



HAL
open science

Pro-drogues antituberculeuses : approches pour lutter contre les résistances et compréhension des mécanismes oxydatifs d'activation

Julie Laborde

► **To cite this version:**

Julie Laborde. Pro-drogues antituberculeuses : approches pour lutter contre les résistances et compréhension des mécanismes oxydatifs d'activation. Chimie organique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30226 . tel-01548280

HAL Id: tel-01548280

<https://theses.hal.science/tel-01548280>

Submitted on 27 Jun 2017

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par

Julie Laborde

Le **Vendredi 18 Novembre 2016**

Titre :

Pro-drogues antituberculeuses :

**Approches pour lutter contre les résistances et compréhension des
mécanismes oxydatifs d'activation**

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM, Chimie-Biologie-Santé - CO 042

Unité de Recherche :

Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS (UPR CNRS 8241)

Directrices de Thèse :

Pr. Vania Bernardes-Génisson, Professeur à l'Université de Toulouse III

Dr. Céline Deraeve, Maître de conférences à l'Université de Toulouse III

Membres du jury :

Dr. Laurent Kremer,

Pr. Nicolas Willand,

Dr. Sylvain Broussy,

Pr. Nicolas Fabre,

Pr. Vania Bernardes-Génisson,

Dr. Céline Deraeve,

Directeur de Recherche INSERM, Montpellier,

Professeur à l'Université de Lille II,

Maître de conférences à l'Université Paris Descartes,

Professeur à l'Université de Toulouse III,

Professeur à l'Université de Toulouse III,

Maître de conférences à l'Université de Toulouse III,

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice

Co-directrice

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par

Julie Laborde

Le Vendredi 18 Novembre 2016

Titre :

Pro-drogues antituberculeuses :

**Approches pour lutter contre les résistances et compréhension des
mécanismes oxydatifs d'activation**

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM, Chimie-Biologie-Santé - CO 042

Unité de Recherche :

Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS (UPR CNRS 8241)

Directrices de Thèse :

Pr. Vania Bernardes-Génisson, Professeur à l'Université de Toulouse III

Dr. Céline Deraeve, Maître de conférences à l'Université de Toulouse III

Membres du jury :

Dr. Laurent Kremer,

Pr. Nicolas Willand,

Dr. Sylvain Broussy,

Pr. Nicolas Fabre,

Pr. Vania Bernardes-Génisson,

Dr. Céline Deraeve,

Directeur de Recherche INSERM, Montpellier,

Professeur à l'Université de Lille II,

Maître de conférences à l'Université Paris Descartes,

Professeur à l'Université de Toulouse III,

Professeur à l'Université de Toulouse III,

Maître de conférences à l'Université de Toulouse III,

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice

Co-directrice

Remerciements

Je souhaite commencer ce mémoire par remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé à réaliser cette thèse que ce soit par leur soutien scientifique ou moral.

Tout d'abord, je remercie mes directrices de thèse Vania Bernardes-Génisson, Professeur à l'Université de Toulouse III, et Céline Deraeve, Maître de conférences à l'Université de Toulouse III, pour m'avoir accordé leur confiance et permis de réaliser ce magnifique projet. Je vous remercie pour les nombreuses discussions qui ont permis de résoudre rapidement les problèmes rencontrés et d'avancer. Un grand merci pour ces trois années où nous avons partagé plus qu'un projet scientifique et qu'un bureau.

Je voudrais remercier le Dr. Laurent Kremer, Directeur de recherche à l'INSERM de Montpellier et le Pr. Nicolas Willand, Professeur à l'Université de Lille II, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je voudrais également remercier le Dr. Sylvain Broussy, Maître de conférences à l'Université Paris Descartes, et le Pr. Nicolas Fabre, Professeur à l'Université de Toulouse III, qui m'ont fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie Geneviève Pratviel et les membres de l'équipe K, Anne, Jean, Emmanuelle, Jean-Luc, Pierre, Colin, Michel, Julien et Cyril pour leur accueil au sein de leur équipe et pour leurs conseils. Je remercie particulièrement Jean-Luc pour la réalisation des calculs théoriques décrits dans ce travail. Pierre et Colin, les « nouveaux » qui ont révolutionné le labo et amené Nespresso dans nos vies ! Julien et Cyril, (Hello, it's me !) je vous souhaite bonne chance pour la thèse et la vie privée (peut-être qu'un jour, Julien, tu retrouveras tes clefs) et j'espère que vous trouverez la hotte qui fait réussir les manips !

