4 (CH Ar) ; 147.5, 150.6, 153.0 (C_q Ar) ; 170.2, 171.3 (C=O).

MS (ESI) *m/z* : 668 [M-H]⁻ 100%.

[α]_d = +92.59

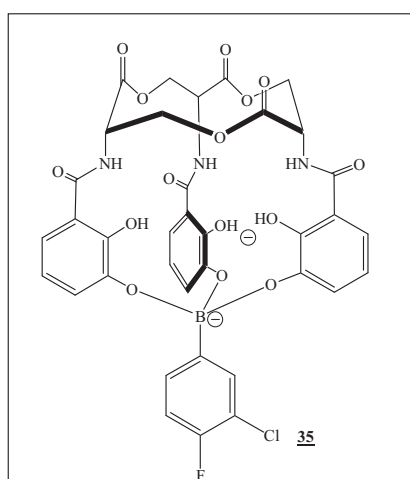
4.30. Couplage entre l'acide méthylboronique et l'Entérobactine 34



Le mélange d'Entérobactine 33 (10 mg ; 0,014 mmol) et d'acide méthyl boronique (2 mg ; 0.028 mmol) dans 2 ml de toluène est laissé sous agitation à 100°C pendant une nuit. Après évaporation du toluène, l'ester boronique 34 est obtenu sous forme de solide blanc.

MS (ESI) m/z : 692 [M-H]⁻ 100%.

4.31. Couplage entre l'acide 4-fluoro 3-chlorophénylboronique et l'Entérobactine



On suit le même mode opératoire que pour le composé 34, avec les quantités suivantes de réactifs :

Entérobactine **33** (50 mg ; 0.074 mmol), acide 4-fluoro-3-chlorophényl boronique (15 mg ; 0.074 mmol) et 10 ml de toluène et 1 ml de l'acétone.

L'ester **35** est obtenu après l'évaporation des solvants.

RMN¹⁹F (CDCl₃, 282.1 MHz) : δ -116.44 (C-F)

MS (ESI) m/z : 806 [M-H]⁻ 100%.

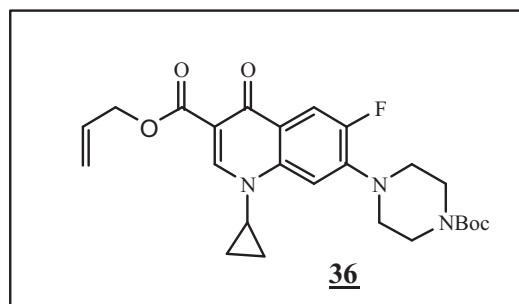
IR (ATR) cm⁻¹ : 3344 (ν CH, ν CH₂, ν CH₃) ; 2924 (ν OH) ; 1744 (ν C=O) ; 1236 (ν C-O).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 53.59 ; % H = 3.38 ; % N = 5.21.

Trouvée : % C = 53.46 ; % H = 4.32 ; % N = 4.90.

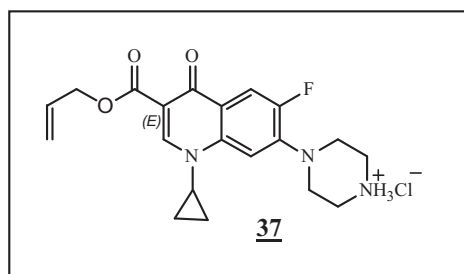
4.32. 1-cyclopropyl-1,4-dihydro-6-fluoro-4-oxo-7-(N-Boc-pipérazinyl)quinoline)-3-carboxylate d'allyle **36** ; ciprofloxacine protégée



Sous argon, on place dans un ballon de la ciprofloxacine (1 g ; 3,01 mmol), du (Boc)₂O (0,8 g 3,66 mmol) et du NaHCO₃ (1,24 g ; 14,87 mmol) dans 20 ml de DMF distillé. Après deux heures d'agitation à température ambiante, le bromure d'allyle distillé est ajouté et le mélange est laissé sous agitation pendant 24 h à T = 100°C. Le DMF est distillé sous vide puis on ajoute un mélange de 20 ml de CHCl₃ et 10 ml de CH₂Cl₂ et on lave par 2x20 ml d'eau et 20 ml d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est alors séchée par du Na₂SO₄. Après évaporation des solvants, le composé **36** est obtenu sous forme d'un solide beige (1,4 g ; 3 mmol ; 99%).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 1.06-1.35 (m, 4H, CH₂) ; 1.49 (s, 10H, CH) ; 3.23-3.25 (m, 3H, CH) ; 3.63-3.68 (m, 3H, CH) ; 4.82 (d, ³J = 5.4 Hz, 2H, CH₂) ; 5.25 (dd, ³J = 10.4 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 2H, CH₂) ; 5.52-6.07 (m, 1H, CH) ; 7.27 (s, 2H, H Ar) ; 8.08 (d, ³J = 3.2 Hz, 3H, H Ar) ; 8.54 (s, 1H, H Ar).

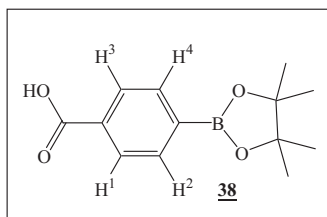
4.33. Chlorhydrate de 1-cyclopropyl-1,4-dihydro-6-fluoro-4-oxo-7-pipérazinylquinoline-3-carboxylate d'allyle 37



On ajoute goutte à goutte 5 ml de HCl concentré sur un mélange du composé 36 (1,4 g ; 3 mmol) dans 30 ml d'AcOEt. Après évaporation du solvant, le composé 37 est obtenu sous forme d'un solide jaune (1 g ; 2,8 mmol ; 93%).

RMN ¹H (CD₃OD, 200 MHz) : δ 0.92-1.15 (m, 5H, CH₂) ; 3.02 (s, 3H, CH₂) ; 3.22 (dd, ³J = 10.6 Hz, ⁴J = 2.9 Hz, 7H, CH₂) ; 4.6 (s, 2H, CH₂) ; 5.11 (dd, ³J = 16.0 Hz, ⁴J = 10.2 Hz, 2H, CH₂) ; 5.74-5.83 (m, 1H, CH) ; 7.32 (d, ³J = 3.6 Hz, 1H, H Ar) ; 7.67 (d, ³J = 6.7 Hz, 1H, H Ar) ; 8.46 (s, 1H, H Ar).

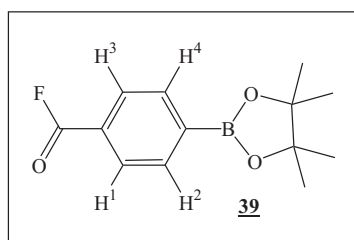
4.34. Acide 4-(4,4,5,5-tétraméthyl-[1,3]-dioxo-2-borolan-2-yl)-benzoïque 38



On porte à reflux le mélange d'acide 4-boronique benzoïque (1 g ; 6,06 mmol) et de pinacol (0,715 g ; 6,06 mmol) dans 20 ml de toluène et 20 ml de THF. On attend l'évaporation des solvants. L'addition des solvants et leur évaporation sont répétés trois fois. Le composé 38 est obtenu sous forme de solide blanc (1,42 g ; 5.9 mmol ; 96%).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 1.36 (s, 12H, CH₃) ; 7.88 (d, $^3J_{H_2H_1} = ^3J_{H_4H_3} = 8.2$ Hz, 2H, CH Ar) ; 8.12 (d, $^3J_{H_1H_2} = ^3J_{H_3H_4} = 7.8$ Hz, 2H, CH Ar).

4.35. Fluorure de 4-(4,4,5,5-tétraméthyl-[1,3]-dioxo-2-borolan-2-yl)-benzoyle 39



A 0°C et sous argon, le composé 38 (2,9 g ; 12,87 mmol) est dissous dans 20 ml de CH₂Cl₂ puis une solution constituée de DPA (2 ml ; 12,78 mmol) et de C₃F₃N₃ (1 ml ; 12,78 mmol) dans 5 ml de CH₂Cl₂ est ajoutée. Le mélange est laissé sous agitation 15 min à 0°C puis 2 h à température ambiante. Le composé 39 est obtenu sous forme d'un solide jaune (2 g ; 8 mmol ; 62%) après purification par chromatographie sur une colonne de silice (éluant : CH₂Cl₂).

F = 71°C.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 1.36 (s, 12H, CH₃) ; 7.95 (d, ³J_{H₂H₁} = ³J_{H₄H₃} = 8.1 Hz, 2H, CH Ar) ; 8.00 (d, ³J_{H₁H₂} = ³J_{H₃H₄} = 8.1 Hz, 2H, CH Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 24.8 (CH₃) ; 84.5 (Cq) ; 126.5 (Cq-F Ar) ; 130.3, 135.1 (CH Ar) ; 155.1 (Cq Ar) , 159.7 (¹J_{C-F} = 343.1 Hz, C=O).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) : δ 73.00 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 251 [M+H]⁺ 100%.

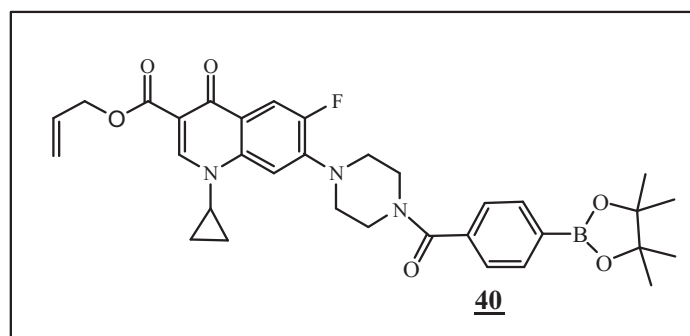
IR (ATR) cm⁻¹ : 2981 (νCH₃) ; 1797 (νC-F) ; 1617 (νC=O) ; 1351 (νC-O).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 59.03 ; % H = 6.44.

Trouvée : % C = 62,44 ; % H = 6,45.

4.36. 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-{4-[4,4,5,5-tétraméthyl-[1,3]-dioxo-2-borolan-2-yl]-benzoyl}-piperazin-1-yl}-1,4-dihydro-quinoline-carboxylate d'allyle 40



Sous argon, le composé **37** (1 g ; 2,8 mmol) est dessous dans 20 ml de CH₂Cl₂ sec à 0°C. On ajoute ensuite une solution constituée de DIPEA (0,43 ml ; 3 mmol) et de composé **39** (0,75g ; 3 mmol) dans 5 ml de CH₂Cl₂ sec. Le mélange est laissé sous agitation 15 min à 0°C puis 2h à température ambiante. Après purification par chromatographie sur une colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 9/1), le composé **40** est obtenu sous forme d'un solide beige (0,62 g ; 1,03 mmol ; 38%).