Merci beaucoup à Eduardo et son équipe pour le séjour brésilien et pour les caïpirinhas.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé pour les techniques d'analyses : Alix et Alain pour l'électrochimie, Lionel pour la RPE, Carine pour la DRX, Nathalie et Valérie pour la LC-MS. Je vous remercie d'avoir pris le temps de m'expliquer ces techniques, d'avoir réfléchi ensemble aux protocoles à mettre en place et d'avoir supporté mes triplicatas et mes manips de contrôle !

Je voudrais remercier également mes camarades thésards et stagiaires que j'ai croisé durant ces trois années et notamment Richou (ESCOM Power ! Les soirées bowling et jap qui vont me manquer), Amandine et Clémence (pour l'invention du Zumbapéro), Léa (la pro des hydrazides), Marcos (pour la visite de Fortaleza), Franky, Aurélien, Marie, Omar, Alexandre, Valentina, Elena et tous les autres...

Merci aussi à tous mes amis de Toulouse, Pau, Bordeaux, Lyon, Paris (et sa région !), Lille, Sarreguemines, Leiden, Rauma, Singapour... pour les moments de détente que nous avons pu partager, les blagues reçues par messages dans les moments les plus durs et les soirées à venir pour fêter ça !

Enfin, un grand merci à mes parents qui m'ont offert les moyens de développer ma curiosité, ma créativité et mon sens de l'organisation, des qualités essentielles au bon déroulement de cette thèse et pour leur soutien moral. Merci à mon frère pour m'avoir accueillie à Toulouse et, maintenant, profite bien de la beauté des Pyrénées. Et finalement, un grand merci à Greg pour son soutien inestimable.

Abréviations

ACN : acétonitrile
ACP : acyl carrier protein
ADN : acide désoxyribonucléique
ADPR: adénosine diphosphate ribose
ARN : acide ribonucléique
BCG : bacille de Calmette-Guérin
BH : benzohydrazide
Boc : *tert*-butoxycarbonyle
BpKatG : KatG de *Burkholderia pseudomallei*
CC₅₀ : concentration requise de l'inhibiteur pour réduire le nombre de cellules de 50%
CMI : concentration minimale inhibitrice
DCM : dichlorométhane
DHFR : dihydrofolate réductase
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMPO : 5,5-Diméthyl-1-pyrroline *N*-oxide
DMSO : diméthylsulfoxyde
E_a : potentiel de pic anodique (oxydation)
E_c : potentiel de pic cathodique (réduction)
E. coli : *Escherichia coli*
EMA : Agence Européenne des Médicaments
EMB : éthambutol
éq : équivalent
ENH : électrode normale à hydrogène
ESI : ionisation par électronébuliseur
ETH : éthionamide
FAD : flavin adenine dinucleotide
FAS : fatty acid synthase
FDA : Food and drug administration
FMO : flavin-containing monooxygenase
INH : isoniazide
ISO : isoxyl (thiocarlide)
MAPc : complexe d'acide mycolique, d'arabinogalactane et de peptidoglycane
m-CPBA : acide *méta*-chloroperbenzoïque
MDR : tuberculose multi-résistante
MIC : minimum inhibitory concentration
M-O : micro-ondes

MST : maladie sexuellement transmissible
MTB : *Mycobacterium tuberculosis*
MtKatG : KatG de *Mycobacterium tuberculosis*
MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MW : masse molaire (g.mol⁻¹)
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PABA : *para*-aminobenzoic acid
PAS : acide *para*-aminosalicylique
PBN : *N-tert*-butyl- α -phenylnitron
PCR : réaction en chaîne par polymérase
POA : acide pyrazinoïque
PTH : prothionamide
PZA : pyrazinamide
QSAR : quantitative structure-activity relationship
rdt : rendement
RIF : rifampicine
RMN : résonance magnétique nucléaire
RPE : résonance paramagnétique électronique
SeKatG : KatG de *Synechococcus elongatus*
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SWV : voltammétrie à vague carrée
t.a. : température ambiante
TAC : thiacétazone
TB : tuberculose
TEMPO : (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl
THF : tétrahydrofurane
UE : Union Européenne
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
XDR : tuberculose ultra-résistante

Avant-propos

La tuberculose est une maladie infectieuse pour laquelle les premiers traitements antibiotiques ont été découverts depuis plus de 60 ans. Malgré un arsenal thérapeutique varié, la tuberculose tue 4400 personnes par jour dans le monde selon les estimations de l'Organisation Mondiale de Santé. L'un des problèmes majeurs est l'émergence de souches multi- et ultra-résistantes pour lesquelles le schéma thérapeutique classique est inefficace. Les défis actuels sont donc de trouver de nouveaux médicaments pour traiter ces souches résistantes soit par la découverte de nouvelles cibles, soit en contournant les mécanismes de résistance. Contourner les mécanismes de résistance implique une bonne compréhension des mécanismes d'action des médicaments, dont certains n'ont pas encore été élucidés. Parmi ces composés, la famille des pro-drogues est très intéressante puisque ces molécules nécessitent une activation enzymatique afin d'exercer leur activité antimycobactérienne et que leurs mécanismes d'activation et d'action présentent encore des lacunes. L'étude génétique des souches résistantes de *Mycobacterium tuberculosis* permet de détecter de nouvelles enzymes clés dans l'activité de ces médicaments et ainsi d'approfondir les connaissances sur les différents mécanismes impliqués. Ces avancées permettent de nos jours de proposer de nouvelles stratégies pour combattre les résistances aux antibiotiques et de nouveaux mécanismes d'activation et d'action.

Dans ce contexte, ce projet de thèse porte sur l'étude de stratégies pour contourner les résistances et sur les mécanismes d'activation de deux pro-drogues antituberculeuses, l'isoniazide et l'éthionamide. Ce sujet, à l'interface entre la chimie et la biologie, s'appuie sur les travaux précédents de l'équipe concernant le développement d'un système biomimétique permettant l'activation de l'isoniazide.

L'étude bibliographique présentée dans l'introduction de ce manuscrit sera consacrée à la tuberculose de manière générale et aux outils de lutte, plus particulièrement aux pro-drogues antituberculeuses, aux nouvelles molécules et aux stratégies proposées pour contourner les résistances.

Les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux de recherche seront exposés sous forme de publications. La première partie présente l'étude de différentes approches pour lutter contre les résistances à l'isoniazide et/ou à l'éthionamide. En se basant sur les données de la

littérature, nous avons proposé trois stratégies afin de contourner des résistances liées aux enzymes d'activation : des molécules activables par deux systèmes enzymatiques alternatifs, des molécules activables par l'enzyme mutée ou des molécules activables par un simple oxydant endogène à la bactérie. Toutes les parties expérimentales de cette thèse seront rédigées en anglais afin de faciliter l'éventuelle publication future de ces travaux.

La deuxième partie de cette thèse décrit nos avancées dans la compréhension des mécanismes d'activation des pro-drogues isoniazide et éthionamide. L'analyse d'analogues de l'isoniazide a permis de mettre en avant certaines étapes, dont l'étape de formation du radical isonicotinoyloxy, dans le mécanisme d'activation de l'isoniazide. Le développement d'un système biomimétique d'activation de l'éthionamide et l'étude des intermédiaires réactionnels formés nous amènent à proposer un nouveau mécanisme pour l'activation de l'éthionamide. Les deux systèmes biomimétiques seront également appliqués à des analogues de l'isoniazide et de l'éthionamide et les résultats seront présentés en complément des articles publiés.

Sommaire	
REMERCIEMENTS.....	3
ABREVIATIONS	5
AVANT-PROPOS	7
SOMMAIRE	9
INTRODUCTION.....	15
I. LA TUBERCULOSE	15
I.1. La tuberculose d’hier à aujourd’hui	15
I.1.1. L’histoire de la tuberculose	15
I.1.2. La recrudescence de la tuberculose et ses raisons	16
I.1.3. Situation épidémiologique actuelle dans le monde et en France.....	18
I.2. Transmission et déclenchement de la maladie	20
I.3. Les caractéristiques de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
I.3.1. Les mycobactéries	21
I.3.2. La paroi mycobactérienne, la particularité des mycobactéries.....	22
II. LES OUTILS DE LA LUTTE ANTITUBERCULEUSE	30
II.1. Dépistage et diagnostic	30
II.2. Vaccination	31
II.2.1. Le vaccin BCG	31
II.2.2. Stratégies de vaccination alternatives	32
II.3. Traitements antibiotiques.....	33
II.3.1. Les antituberculeux de 1 ^{ère} ligne.....	33
II.3.2. Les antituberculeux de 2 ^{nde} ligne	35
II.3.3. Les antituberculeux de 3 ^{ème} ligne	37
II.3.4. Nouvelles cibles et pipeline de nouvelles molécules.....	40
III. PRODRUGS IN TUBERCULOSIS TREATMENT (REVIEW).....	44
III.1. Isoniazid.....	46
III.1.1. Mechanism of action	46
III.1.2. INH activation mechanism by KatG enzyme	49
III.1.3. Resistances to INH	51
III.2. Ethionamide and Prothionamide.....	52
III.2.1. Mechanism of action	52
III.2.2. ETH activation mechanism by EthA enzyme.....	53
III.2.3. Resistances to ETH.....	54
III.3. Thioacetazone and Thiocarlide (Isoxyl)	55
III.3.1. Mechanism of action	55
III.3.2. Activation mechanism by EthA enzyme	57
III.3.3. Resistances.....	57
III.4. <i>para</i> -Aminosalicylic acid	57
III.4.1. Mechanism of action	57
III.4.2. PAS activation mechanism	60
III.4.3. Resistances.....	60