F = 60°C.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 1.12 (d, ³J = 3.9 Hz, 2H, CH₂) ; 1.13 (s, 3H, CH₂) ; 1.35 (s, 12H, CH₂) ; 2.87-3.91 (m, 8H, CH₂) ; 4.81 (d, ³J = 16.2 Hz, 2H, CH₂) ; 5.44 (dd, ³J = 14.7 Hz, ⁴J = 3.1 Hz, 2H, CH₂) ; 6.00-6.55 (m, 1H, CH) ; 7.27 (s, 1H, H Ar) ; 7.44 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, H Ar) ; 7.88 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H, H Ar) ; 7.98 (d, ³J = 6.3 Hz, 1H, H Ar) ; 8.51 (s, 1H, H Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 8.5 (CH₂) ; 25.2 (CH₃) ; 34.9 (CH) ; 65.8, 75.3, 84.5 (CH₂) ; 105.6 (CH Ar) ; 110.5 (Cq Ar) ; 113.7 (Cq -F) ; 118.6, 123.9 (Cq Ar) ; 126.6, 132.7, 135.3 (CH Ar) ; 138.1, 144.5 (Cq Ar) ; 148.7 (CH Ar), 165.7, 170.8 (C=O).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, DMSO, 282.1 MHz) : δ -124.76 (C-F)

MS (ESI) m/z : 602 [M+H]⁺ ≈ 100%, 624 [M+Na]⁺ ≈ 100%, 640 [M+K]⁺ 33%.

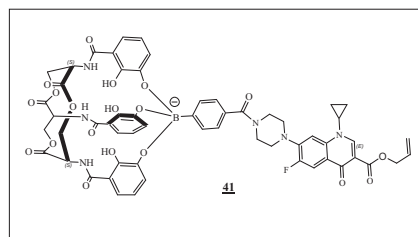
IR: (ATR) cm⁻¹ : 3434-2977 (νCH₂, νCH₃) ; 2936 (νCH₂) ; 1609 (νC=O) ; 1352-1242 (νC-O) ; 1003 (νC-F).

Analyse élémentaire : le composé **40** + H₂O

Calculée : % C = 62,98 ; % H = 6,35 ; % N = 6.78.

Trouvée : % C = 62.87 ; % H = 6.80 ; % N = 6.55.

4.37. Couplage entre le composé **40** et l'Entérobactine **33** : le composé **41**



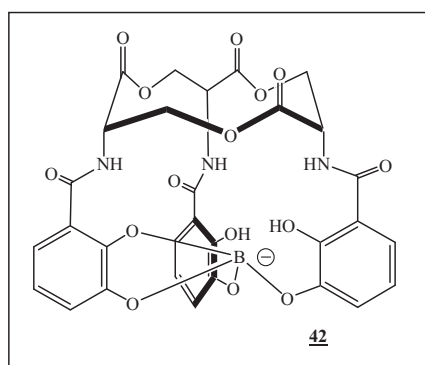
On porte à reflux un mélange d'entérobactine (20 mg 0.029 mmol) et du composé **40** (18 mg ; 0.029 mmol) dans 2 ml d'éthanol pendant 24h. Après

l'évaporation de l'éthanol, l'analyse de masse montre la présence du composé **41**.

RMN¹⁹F (CDCl₃, DMSO, 282.1 MHz) : δ -124.46 (C-F)

MS (ESI) m/z : 1151 [M-H]⁻ 30%, 668 [Ent-H]⁻.

4.38. Couplage entre le triéthylborate et l'Entérobactine **42**

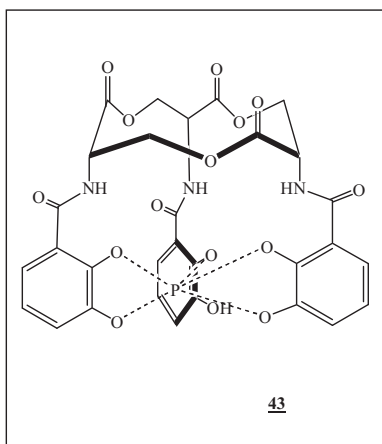


On porte à reflux un mélange d'Entérobactine **33** (20 mg 0.029 mmol), une goutte de B(OEt)₃ (excès) et une goutte d'acide acétique dans 2 ml de MeOH pendant 24h. Après évaporation des solvants, l'analyse par spectrométrie de masse montre la présence du composé **42** pratiquement pur.

MS (ESI) m/z : 675 [M-H]⁻ 100%.

4.39. Les essais de couplage de l'Entérobactine **33** avec les dérivés phosphorés

- Avec le PCl_5



On place dans un ballon de l'entérobactine **33** (10 mg ; 0,014 mmol), du PCl_5 (3,1 mg ; 0,014 mmol), de la pyridine (6 ml ; 0,075 mmol) et 5 ml de CH_2Cl_2 . Ce mélange est laissé pendant une nuit sous agitation. Le spectre de masse montre la présence de plusieurs espèces dont le complexe **43** (identifié par un pic à 697). La séparation par précipitation ou chromatographie n'est pas réalisable.

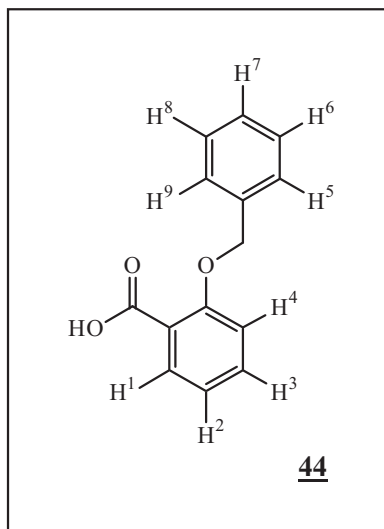
- Avec $(\text{Me}_2\text{N})_3\text{P}$

On suit le même mode opératoire que pour le composé **42**, avec les quantités suivantes de réactifs :

Entérobactine **33** (10 mg ; 0,014 mmol), $(\text{Me}_2\text{N})_3\text{P}$ (1 mg ; 0,014 mmol) et 2 ml de toluène.

Le spectre de masse montre la présence de plusieurs espèces non identifiable.

4.40. Acide 2-benzyloxy-benzoïque 44



On suit le même mode opératoire que pour le composé 28, avec les quantités suivantes de réactifs :

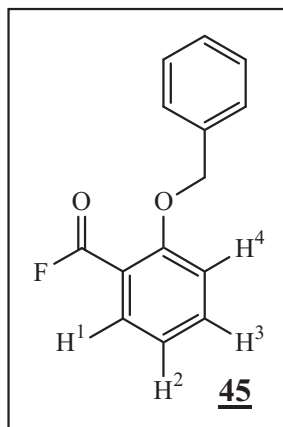
Acide salicylique (12 g ; 87 mmol), chlorure de benzyle (11 g ; 87 mmol), K_2CO_3 (30 g ; 0.27 mol) et EtOH : 180 ml.

Après évaporation du solvant, on obtient le composé 44 par recristallisation dans un mélange EtOH/acétone (20/180 ml) sous forme d'un solide blanc (19,2 g ; 85,71 mmol ; 98%).

RMN 1H (DMSO, 300 MHz) : δ 5.12 (s, 2H, CH_2) ; 6.81(t, $^3J_{H^3H^2} = 7.2$ Hz, 1H, H^3 Ar) ; 6.87 (d, $^3J_{H^4H^3} = 7.8$ Hz, 1H, H^4 Ar) ; 7.08 (t, $^3J_{H^2H^1} = 7.8$ Hz, 1H, H^2 Ar) ; 7.33 (m, 4H, H Ar, Bn) ; 7.47 (d, $^3J_{H^1H^2} = 4.8$ Hz, 2H, H^1 Bn).

RMN ^{13}C (DMSO, 75 MHz) : δ 69.9 ($\underline{CH_2}$) ; 114.1, 120.4, 127.6, 127.95 (\underline{CH} Ar) ; 127.5, 128.5, 129 (\underline{CH} Bn) ; 134 (\underline{Cq} Bn) ; 138.3, 155.1 (\underline{Cq} Ar) ; 172 ($C=O$).

4.41. Fluorure de 2-benzyloxy-benzoïque 45



On suit le même mode opératoire que pour le composé 29, avec les quantités suivantes de réactifs :

Acide 2-benzyloxy-benzoïque 44 (4 g ; 17,85 mmol), fluorure de cyanurique (1 ml ; 12,5 mmol), *N,N*-Diisopropyle ethyle amine (2 ml ; 12,5 mmol) et CH₂Cl₂ : 100 ml.

Le composé 45 est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/pentane ; 5/1) sous forme d'une huile transparente (2,56 g ; 11,13 mmol ; 62%).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 5.14 (s, 2H, CH₂) ; 6.95-7.03 (m, 2H, CH₂) ; 7.26-7.34 (m, 3H, H Ar) ; 7.47-7.54 (m, 3H, H Ar) ; 7.90 (dd, ³J_{H1H2} = 1 Hz, 1H, H¹ Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 71.6 (CH₂) ; 114.4 (CH Ar) ; 120.9 (Cq Ar) ; 121.6 (CH Ar) ; 127.6, 128.7, 129.3 (CH Bn) ; 133.6 (CH Ar) ; 136 (Cq Bn) ; 137.2 (CH Ar) ; 146 (Cq Ar) ; 159.4 (¹J_{C-F} = 287.7 ; C=O).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) : δ 31.96 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 284 [M+ isobutane]⁺ 100%.

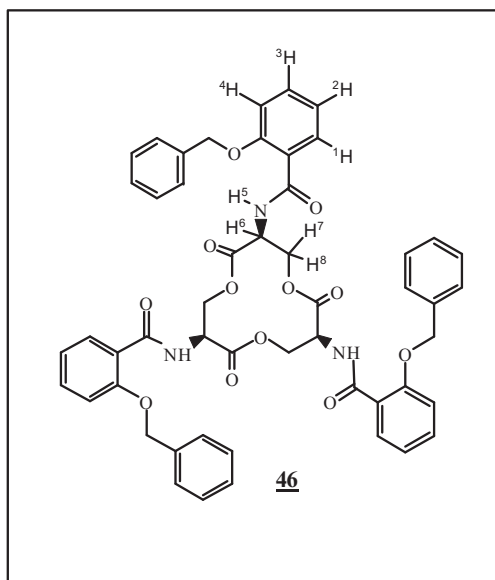
IR (ATR) cm⁻¹ : 3351 (νCH₂) ; 1744 (νCF) ; 1523 (νC=O) ; 1242 (νO-).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 73.03 ; % H = 4.83.

Trouvée : % C = 72.95 ; % H = 5.31.

4.42. *N*-[7,11-*bis*(2-benzyloxybenzoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxacyclododec-3-yl]-2-benzyloxy benzoxylamide **46**



On suit le même mode opératoire que pour le composé **32**, avec les quantités suivantes de réactifs :

Acide fluore 2-benzyloxy-benzoïque **45** (2 g, 8,69 mmol), trilactone déprotégé (0,76 g, 2,28 mmol), *N,N*-Diisopropyle ethyle amine (2 ml ; 12,5 mmol) et 100 ml de CH₂Cl₂ .