III.5. Pyrazinamide	61
III.5.1. Mechanism of action	61
III.5.2. PZA activation mechanism by PncA enzyme	63
III.5.3. Resistance to PZA	64
III.6. Delamanid.....	64
III.6.1. Mechanism of action	65
III.6.2. Activation mechanism by Ddn enzyme.....	65
III.6.3. Resistance	66
IV. LES MECANISMES DE LA RESISTANCE MYCOBACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES.....	67
IV.1. Les pompes à efflux.....	67
IV.2. Inactivation de l'antibiotique.....	68
IV.3. Modification de la cible.....	69
V. PRO-DROGUES : APPROCHES ETUDIEES DANS LA LITTERATURE POUR CONTOURNER LES RESISTANCES.....	71
V.1. Boosters de l'activation de la pro-drogue	71
V.2. Inhibiteurs directs de la cible de la pro-drogue.....	72
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....	77
PARTIE 1 : ETUDE DE NOUVELLES APPROCHES POUR CONTOURNER LES RESISTANCES.....	83
I. MOLECULES HYBRIDES INH-ETH	83
I.1. Introduction	83
I.2. Synthèse des thiohydrazides.....	84
I.2.1. Etude de la synthèse du pyridine-4-carbothiohydrazide I-1	85
I.2.2. Synthèse de benzothiohydrazides	90
I.2.3. Conclusion	98
I.2.4. Partie expérimentale	99
I.3. Les thiohydrazides sont-ils activables par l'enzyme KatG ?	102
I.4. Les thiohydrazides sont-ils activables par l'enzyme EthA ?.....	104
I.5. Conclusion.....	105
II. CONCEPTION DE MOLECULES ANALOGUES DE L'ISONIAZIDE POTENTIELLEMENT ACTIVABLES PAR KATG MUTEE.....	107
II.1. Hypothèse d'une modification du potentiel d'oxydation de KatG : stratégie des hydrazides plus facilement oxydables	108
II.1.1. Introduction	108
II.1.2. Article 1: ChemistrySelect, 2016, 1(2), 172-179.....	110
II.1.3. Supporting information.....	120
II.1.4. Résultats non publiés associés à l'article.....	131
II.1.5. Conclusion	134
II.2. Hypothèse d'une modification structurale de l'enzyme KatG : stratégie des hydrazides à chaînes longues.....	134
II.2.1. Introduction	135

II.2.2. Résultats et discussion	142
II.2.3. Conclusion	146
II.2.4. Partie expérimentale	147
III. MOLECULES CHIMIO-ACTIVABLES : COMPLEXES DE FER DE L'ISONIAZIDE ET D'ANALOGUES	151
III.1. Introduction.....	151
III.2. Iron(II) complexes of isoniazid and analogues : synthesis, characterization and study of their oxidative properties in the presence of H ₂ O ₂ (<i>article en préparation</i>)	153
PARTIE 2 : MECANISMES D'ACTIVATION DE L'ISONIAZIDE ET DE L'ETHIONAMIDE	179
I. MECANISME D'ACTIVATION DE L'ISONIAZIDE	179
I.1. Mécanisme d'activation décrit dans la littérature.....	179
I.1.1. Le radical isonicotinoylé	180
I.1.2. Formation du métabolite actif.....	182
I.1.3. Formation des métabolites non-actifs.....	184
I.2. Mécanisme d'activation de l'INH d'un point de vue moléculaire	186
I.2.1. Article 1 : Chemistry Select, 2016, 1(2), 172-179, partie mécanistique	187
I.3. Résultats non publiés associés à l'article	188
I.3.1. Hydrazides substitués	188
I.3.2. Autres hydrazides étudiés	193
I.3.3. Activation enzymatique par BpKatG	194
I.3.4. Formation du radical R-PBN en RPE	195
I.3.5. Formation des adduits avec le NAD ⁺	196
I.4. Conclusion.....	197
II. MECANISME D'ACTIVATION DE L'ETHIONAMIDE	199
II.1. Article 2: Ethionamide biomimetic activation and an unprecedented mechanism for its conversion into the active and non-active metabolites	199
II.2. Résultats non publiés associés à l'article	212
II.2.1. Adduits avec le cofacteur NADP ⁺	212
II.2.2. Oxydation d'analogues de l'ETH : pyridine-4-carbothioamide et benzothioamide.....	212
II.2.3. Oxydation du thiacétazone	215
II.2.4. Conclusion	218
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	221
TABLES DES ILLUSTRATIONS	229
I. TABLE DES FIGURES.....	229
II. TABLE DES SCHEMAS	231
III. SCHEME TABLE	233
IV. TABLE DES TABLEAUX.....	233
BIBLIOGRAPHIE	237