Par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ ; CH₂Cl₂/acetone, 6,5/1), on obtient le composé **46** sous forme d'un solide blanc (1,16 ; 1,30 mmol ; 57%).

F = 62°C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 4.23 (dd, ³J_{H7H8} = 7.8 Hz, ⁴J_{H7H6} = 6.9 Hz, 3H, CH₂) ; 4.37 (dd, ³J_{H8H7} = 10.8 Hz, ⁴J_{H8H6} = 4.2 Hz, 3H, CH₂) ; 4.89-5.04 (m, 3H, CH) ; 6.90 (d, ³J_{H3H2} = 7.8 Hz, 3H, H³ Ar) ; 7.059 (dd, ³J_{H4H3} = 7.8 Hz, ⁴J_{H4H2} = 1.5 Hz, 3H, H⁴ Ar) ; 7.27-7.31 (m, 14H, H Ar) ; 7.39 (ddd, ³J_{H2H3} = ³J_{H2H1} = 8.1 Hz, ⁴J_{H2H4} = 1.5 Hz, 3H, H² Ar) ; 8.16 (d, ³J_{H1H2} = 1.8 Hz, 3H, H¹ Ar) ; 8.51 (d, ³J_{H5H6} = 7.2 Hz, 3H, NH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 52.3 ($\underline{\text{CH}}$) ; 65.2, 71.6 ($\underline{\text{CH}_2}$) 113.6 ($\underline{\text{CH}}$ Ar) ; 121.3 ($\underline{\text{Cq}}$ Ar) ; 121.9 ($\underline{\text{CH}}$ Ar) ; 127.9, 128.9, 129.1 ($\underline{\text{CH}}$ Bn) ; 132.7, 133.6 ($\underline{\text{CH}}$ Ar) ; 135.9 ($\underline{\text{Cq}}$ Bn) ; 157.2 ($\underline{\text{Cq}}$ Ar) ; 165.3, 169.6 ($\underline{\text{C=O}}$).

MS (ESI) m/z : 914 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 100%.

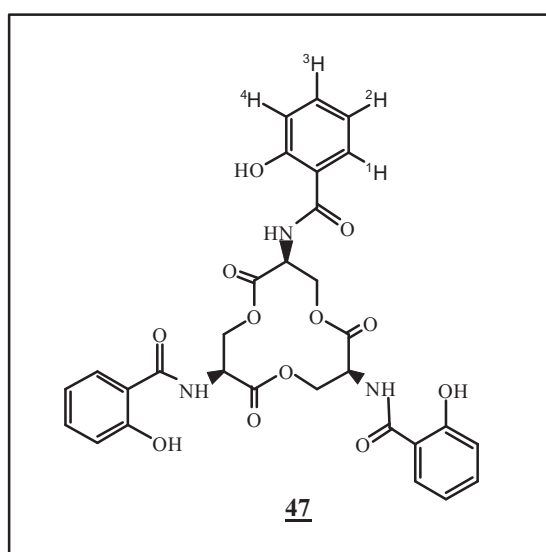
IR (ATR) cm^{-1} : 3408 (νCH_2) ; 2973 (νNH) ; 1812 ($\nu\text{C=O}$) ; 1351 ($\nu\text{O-}$).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 68.68 ; % H = 5.09 ; % N = 4.72.

Trouvée : % C = 68.39 ; % H = 5.36 ; % N = 4.80.

4.43. *N*-[7,11-bis(2-hydroxybenzoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxacyclododec-3-yl]-2-hydroxybenzoxylamide : Salibactine 47



On utilise le même mode opératoire pour le composé 33, avec les quantités suivantes de réactifs :

La Salibactine protégée 46: (0,90 g ; 1,01 mmol), Pd-C à 10% : 230 mg et 45 ml d'EtOH.

Après filtration du mélange par du coton et papier filtre et évaporation du solvant ; la Salibactine 47 est obtenue sous forme de cristaux blancs (0,61 g ; 0,98 mmol ; 97%).

F = 73°C

RMN ¹H (Acetone, 300 MHz) : δ 4.58-4.67 (m, 6H, CH₂) ; 4.90-5.04 (m, 3H, CH₂) ; 6.72 (ddd, ³J_{H₃H₂} = ³J_{H₃H₄} = 8.4 Hz, ⁴J_{H₃H₁} = 1 Hz, 3H, H³ Ar) ; 6.81 (dd, ³J_{H₄H₃} = 8.4 Hz, ⁴J_{H₄H₂} = 1 Hz, 3H, H⁴ Ar) ; 7.30 (ddd, ³J_{H₂H₃} = ³J_{H₂H₁} = 7.2 Hz, ⁴J_{H₂H₄} = 1.5 Hz, 3H, H² Ar) ; 7.68 (dd, ³J_{H₁H₂} = 7.8 Hz, ⁴J_{H₁H₃} = 1.5 Hz, 3H, H¹ Ar).

RMN ¹³C (Acetone, 75 MHz) : δ 53.5 (CH) ; 65.9 (CH₂) ; 115.6 (Cq Ar) ; 118.9, 120.2, 128.9, 135.6 (CH Ar) ; 162 (Cq Ar) ; 170.2, 170.8 (C=O).

MS (ESI) m/z : 620 [M- H⁺]⁻ 100%.

IR (ATR) cm⁻¹ : 3351 (νCH₂) ; 3055 (νOH) ; 2973 (νNH) ; 1745 (νC=O) ; 1200 (ν-O-).

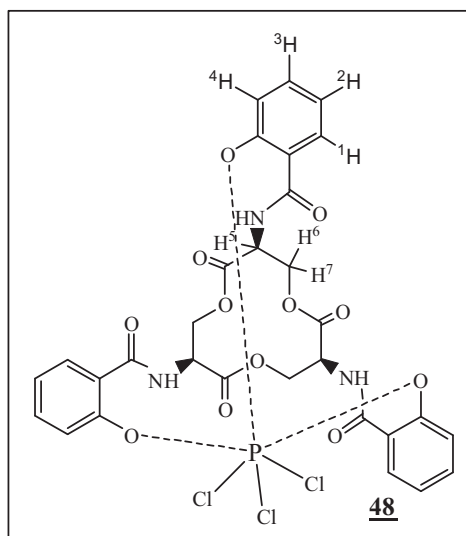
Analyse élémentaire : salybactine + H₂O

Calculée : % C = 56.34 ; % H = 4,57 ; % N = 6,57.

Trouvée : % C = 56.30 ; % H = 4.80 ; % N = 6.34.

[α]_d = +11.37.

- **Couplage avec le POCl₃ 48**



On suit le même mode opératoire que pour le composé 43, avec les quantités suivantes de réactifs :

Salybactine **47** (10 mg ; 0,014 mmol), quelque goutte de POCl₃, quelque goutte de *N,N*-diisopropyl-ethylamine et 2 ml de toluène.

Après agitation du mélange pendant trois jours, le solvant est évaporé. On extrait alors le solide avec du CHCl₃. Après évaporation du CHCl₃, le composé **48** est obtenu sous forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 4.59 (dd, ³J_{H6H7} = 11.4 Hz, ⁴J_{H6H5} = 3.6 Hz, 3H, CH₂) ; 4.80 (dd, ³J_{H7H6} = 11.4 Hz, ⁴J_{H7H5} = 3.6 Hz 3H, CH₂) ; 5.11-5.23 (m, 3H, CH) ; 6.81 (t, ³J_{H3H4} = 8.4 Hz, 3H, H³ Ar) ; 6.98 (dd, ³J_{H4H3} = 7.1 Hz, ⁴J_{H4H2} = 1 Hz, 3H, H⁴ Ar) ; 7.30 (d, ³J_{H2H1} = 7.2 Hz, 3H, H² Ar) ; 7.43 (m, 3H, H¹ Ar).

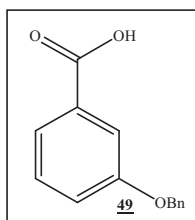
RMN ³¹P (CDCl₃, 121.2 MHz) : δ -1.7376.

MS (ESI) m/z : 752 [M- H⁺]⁻ 100%.

Après quatre jours sous agitation, on obtient le composé **48'** qui est purifié sur une colonne de gel de silice (on ne recueille qu'une quantité suffisante pour la caractérisation par spectrométrie de masse).

MS (ESI) : 682 [M-H]⁻ 100%.

4.44. Acide 3-benzyloxy-benzoïque **49**



On suit le même mode opératoire que pour le composé **28**, avec les quantités suivantes de réactifs :

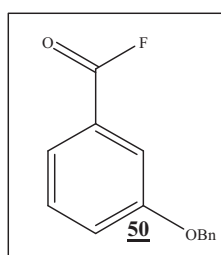
L'acide 3-hydroxy-benzoïque (2,4 g ; 18 mmol), chlorure de benzyle (4,55 g ; 36 mmol), K₂CO₃ (18 g ; 0.11 mol) et 180 ml d'EtOH.

Après évaporation du solvant, on rajoute 100 ml d'une solution de NaOH à 4 N et on porte le mélange à reflux pendant 1h. Le composé **49** est obtenu sous forme d'un solide blanc après traitement acido-basique (3,8 g ; 17 mmol ; 94%).

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 5.11 (s, 2H, CH₂) ; 7.20-7.43 (m, 6H, H Ar) ; 7.71-7.74 (m, 2H, H Ar).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 70.2 (CH₂) ; 115.5, 121.1, 122.9, 139.5 (CH Ar) ; 127.5, 128.1, 128.6 (CH Bn) ; 130.6, 136.4 (Cq Ar) ; 158.8 (Cq Bn) ; 171.7 (C=O).

4.45. Fluorure de l'acide 3-benzyloxy-benzoïque **50**



On suit le même mode opératoire que pour le composé **29**, avec les quantités suivantes de réactifs :

Acide 3- hydroxy benzoïque **49** (2,77 g ; 12,31 mmol), fluorure de cyanurile (1 ml ; 12,32 mmol), *N,N*-Diisopropyle ethyle amine (1,69 ml ; 12,32 mmol) et 50 ml de CH₂Cl₂.

Purifié sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/pentane ; 1/1), le composé **50** est obtenu sous forme de solide blanc (2,3 g ; 10,22 mmol ; 83 %).

F = 35 °C

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 5.11 (s, 2H, CH₂) ; 7.29-7.62 (m, 8H, H Ar).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 70.5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$) ; 116.8, 122.8, 124.2, 130.3 ($\underline{\text{C}}\text{H Ar}$) ; 127.7, 128.4, 128.9 ($\underline{\text{C}}\text{H Bn}$) ; 136.2 ($\underline{\text{C}}\text{q Ar}$) ; 155.1 ($\underline{\text{C}}\text{q Bn}$) ; 159.2 ($\underline{\text{C}}\text{q Ar}$) ; 159.6 ($^1J_{\underline{\text{C}}-\text{F}} = 308.7$; $\underline{\text{C}}=\text{O}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 282.1 MHz) : δ 18.68 ($\underline{\text{C}}-\text{F}$)

MS (DCI, $\text{NH}_3/\text{isobutane}$) m/z : 229 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 100%.

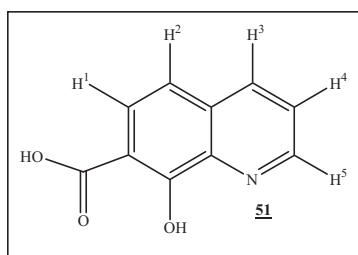
IR (ATR) cm^{-1} : 2913 (νCH_2) ; 1786 ($\nu\text{C-F}$) ; 1263 ($\nu\text{C=O}$) ; 901 ($\nu\text{-O-}$).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 73.04 ; %H = 4.82.

Trouvée : % C = 72.84 ; % H = 5.14.

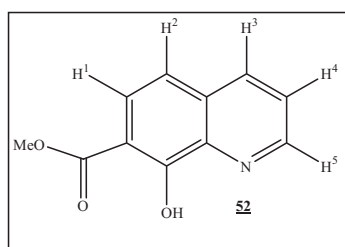
4.46. Acide 8-hydroxy quinoline-7-carboxylique 51



Dans un ballon, des pastilles de NaOH (8 g ; 0,2 mol) et 250 ml de MeOH sont introduits. Le mélange est agité jusqu'à la solubilisation puis la 8-hydroxyquinoline (29 g ; 0,2 mol) est additionnée. Après une nuit sous agitation, le solvant est éliminé par pression réduite. L'eau est ensuite éliminée sous pression réduite à 60°C pendant 2 h. La poudre séchée est introduite rapidement dans un autoclave sec puis subit pendant 5 jours une pression de CO_2 (50 bars) à 160°C. Après refroidissement, la poudre obtenue est versée dans 200 ml d'eau, la solution est filtrée puis acidifiée jusqu'au pH = 2. Suite à quoi, un précipité apparaît qui est filtré puis lavé avec de l'eau froide. Le solide beige **51** est séché au dessiccateur à 60°C (30 g ; 0,15 mol ; 79%).

RMN ¹H (DMSO, 300 MHz) : δ 7.26 (d, $^3J_{H^3H^4} = 8.5$ Hz, 1H, H³ Ar) ; 7.77 (dd, $^3J_{H^2H^1} = 8.3$ Hz, $^4J_{H^2H^3} = 4.4$ Hz, 1H, H² Ar) ; 7.92 (d, $^3J_{H^4H^5} = 8.5$ Hz, 1H, H⁴ Ar) ; 8.57 (d, $^3J_{H^5H^4} = 8.4$ Hz, 1H, H⁵ Ar) ; 8.91 (d, $^3J_{H^1H^2} = 3.3$ Hz, 1H, H¹ Ar).

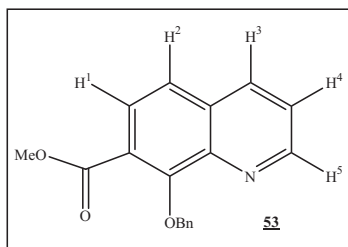
4.47. 8-hydroxyquinoline-7-carboxylate de méthyle **52**



De l'acide quinolique **51** (9 g ; 47,7 mmol), une solution de BF₃ à 50% dans le MeOH (27 ml ; 125,35 mmol) ainsi que 220 ml de MeOH sont introduits dans un ballon. Le mélange est porté à reflux pendant une nuit. Après évaporation du MeOH, le résidu est repris dans l'eau, neutralisé avec précaution par une solution de NaOH puis extrait par CH₂Cl₂ (3 x 130 ml) et séché par Na₂SO₄. Après évaporation du solvant, le composé **52** est obtenu sous forme d'un solide marron (9,5 g ; 4,6 mmol ; 97 %).

RMN ¹H (DMSO, 300 MHz) : δ 4.02 (s, 1H, CH₃) ; 7.26 (d, $^3J_{H^3H^4} = 8.9$ Hz, 1H, H³ Ar) ; 7.51 (dd, $^3J_{H^2H^1} = 8.2$ Hz, $^4J_{H^2H^3} = 4.1$ Hz, 1H, H² Ar) ; 7.87 (d, $^3J_{H^4H^5} = 8.9$ Hz, 1H, H⁴ Ar) ; 8.10 (dd, $^3J_{H^5H^4} = 8.4$ Hz, $^4J_{H^5H^3} = 1.5$ Hz, 1H, H⁵ Ar) ; 8.97 (dd, $^3J_{H^1H^2} = 4.2$ Hz, $^4J_{H^1H^3} = 1.3$ Hz, 1H, H¹ Ar).

4.48. 8-benzoxyquinoline-7-carboxylate de méthyle 53



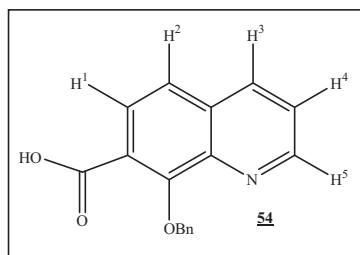
On suit le même mode opératoire que pour le composé 28, avec les quantités suivantes de réactifs :

8-hydroxyquinolinique-7- carboxylate de méthyle 52 (7,3 g ; 35,9 mmol), chlorure de benzyle (4,5 g ; 36 mmol), K_2CO_3 (10 g ; 72.46 mmol) et 180 ml de CH_3CN .

Après filtration sur papier filtre et évaporation du solvant, le composé 53 est obtenu après purification sur colonne de gel de silice ($MeOH/CH_2Cl_2$; 1/5) sous forme d'un solide rouge (10 g ; 34,12 mmol ; 95 %).

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 3.8 (s, 3H, CH_3) ; 5.54 (s, 2H, CH_2) ; 7.34 (m, 3H, H Ar) ; 7.49 (dd, $^3J_{H_2H_1} = 7.1$ Hz, $^4J_{H_2H_3} = 3.3$ Hz, 1H, H^2 Ar) ; 7.46-7.59 (m, 3H, H Ar) ; 7.82 (d, $^3J_{H_4H_5} = 8.2$ Hz, 1H, H^4 Ar) ; 8.18 (dd, $^3J_{H_5H_4} = 8.1$ Hz, $^4J_{H_5H_3} = 1.5$ Hz, 1H, H^5 Ar) ; 9.03 (dd, $^3J_{H_1H_2} = 3.9$ Hz, $^4J_{H_1H_3} = 1.5$ Hz, 1H, H^1 Ar).

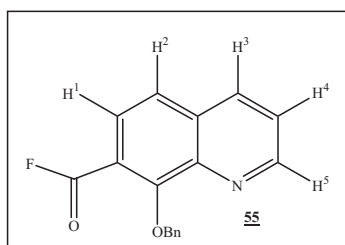
4.49. Acide 8-benzyloxy quinolinique 54



On porte à reflux le mélange du composé 53 (10 g ; 34 mmol), de K_2CO_3 (0,8 g ; 14,53 mmol) et de 200 ml de MeOH pendant 3 h. Après évaporation de MeOH, le résidu est repris dans l'eau, acidifié par une solution de HCl à 4 N puis extrait par CH_2Cl_2 (3 x 130 ml). Après lavage de la phase organique par du NaCl saturé et séchage par Na_2SO_4 . Le composé 54 est obtenu sous forme d'un solide jaune (7,8 g ; 27,9 mmol ; 82 %) après l'évaporation du solvant.

RMN¹H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 5.89 (s, 2H, CH_2) ; 7.32-7.40 (m, 5H, H Ar) ; 7.46-7.56 (m, 1H, H Ar) ; 7.59 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 3.9$ Hz, 1H, H Ar) ; 7.66 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, H Ar) ; 8.10-8.22 (m, 1H, H Ar) ; 9.03-9.12 (m, 1H, H Ar).

4.50. Fluorure de 8-benzyloxy-quinoline-7-carbonyle 55



On suit le même mode opératoire utilisé pour le composé 29, avec les quantités suivantes de réactifs :

Acide 8-benzoxy quinolinique **54** (4 g ; 14,32 mmol), fluorure de cyanurique (2,29 ml ; 14,32 mmol), *N,N*-Diisopropyle ethyle amine (3,56 ml ; 14,32 mmol) et 100 ml de CH₂Cl₂.

Le composé **55** est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/acetone ; 5/1) sous forme d'une huile rouge-orange (3 g ; 10,7 mmol ; 75%).

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 5.68 (s, 2H, CH₂) ; 7.24-7.60 (m, 7H, H Ar) ; 7.85 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, H Ar) ; 8.20 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, H Ar) ; 9.05 (s, 1H, H Ar).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 78.3 (CH₂) ; 117.8 (Cq-F) ; 123.6, 124.2, 127.64, 136.6, 150.6 (CH Ar) ; 128.6, 128.7, 129.1 (CH Bn) ; 133.5, 137.1, 143.4 (Cq Ar) ; 153.7 (Cq Bn) ; 158.3 (¹J_{C-F} = 358.5 ; C=O).

RMN¹⁹F (CDCl₃, 282.1 MHz) : δ 34.76 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 282 [M+H]⁺ 100%.

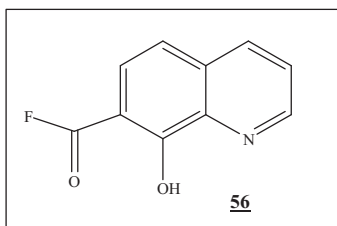
IR (ATR) cm⁻¹ : 3065 (ν CH₂) ; 1700 (ν C-F) ; 1279 (ν C=O) ; 1094 (ν -O-).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 72.60 ; % H = 4.30 ; % N = 4.98.

Trouvée : % C = 72.40 ; % H = 4.33 ; % N = 5.16.

4.51. Fluorure de 8-hydroxy-quinoline-7-carbonyle 56



On suit le même mode opératoire que pour le composé 29, avec les quantités suivantes de réactifs :

Acide 8-hydroxyquinolinique (500 mg ; 1,79 mmol), fluorure de cyanurique (0,15 ml ; 1,79 mmol), *N,N*-Diisopropylethyle amine (0,29 ml ; 1,79 mmol) et 50 ml de CH₂Cl₂

Le composé 56 est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/Acetone ; 7/1) sous forme d'une huile verte (260 mg ; 0,39 mmol ; 52%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ 7.29-7.66 (m, 1H, H Ar) ; 7.96 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H Ar) ; 8.08 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, H Ar) ; 8.34 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, H Ar) ; 8.34 (d, ³J = 5.2 Hz, 1H, H Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 124.9, 126.7, 127.4 (CH Ar) ; 133.3 (Cq Ar) ; 136.2, 152.4 (CH Ar) ; 156.2 (Cq Ar) ; 174.1 (¹J_{C-F} = 279.7 ; C=O).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 282.1 MHz) : δ -153.16 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 192 [M+ H]⁺ 100%.

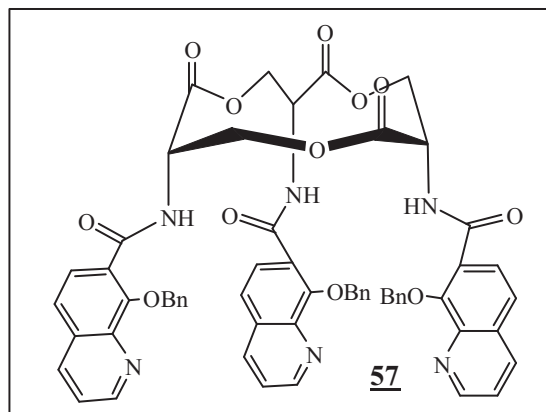
IR (ATR) cm⁻¹ : 1811 (νC-F) ; 1700 (νC=O) ; 1279 (ν-O-).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 62.83 ; % H = 3.16 ; % N = 7.33.

Trouvée : % C = 52.49 ; % H = 3.16 ; % N = 7.33.

4.52. *N*-[7,11-bis(8-benzyloxyquinoline-7-carbamoylamino)-2,6,10-trioxo-1,5,9-trioxa-cyclododec-3-yl]-8-benzyloxyquinoline-7-carbamide **57**



On utilise le même mode opératoire pour le composé **32**, avec les quantités suivantes de réactifs :

Acide fluore-2- benzyloxy quinolinique **55** (1,7 g ; 6,15 mmol), trilactone déprotégé (1,14 g, 1,14 mmol), *N,N*-Diisopropyle ethyle amine (1 ml ; 3 mmol) et CH_2Cl_2 : 50 ml.

Le composé **57** est obtenu après purification sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 ; CH_2Cl_2 /acetone, 6/1) sous forme d'un solide blanc (0,60 g ; 0,75 mmol ; 66%).

$F = 85^\circ\text{C}$.

RMN¹H (CDCl_3 , 300 MHz) : δ 4.04-4.19 (m, 6H, CH_2) ; 4.89-4.94 (m, 3H, CH) ; 5.69 (q, 6H, CH_2) ; 7.27-7.59 (m, 26H, H Ar) ; 8.16 (t, $^3J = 12.9$ Hz, 6H, H Ar) ; 8.73 (d, $^3J = 10.2$ Hz, 3H, H Ar) ; 8.99 (d, $^3J = 3.9$ Hz, 3H, H Ar).

RMN¹³C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 51.7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$) ; 64.1, 78.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$) 122.6, 123.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar) ; 124 ($\underline{\text{C}}\text{q}$ Ar) ; 127.3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar) ; 128.5, 128.7, 129 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ Bn) ; 131.8 ($\underline{\text{C}}\text{q}$ Bn) ; 136.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar) ; 136.3, 142.4 ($\underline{\text{C}}\text{q}$ Ar) ; 149.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ Ar) ; 154.3 ($\underline{\text{C}}\text{q}$ Ar) ; 165.1, 169 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$).

MS (ESI) m/z : 1045 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 100%.

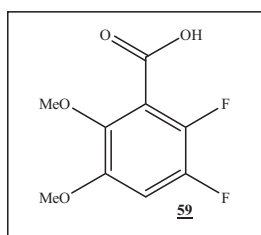
IR (ATR) cm^{-1} : 3340 (νCH_2 , CH) ; 2996 (νNH_2) ; 1624-1523 ($\nu\text{C=O}$) ; 1194 ($\nu\text{-O-}$).

Analyse élémentaire : Oxinobactine +3H₂O

Calculée : % C = 56,52 ; % H = 4,38 ; % N = 10,14.

Trouvée : % C = 56.50 ; % H = 4.41 ; % N = 9.44.

4.54. Acide 2,3-difluoro-5,6-diméthoxy-benzoïque **59**



A -78°C et sous argon, on place dans un ballon tricole de la *N,N*-diisopropyl amine (2,5 ml ; 35,7 mmol) et 100 ml de THF distillé. On ajoute du ^tBuLi (8 ml ; 17,2 mmol) goutte à goutte. Après agitation pendant 10 min, une solution, de 1,2-difluoro-4,5-diméthoxy-benzène (3 g ; 17,241 mmol) dans 5 ml de THF distillé, est ajoutée goutte à goutte. On laisse le mélange sous agitation 15 min puis 40 min sous atmosphère de CO₂. Apparaît alors un solide blanc. On laisse la température monter jusqu'à 0°C puis on ajoute 20 ml d'eau et on attend l'évaporation totale des solvants. Le composé **59** est obtenu après recristallisation dans du CH₂Cl₂/pentane sous forme d'un solide blanc (1,5 g ; 6,88 mmol ; 40%).

F = 130°C

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 3.84 (s, 3H, CH₃) ; 3.87 (s, 3H, CH₃) ; 6.80 (dd, ³J_{HF} = 12 Hz, ⁴J_{HF} = 7.5 Hz, 1H, H Ar).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 62.3 (CH₃) ; 103.1 (CH Ar) ; 121.2, 141.9, 145.2, 146.9 (C_q Ar) ; 164.3 (C=O).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) : δ -151.83, -144.62, -141.52 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 219 [M+H]⁺ 100%.

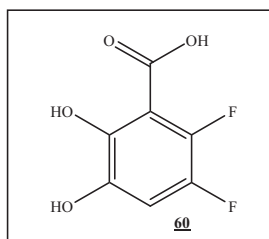
IR (KBr) cm⁻¹ : 2957-2859 (νCH₃) ; 1697 (νC=O) ; 1473-1438 (νC-O-) ; 1048 (νC-F).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 49.56 ; % H = 3.70.

Trouvée : % C = 49.87 ; % H = 3.84.

4.55. Acide 2,3-difluoro-5,6-dihydroxy-benzoïque 60



Du BBr₃ (25 ml ; 27,5 mmol) est ajouté à une solution du composé **59** (1,5 g ; 6,88 mmol) dans 10 ml de CH₂Cl₂ sec à 0°C et sous argon. Le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit. On verse le mélange dans de l'eau puis on extrait par 2x20 ml du EtOAc et on sèche par Na₂SO₄. Après évaporation du solvant, on obtient le composé **60** sous forme d'un solide jaune (700 mg ; 3,68 mmol ; 54 %).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 6.52 (dd, ³J_{HF} = 11.6 Hz, ⁴J_{HF} = 7.5 Hz, H Ar)

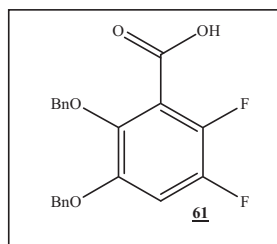
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 108.2 (CH Ar) ; 140.1, 141.5, 143.4, 144, 144.8 (Cq Ar) ; 168.5 (C=O).

RMN ¹⁹F : (CDCl₃, 188 MHz) : δ (C-F) -146.29.

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 191 [M+H]⁺ 100%.

IR (ATR) cm⁻¹ : 1678 (νCF) ;

4.56. Acide 2,3-dibenzyloxy-5,6-difluoro-benzoïque **61**



On suit le même mode opératoire que pour le composé **29**, avec les quantités suivantes de réactifs :

Composé **60** (700 mg ; 3,68 mmol), BnCl (1,8 g ; 14,72 mmol), KCO₃ (5 g ; 37.7 mmol), NaI (0,09 g ; 3.34 mmol) et EtOH : 30 ml.

Après agitation pendant une nuit, le composé **61** est obtenu après l'extraction de l'éther 3x20 ml sous forme d'un solide blanc (350 mg ; 0,94 mmol ; 26%).

F = 189 °C

RMN¹H (DMSO, 300 MHz) : δ 5.15 (s, 2H, CH₂) ; 5.27 (s, 2H, CH₂) ; 7.14 (dd, ³J_{HF} = 12.5 Hz, ⁴J_{HF} = 7.9 Hz, 1H, H Ar) ; 7.47-7.62 (m, 10H, H Bn).

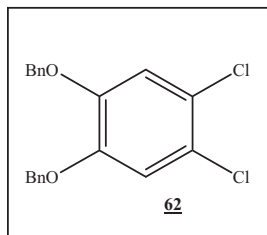
RMN¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 70.9, 75.1 (CH₂) ; 99.8 (CH Ar) ; 127.9, 128.03, 128.2, 128.5 (CH Bn) ; 132.8, 137, 138.2 (C_q Ar) ; 221.6 (C=O).

RMN¹⁹F (DMSO, 282.1 MHz), δ : -151.68, -147.33, -142.72 (C-F)

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 369 [M-H]⁻ 100%.

IR (ATR) cm⁻¹ : 3202 (νOH) ; 1741 (νCF) ; 1392 (νC-O-).

4.57. 1,2-dibenzyloxy-4,5-dichloro-benzène 62



On suit le même mode opératoire que pour le composé 29, avec les quantités suivantes de réactifs :

2,3-Dichlorocathecol (1 g ; 5,58 mmol), BnCl (2,11 ml ; 3 x 5,58 mmol), KCO₃ (10 g ; 74.3 mmol), NaI (0,048 g ; 1.3 mmol) et EtOH : 50 ml.

Après 24 heures, évaporation des solvants, on obtient un solide rouge. Ce solide est lavé par l'éthanol, puis filtré pour obtenir un solide blanc : c'est le composé 62 (1,82 g ; 5,01 mmol ; 91%).

F = 128°C

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 5.08 (s, 4H, CH₂) ; 6.97 (s, 2H, CH Ar) ; 7.37-7.41 (m, 10H, CH Bn).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 72 (CH₂) ; 116.8 (CH Ar) ; 124.5 (Cq Ar) ; 127.7, 128.5, 128.9 (CH Bn) ; 136.6, 148.6 (Cq Ar).

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 376 [M+NH₄]⁺ 100%.

IR (ATR) cm⁻¹ : 2928 -2869 (ν CH₂) ; 1194 (ν -O-C) ; 998 (ν Cl-C).

Analyse élémentaire :

Calculée : %C = 66.87 ; %H = 4.49.

Trouvée : %C = 66.63 ; %H = 4.49.

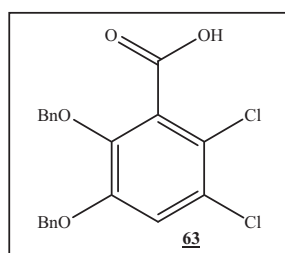
Essai de carboxylation

On suit le même mode opératoire que pour le composé 59, avec les quantités suivantes de réactifs :

Composé **62** (1,5 g ; 4,18 mmol), BuLi (5 ml ; 12 mmol), *N,N*-Diisopropyle amine (0,83 ml ; 11,5 mmol) et THF distillé : 50 ml.

Aubout de 2 heurs sous atmosphère de CO₂, deux acides qui suivent sont obtenus.

4.58. Acide 2,3-dibenzyloxy-5,6-dichloro benzoïque **63**



Après évaporation du THF, on ajoute 20 ml d'eau. On acidifie par une solution de HCl concentré, le monoacide est obtenu à pH= 7 sous forme d'un solide blanc (150 mg ; 0,37 mmol ; 9%).

F = 110°C

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 5.09 (s, 2H, CH₂) ; 5.13 (s, 2H, H Ar) ; 7.17 (s, 1H, H Ar) ; 7.32-7.45 (m, 10H, H Bn).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 63.9 (CH₂) ; 116.8 (CH Ar) ; 125.3 (Cq Ar) ; 128.4, 128.6, 128.8 (CH Bn) ; 128.4, 129.7, 131.5, 135.4, 144.8, 151 (Cq Ar) ; 167.8, 168.6 (C=O).

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 420 [M+NH₄]⁺ 70%.

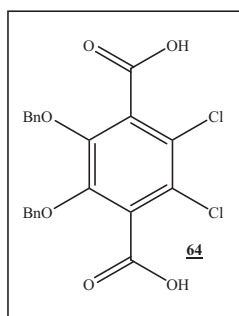
IR (ATR) cm⁻¹ : 2928-2869 (ν CH₂) ; 1701 (ν C=O) ; 1245-1195 (ν -O-C) ; 695 (ν Cl-C).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 62.55 ; % H = 4.00.

Trouvée : % C = 60.95 ; % H = 4.19.

4.59. Acide 2,3-dibenzyloxy-5,6-dichloro-1,4-dibenzoïque 64



A pH = 2, le composé 64 est obtenu sous forme d'un solide blanc (300 mg ; 0,67 mmol ; 16%).

F = 191°C

RMN¹H (DMSO, 300 MHz) : δ 5.06 (s, 4H, CH₂) ; 7.38 (s, 10H, H Bn).

RMN¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 76.8 (CH₂) ; 123.8 (Cq Ar) ; 129.1, 129.3 (CH Bn) ; 133.8 (Cq Bn) ; 136.8, 148.3 (Cq Ar) ; 165.4 (C=O).

MS (DCI, NH₃/isobutane) m/z : 445 [M-H]⁻ 100%.

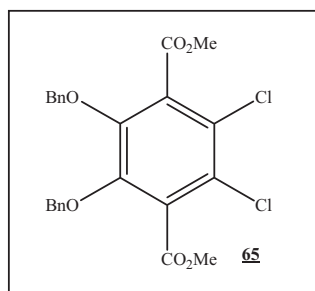
IR: (ATR) cm⁻¹ : 3035 (ν CH₂) ; 1691 (ν C=O) ; 1354 (ν -O-C) ; 1016 (ν Cl-C).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 59.08 ; % H = 3.60.

Trouvée : % C = 58.34 ; % H = 3.73.

4.60. 2,3-dibenzyloxy-5,6-dichloro-1,4-benzoate de diméthyle 65



On porte à reflux pendant une nuit le mélange, sous argon, du composé 64 (650 mg ; 1,39 mmol), de 5ml de triméthyl *ortho*-formate et d'une goutte de H₂SO₄. Après évaporation des solvants, on obtient le composé 65 sous forme d'un solide beige (650 g ; 1,37 mmol ; 99%).

F = 168°C

RMN¹H (DMSO, 300 MHz) : δ 3.95 (s, 6H, CH₃) ; 5.08 (s, 4H, CH₂) ; 7.32-7.38 (m, 10H, H Bn).

RMN¹³C (DMSO, 75 MHz) : δ 53.4 (CH₃) ; 77.8 (CH₂) ; 125.6 (Cq Ar) ; 128.8, 128.9 (CH Bn) ; 132.5 (Cq Bn) ; 136.2, 148.8 (Cq Ar) ; 164.7 (C=O).

MS (ESI) m/z : 497 [M+Na]⁺ 100%.

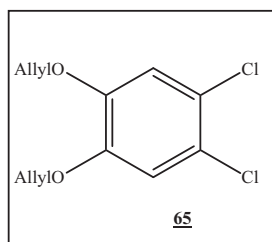
IR: (ATR) cm⁻¹ : 2958-2883 (ν CH₂) ; 1730 (ν C=O) ; 1261 (ν -O-C) ; 694 (ν Cl-C).

Analyse élémentaire :

Calculée: % C = 60.65 ; % H = 4.25.

Trouvée : % C = 60.26 ; % H = 4.26.

4.61. 1,2-diallyloxy-4,5-dichloro benzène 66



On suit le même mode opératoire que pour le composé 29, avec les quantités suivantes de réactifs :

2,3-dichlorocathecol (1 g ; 5,58 mmol), bromure d'allyl (1.6 ml ; 3 x 5,58 mmol), KCO₃ (10 g ; 74.3 mmol) et EtOH : 30 ml.

Après 24 heures, on évapore les solvants et le composé 66 est obtenu sous forme d'un solide blanc (1,44 g ; 5,61 mmol ; 100 %).

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 4.45 (d, ³J = 5.2 Hz, 4H, CH₂) ; 5.28-5.36 (m, 4H, CH₂) ; 5.99-6.93 (m, 2H, CH) ; 6.93 (s, 2H, H Ar) ;

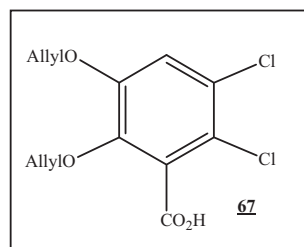
Essai de carboxylation

On suit le même mode opératoire que pour le composé 59, avec les quantités suivantes de réactifs :

Composé 66 (1,3 g ; 5,038 mmol), BuLi (4 ml ; 8 mmol), *N,N*-Diisopropyle amine (0,5 ml ; 7,14 mmol) et THF distillé : 130 ml.

On obtient aussi deux acides :

4.62. Acide 2,3-diallyloxy-5,6-dichloro benzoïque 67



Après évaporation du THF, on ajoute 20 ml d'eau et on acidifie par une solution de HCl concentré, le monoacide 67 est obtenu à pH= 7, par extraction avec 3x20 ml de CH₂Cl₂, sous forme d'une huile orange (150 mg ; 0,49 mmol ; 10%).

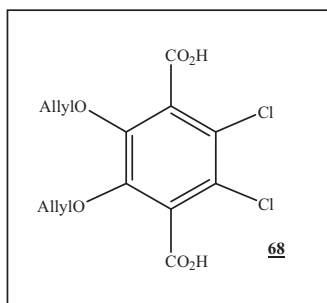
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ 4.55 (d, ³J = 4.4 Hz, 4H, CH₂) ; 5.28-5.36 (m, 4H, CH₂) ; 5.97-6.93 (m, 2H, CH) ; 6.93 (s, 1H, H Ar) ;

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ 70.4 (CH₂) ; 115.5 (CH=CH₂) ; 118.6 (CH=CH₂) ; 124.1 (C_q Ar) ; 133.5 (CH Ar) ; 148.2 (C=O).

MS (ESI) m/z : 304 [M+H]⁺ 100%.

IR: (KBr) cm⁻¹ : 2923-2866 (ν Ally) ; 1496 (ν C=O) ; 1248-1197 (ν C-O) ; 995-927 (ν C-Cl).

4.63. Acide 2,3-diallyloxy-5,6-dichloro-1,4-dibenzoïque 68



On continue l'acidification de la phase aqueuse jusqu'au pH = 2. Un précipité apparaît alors. Filtré, puis lavé avec de l'eau froide, on obtient le diacide 68 sous forme d'un solide blanc (650 mg ; 1,87 mmol ; 37%).

F = 191°C -192°C

RMN ¹H (MeOH, 300 MHz) : δ 3.32 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 4H, CH₂) ; 3.95-4.15 (m, 4H, CH₂) ; 4.70-4.79 (m, 2H, CH).

RMN ¹³C (MeOH, 75 MHz) : δ 75 (CH₂) ; 117.7 (CH=CH₂) ; 123.8 (C_q Ar) ; 133.1 (CH=CH₂) ; 133, 147.9 (C_q Ar) ; 165.6 (C=O).

MS (ESI) m/z : 345 [M-H]⁻ 30%.

IR (ATR) cm⁻¹ : 2966 (ν Ally) ; 1688 (ν C=O) ; 1190 (ν C-O) ; 680 (ν C-Cl).

Analyse élémentaire :

Calculée : % C = 48.44 ; % H = 3.4.

Trouvée : % C = 48.59 ; % H = 3.63.

CONCLUSION GENERALE

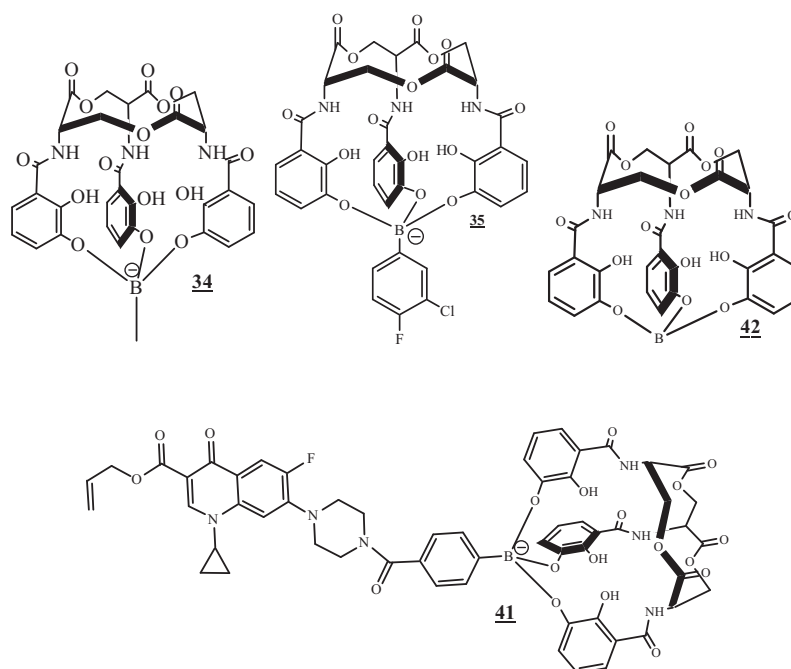
Au cours de ce travail, nous avons complété les travaux concernant la Quinolobactine. L'étude du complexe Fe/Q montre clairement la nature tridentée de ce ligand (données RX) qui forme un complexe ferrique de géométrie octaédrique très déformée. L'analyse de complexe du fer (ou gallium pris comme mime diamagnétique du fer) et de l'analogue Quinolobactine fluorée indique que seule l'espèce $[M(Q)_2]$ se forme à pH physiologique (données SM-ESI, RMN 1H et ^{19}F). En considération du faible nombre d'atomes constituant ce ligand tridenté et de sa bonne affinité pour le fer ($pFe = 18$) on peut conclure qu'il s'agit d'un sidérophore de secours efficace de *Pseudomonas*.

D'autre part, nous avons abordé la synthèse d'une nouvelle classe d'antimétabolites potentiels dérivés de l'Entérobactine fondés sur des dérivés du phosphore ou des acides boroniques. Si les résultats sont peu concluants pour la série phosphorée (la liaison du phosphore aux catéchols est incomplète), il faudra poursuivre les études en optimisant la synthèse de l'acide 5,6-dichloro-2,3-dihydroxybenzoïque. Ce dernier devant conduire à un catéchol déficient en électron plus apte à se lier au phosphore comme le montrent les travaux de Lacour.

En série borée, les résultats sont plus encourageants : les acides boroniques et boriques se conjuguent bien au catéchol via les oxygènes situés en méta. La stabilité chimique est meilleure avec des acides boroniques fortement électroattracteurs. L'intérêt de ces molécules en tant qu'antimétabolite devra être évalué sur des cultures de bactéries *E. Coli* par exemple.

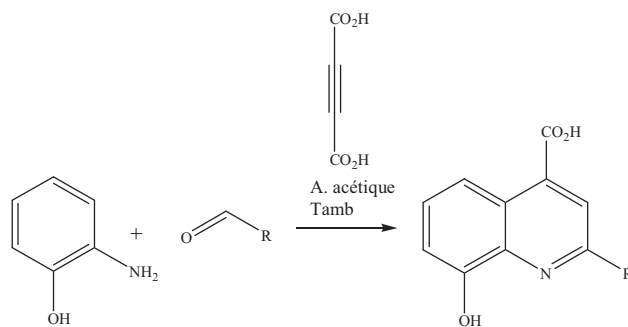
Cette capacité que montre l'Entérobactine à « chélater » le bore a été mise à profit pour créer un « cheval de Troie » antibiotique potentiel dont les essais sur culture de bactéries devront montrer l'efficacité.

Puisque de nombreux sidérophores présentent des sous unités chélatrices, cette stratégie de conjugaison pourrait être élargie afin de cibler d'autres bactéries pathogènes. Cependant le critère de stabilité des conjugués sera déterminant.

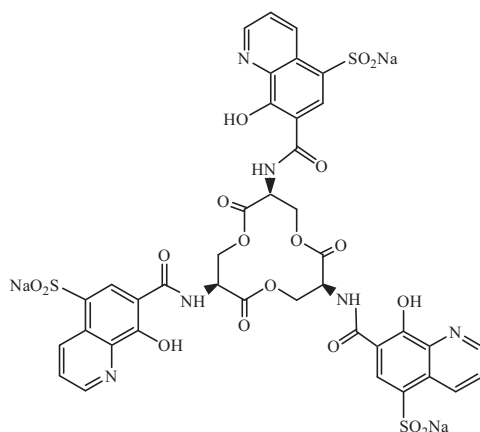


Au cours de ce travail de synthèse, nous avons découvert le rôle particulier que joue l'acide acétylène dicarboxylique dans la préparation à partir d'anilines d'acides 4-quinolinecarboxyliques substitués en position 2.

La simplicité de la mise en œuvre de cette réaction en « un pot » et de la purification aisée par filtration, rend attractif cette méthode de synthèse. L'étude sur d'autres anilines permettra de cerner les limites de cette synthèse.



Enfin, l'étude spectrophotométrique d'Oxinobactine dans le MeOH montre la forte affinité de ce ligand pour Fe^{3+} qui peut être comparable à celle de l'Entérobactine. Une perspective de synthèse pourrait être effectuée, visant à sulfoner les quinoléines, pour permettre l'augmentation de la solubilité de ce complexant en solution aqueuse, qui conduirait ensuite à réaliser des études physico-chimiques et biologiques très intéressantes.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) a- J. B. Neilands, K. Konopka, B. Schwyn, M. Coy, R. T. Francis, B. H. Paw, A. Bagg, *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*, G. Winkelmann, D. Van der Helm, J. B. Neilands, Weinheim, **1987**, 3.
b- M. Meyer, J. R. Telford, S. M. Cohen, D. J. White, J. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10093.
- 2) R. J. A. Ramirez, L. Karamanukyan, S. Ortiz, C. G. Gutierrez, *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38, 749.
- 3)a- M. Luo, H. Lin, M. A. Fischbach, D. R. Liu, C. T. Walsh, J. T. Groves, *ACS Chemical Biology*, **2006**, 1, 29.
b- C. E. Lankford, *Crit. Rev. Microbiol.*, **1973**, 2, 273.
- 4) E. R. Marinez, E. K. Salmassian, T. T. Lau, C. G. Gutierrez, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3548.
- 5) P. Thulasiraman, S. M. C. Newton, J. Xu, K. N. Raymond, C. Mai, A. Hall, M. A. Montague, P. E. Klebba, *Journal of Bacteriology*, **1998**, 180, 6689
- 6) L. D. Loomis, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 906.
- 7) M. E. Bluhm, B. P. Hay, S. S. Kim, E. A. Dertz, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 5475.
- 8) H. Hayen, D. A. Volmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 711.
- 9) A. D. Lestie, R. Daneshfar, D. A. Volmer, *Am. Soc. Mass spectrum.*, **2007**, 18, 632.
- 10) A. M. d'Hardemare, S. Torelli, G. Serratrice, J-L. Pierre, *BioMetals*, **2006**, 19, 349.
- 11) B. Van Hove, H. Staudenmaier, V. Braun, *J. Bacteriol.*, **1990**, 172, 6749.
- 12) J. R. Chipperfield, C. Ratledge, *BioMetals*, **2000**, 13, 165.
- 13) J. A Ferreras, J-S. Ryu, F. Di Lello, D. S. Tan, L. E. N Quadri., *Nature Chemical Biology*, **2005**, 1, 29.
- 14) A. A. Miles, P. L. Khimji, *J. Med. Microbiol.*, **1975**, 8, 477.
- 15) C. Klumpp, A. Burger, G. L. Mislin, M. A. Abdallah, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 15, 1721.
- 16) A. du Moulinet d'Hardemare, G. Serratrice, J-L. Pierre, *BioMetals*, **2004**, 17, 691.
- 17) M. E. Bluhm, S. S. Kim, E. A. Dertz, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2436.
- 18) E. A. Dertz, J. Xu, A. Stintz, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 22.
- 19) R. J. Bergeron, J. B. Dionis, M. J. Ingeno, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 144.

- 20) C. K. S. Chung, T. D. Jickells, D. J. Richardson, D. A. Russell, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 5040.
- 21) A. K. Duhme, R. C. Hider, M. J. Naldrett, R. N. Pau, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **1998**, 3, 520.
- 22) M. Valdebenito, A. L. Crumbliss, G. Winkelmann, K. Hantke, *International Journal of Medical Microbiology*, **2006**, 296, 513.
- 23) T. Peterson, K-E. Falk, S. A. Leong, M. P. Klein, J. B. Neilands, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 7715.
- 24) J-P. Bellenger, F. Arnaud-Neu, Z. Asfari, S. C. B. Myneni, E. I. Stiefel, A. M. L. Kraepeil, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 12, 367.
- 25) M. Persmark, D. Expert, J. B. Neilands, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 3187.
- 26) R. G. Soengas, C. Anta, A. Espada, R. M. Nieto, M. Larrosa, J. Rodriguez, C. Jiménez, *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 3021.
- 27) M. Persmark, J. B. Neilands, *BioMetals*, **2005**, 5, 29.
- 28) F. Biaso, P. Baret, J-L. Pierre, G. Serratrice, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 89, 123
- 29) J-M. Meyer, M. A. Abdallah, *J. Gen. Microbiol.*, **1980**, 118, 125.
- 30) A. Stintzi, C. Barnes, J. Xu, K. N. Raymond, *P.N.A.S.*, **2000**, 97, 10691.
- 31) H. Boukhalifa, A. L. Crumbliss, *BioMetals*, **2002**, 15, 325.
- 32) H. K-Leshem, C. Ziv, E. G-Kontecka, R. A-Yellin, Y. Chen, M. Elhabiri, A-M. A-Gary, Y. Hadar, A. Shanzer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1137.
- 33) Y-M. Lin, M. J. Miller, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 7451.
- 34) A. J. Walz, U. Mollmann, M. J. Miller, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 1621.
- 35) H. Boukhalifa, S. D. Reilly, R. Michalczyk, S. Lyer, M. P. Neu, *Inorganic Chemistry*, **2006**, 45, 5607.
- 36) S. Wendenbaum, P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer, M. A. Abdallah, *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 4877.
- 37) C. Atkin, J. B. Neilands, *Biochemistry*, **1968**, 7, 3734.
- 38) S.Yamamoto, N. Okujo, T. Yoshida, S. Matsuura, S. J. Shinoda, *Biochemistry*, **1994**, 155, 868.
- 39) S.Yamamoto, N. Okujo, S. Matsuura, I. Fujiwara, Y. Fujita, S. Shinoda, *Micobiol. Immunol.*, **1994**, 38, 687.
- 40) N. Wirén, H. Khodr, R. Hider, *Plant Physiology*, **2000**, 124, 1149.
- 41) K. N. Raymond, E. A. Dertz, S. S. Kim, *P.N.A.S.*, **2003**, 100, 3584.

- 42) A. D. Ferguson, V. Braun, H-P. Fiedler, J. W. Coulton, K. Diederichs, W. Welte, *Protein Science*, **2000**, 9, 956.
- 43) A. Stintzi, C. Barnes, Jide Xu, K. N. Raymond, *P.N.A.S.*, **2000**, 97, 10691.
- 44) Li Ma, W. Kaserer, R. Annamalia, D. C. Scott, Bo Jin, X. Jiang, Q. Xiao, H. Maymani, L. M. Massis, L. C. S. Ferreira, S. M. C. Newton, P. E. Klebba, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 397.
- 45) J-L Pierre, G Lescoat, *L'Actualité Chimique*, **2003**, 123, 111.
- 46) Y. Deugnier, *Hépatogastro.*, **1999**, 6, 173.
- 47) J-L. Pierre, P. Baret, G. Serratrice, *Current Medicinal Chemistry*, **2003**, 10, 1077.
- 48) C. Caris, P. Baret, C. Béguin, G. Serratrice, J-L Pierre, J-P Laulhere, *Biochem. J.*, **1995**, 312, 879.
- 49) N. Rakba, C. Henry, C. Caris, I. Morel, N. Padeloup, P. Baret, J-L Pierre, P. Brissot, G. Lescoat, R. R. Crichton, *Biochem. Pharmacol.*, **1998**, 55, 1797.
- 50) D. Imbert, P. Baret, D. Gaude, I. Gautier-Luneau, G. Gellon, F. Thomas, G. Serratrice, J-L Pierre, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 1091
- 51) L. D. Loomis, K. N. Raymond., *Inorg. Chem.*, **1991.**, 30., 906.
- 52) A. Shanzer, J. LiBman, S. Lifson, C. E. Felder, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 7609.
- 53) P. Silley, J. W. Griffiths, D. Monsey, A. M. Harris, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, 34, 1806.
- 54) Y. Deugnier, *Hépatogastro.*, **1999**, 6, 173.
- 55) S. Matthijs, C. Baysse, N. Koedam, K. A. Tehrani, L. Verheyden, H. Budzikiewicz, M. Schaifer, B. Hoorelbeke, J-M Meyer, H. De Greve, P. Cornelis, *Molecular Microbiology*, **2004**, 52, 371
- 56) S. Matthijs, K. A. Tehrani, G. Laus, R. W. Jackson, R. M. Cooper, P. Cornelis, *Environnement Microbiology*, **2007**, 9, 425.
- 57) D. Mossialos, J-M Meyer, H. Budzikiewicz, U. Wolff, N. Koedam, C. Baysse, V. Anjaiah, P. Cornelis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, 66, 487.
- 58) M A. Fischbach, H. Lin, L. Zhou, R. J. Abergel, D. R. Liu, K. N. Raymond, B. L. Wanner, R. K. Strong, C. T. Walsh, A. Aderem, K. D. Smith, *P.N.A.S.*, **2006**, 103, 16502.
- 59) B. Tse, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7892.
- 60) V. L. Pecoraro, F. L. Weitzl, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 5133.
- 61) A. Furst, C. J. Olsen, *Journal of Organic Chemistry*, **1951**, 16, 412.
- 62) R. G. Clewley, G. G. Gross, A. Fischer, G. N. Hheenderson, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 1299.
- 63) D. D. Miller, A. Hamada, M. T. Clark, A. Adejare, P. N. Patil, G. Shams, K. J. Romstedt, S. U. Kim, U. Intrasuksri, J. McKenzie, D. R. Feller, *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 1138.

- 64) K. M. Muirhead, N. P. Botting, *ARKIVOC*, **2002**, III, 37.
- 65) Z.H. Skraup, *Monatsh. Chem.*, **1880**, , 316.
- 66) B. E Cohn, R. G. Gustavson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1928**, 50, 2709.
- 67) W. Koning, *Ber. Ber. Chem.*, **1923**, 26B, 1853.
- 68) T. P. Forrest, G. A. Dauphinee, W. F. Miles, *Can. J. Chem.*, **1969**, 47, 2121.
- 69) Friendlander, *Ber.*, **1882**, 15, 2572.
- 70) F. W. Bergstrom, *Chem. Rev.*, **1944**, 35, 77.
- 71) J. A. Joule, G. F. Smith, *Heterocyclic. Chem.*, **1972**, 104.
- 72) L. S. Povarov, *Russ. Chem. Rev.*, **1967**, 36, 656.
- 73) D-M Cui, M. Kawamura, S. Shimada, S. Shimada, T. Hayashi, M. Tanaka, *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 4007.
- 74) B. Jiang, Y-G Si, *J. Org. Che..*, **2002**, 67, 9449.
- 75) G. J. Atwell, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 396.
- 76) G. A. Epling, A. A. Provatas, *Chem.. Commun.*, **2002**, 10, 1036.
- 77) D. Imbert, P. Baret, D. Gaude, I. Gautier-Luneau, G. Gellon, F. Thomas, G. Sérratrice, J6L. Pierre, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 1091.
- 78) A. Ringbom, *complexation in Analytical Chemistry*, Interscience, New York, **1963**.
- 79) R. Bastian, R. Weberling, F. Palilla, *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 459
- 80) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbuhler, *Talanta*, **1985**, 32, 95.
- 81) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbuhler, *Talanta*, **1985**, 32, 257.
- 82) A. E. Martell, R. J. Motekaitis, ED. *VCH Weinheim*, **1988**, 1, 7.
- 83) P. Gans, B. O'Sullivan, *Talanta*, **2000**, 51, 33.
- 84) J-C. Hallé, R. Gaboriand, R. Schaal, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1969**, 6, 1851.
- 85) A. Shanzer, N. Mayer-Shochet, F Frolow, D. Rabinovich, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 4662.
- 86) H. R. kricheldorf, S-R Lee, N. Schittenhelm., *Mocromol. Chem. phys.*, **1998**., 199., 273.
- 87) H. Deleuze, B. Maillard, *J. OrganoMet. Chem.*, **1995**, 90, C14-C17.
- 88) W. H. Rastetter, T. J. Erickson, M. C. Venuti, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 3579.
- 89) S. GroB, S. Laabs, A. Scherrmann, A. Sudau, N. Zhang, U. Nubbemeyer, *J. Prakt. Chem.*, **2000**, 7, 342.
- 90) M. E. Bluhm, S. S. Kim, E. A. Dertz, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2436.
- 91) R J. A. Ramirez, L. Karamanukyan, S. Ortiz, C. G. Gutierrez, *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38, 749.
- 92) H. J. Rogers, C. Synge, V. E. Woods, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1980**, 63.

- 93) J. Lacour, A. Londez, C. Goujon-Ginglinger, V. Buss, G. Bernardinelli, *Organic Letters*, **2000**, 2, 4185.
- 94) F. Favarger, C. Goujon-Ginglinger, D. Monchaud, J. Lacour, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 8521.
- 95) W. Yeng, X. Gao, G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 6339.
- 96) H. H. Barnes, C. A. Ishimaru, *BioMetals*, **1999**, 12, 83.
- 97) W. R. Harris, S. A. Amin, F. C. Kupper, D. H. Green, C. J. Carrano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, sous presse.
- 98) R. J. Abergel, J. A. Wamer, D. K. Shuh, K. N. Raymond., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 8920.
- 99) F. I. Weitzl, K. N. Raymond, P. W. Durbin, *J. Med. Chem.*, **1981**, 24, 203.
- 100) G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5291.
- 101) J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11205.
- 102) H. R. Mulla, N. J. Agard, A. Basu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 25.
- 103) P. Herczegh, T. B. Buxton, J. C. Mcpherson, A. Kovacs-Kulyassa, P. D. Brewer, F. Sztaricskai, G. G. Stroebel, K. M. Plowman, D. Farcasiu, J. F. Hartmann, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2338.
- 104) M. E. Jung, E. C. Yang, B. T. Vu, M. Kiankarimi, E. Spyrou, J. Kaunitz, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3899.
- 105) W. R. Baker, S. Cai, M. Dimitroff, L. Fang, K. K. Huh, D. R. Ryckman, X. Shang, R. M. Shawar, J. H. Therrien, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 4693.
- 106) A. de Filippis, C. Morin, C. Thimon, *Synthetic Communication*, **2002**, 32, 2669.
- 107) R. Schmidt, F. Engelmann, *Ber.*, **1887**, 20, 1217.
- 108) A. S. Lindsey, H. Jeskey., *Chem. Rev.*, **1957**, 57, 583.
- 109) F. Zouhiri, M. Danet, C. Bénard, M. Normand-Bayle, J-F Mouscadet, H. Leh, C. M. Thomas, G. Mbemba, J. D'Angelo, D. Desmaele, *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 2201.
- 110) I. Canals, F. Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatography A*, **2001**, 191.

Nivine ALNAGA

Thèse de Doctorat de l'Université Joseph Fourier, Grenoble I, le 26 novembre 2007

Synthèse de la Quinolobactine, de l'Entérobactine et leurs dérivés. Etudes de la complexation du fer

Résumé

Nous avons réalisé l'étude du complexe Fe/Quinolobactine (Fe/Q) qui a montré la nature tridentée de ce ligand qui forme un complexe ferrique de géométrie octaédrique très déformée. L'analyse du complexe du fer (ou gallium pris comme mime diamagnétique du fer) et de l'analogue Quinolobactine fluorée indique que seule l'espèce $[M(Q)_2]$ se forme à pH physiologique. Ce ligand tridenté peut être un sidérophore de secours efficace de *Pseudomonas*. D'autre part, nous avons abordé la synthèse d'une nouvelle classe d'antimétabolites potentiels dérivés de l'Entérobactine fondés sur des dérivés des acides boroniques notamment. Les résultats sont très encourageants, les acides boroniques et boriques se conjuguant bien au catéchol. L'intérêt de ces molécules en tant qu'antimétabolite devra être évalué sur des cultures de bactéries. La capacité que montre l'Entérobactine à « chélater » le bore a été mise à profit pour créer un « cheval de Troie » antibiotique potentiel dont les essais sur culture de bactéries devront montrer l'efficacité. Cette stratégie de conjugaison pourrait être élargie afin de cibler d'autres bactéries pathogènes. L'étude spectrophotométrique d'Oxinobactine dans le MeOH a également montré la forte affinité de ce ligand pour Fe^{3+} qui peut être comparable à celle de l'Entérobactine. Une perspective de synthèse pourrait être effectuée, visant à sulfoner les quinoléines, pour permettre l'augmentation de la solubilité de ce complexant en solution aqueuse, qui conduirait ensuite à réaliser des études physico-chimiques et biologiques très intéressantes.

Mots-clé : Synthèse de la Quinolobactine et de l'Entérobactine ; Synthèse de sidérophores ; Complexation du fer et du gallium ; Antibiotique cheval de Troie ; spectrométrie ; RMN

Synthesis of the Quinolobactine, the Enterobactine and their derivatives. Study of iron complexation

Abstract

We made a study of iron/Quinolobactine (Fe/Q) complex that shown the trident nature of this ligand, which forms a ferric complex of highly twisted octaedral geometry. The analysis of the iron complex (or that of gallium taken as iron-diamagnetic like) and the fluoride quinolobactine indicates that only $[M(Q)_2]$ species may be produced at physiologic pH. This ligand may be used as substitute siderophore of *Pseudomonas*. In addition, we made a synthesis of potentially new antimetabolite derivatives of the Enterobactine based on boronic acid derivatives, notably. Encouraging results have been obtained, since boronic and boric acids well react with catechol. The importance of these molecules as antimetabolites should be evaluated on bacteria cultures. The ability demonstrated of the Enterobactine to "cholate" the bore has been used to produce a possible "Trojan horse" antibiotic. The efficiency of that antibiotic is still under test. This combination strategy could be expanded to target other pathogenic bacteria. Spectrophotometric analysis of the Oxinobactine in MeOH has also shown the strong affinity of this ligand with Fe^{3+} similar to that of Enterobactine. A perspective of synthesis is conceivable so to sulfonate the quinoleines, in order to increase the solubility of this complexant in aqueous solution. Physical, chemical and biological studies of such complexes would be very interesting.

Keywords: Synthesis of Quinolobactine and Enterobactine; Synthesis of siderophores; Iron and gallium complexation; Trojan horse antibiotic; spectrometry; NMR