Introduction

Introduction

I. La tuberculose

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse causée par le bacille *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Elle affecte principalement les poumons (TB pulmonaire) mais peut toucher d'autres organes (TB extra-pulmonaire).

I.1. La tuberculose d'hier à aujourd'hui

I.1.1. L'histoire de la tuberculose

La tuberculose, autrefois appelée phtisie ou peste blanche, est une maladie très ancienne dont des traces d'ADN ont été retrouvées dans des poumons de momies égyptiennes [2]. Des techniques récentes de génétique moléculaire et le séquençage du génome ont permis d'estimer que la bactérie était déjà présente en Afrique de l'est il y a environ 3 millions d'années [3].

Les plus grandes avancées sur la compréhension de la tuberculose commencent seulement au 19^{ème} siècle avec **René Théophile Hyacinthe Laennec**. Plus connu de nos jours pour l'invention du stéthoscope, il a élucidé la pathogénèse de la tuberculose et a unifié le concept de la maladie, pulmonaire ou extra-pulmonaire [4]. En 1819, il publie la première édition de son livre *D'Auscultation Mediate* dans lequel il expose la pathologie de la tuberculose ainsi que différents signes cliniques de maladies pulmonaires. A cette époque, les malades étaient alors envoyés vers les sanatoriums, premiers établissements médicaux consacrés au traitement de la tuberculose dont le premier fut ouvert en 1854 [5]. En 1865, **Jean-Antoine Villemin**, un médecin militaire français, démontre la transmission d'espèce à espèce de la maladie notamment entre hommes et lapins [2].

L'histoire de la tuberculose change radicalement le 24 mars 1882 quand **Robert Koch** fait sa célèbre présentation *Die Aetiologie der Tuberkulose* à Berlin lors de laquelle il révèle avoir identifié et isolé l'agent responsable de la tuberculose [6]. Sa contribution et ses avancées sur la tuberculose seront récompensées par le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1905. Cette découverte spectaculaire a permis à **Albert Calmette** et **Camille Guérin** de développer en 1921 le vaccin BCG (Bacille de Calmette-Guérin), premier vaccin contre la tuberculose développé à partir d'une souche atténuée de *M. bovis* [7]. Le traitement

de la tuberculose a ensuite connu des avancées extraordinaires au début des années 1950 avec l'apparition des premiers antibiotiques tels que la streptomycine ou l'isoniazide, qui ont permis de réduire considérablement le nombre de décès suite à l'infection par *M. tuberculosis*.

1.1.2. La recrudescence de la tuberculose et ses raisons

En 1993, l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) a pris une initiative sans précédent en déclarant la tuberculose comme une des priorités majeures en termes de santé publique. En effet, dans de nombreux pays où l'incidence de la tuberculose était en diminution depuis plus d'une décennie, une stagnation ou une augmentation de l'incidence de la tuberculose a été constatée au début des années 1990 [8]. Par exemple, aux Etats-Unis, une augmentation estimée à 13% du nombre de cas de tuberculose a été observée entre les années 1985 et 1992. Cette recrudescence est bien plus importante encore en Europe de l'Est. Ainsi en Estonie, le nombre de cas de tuberculose a augmenté de 80% entre 1982 et 1989. En Russie, le développement de la tuberculose chez les enfants est également très inquiétant car l'incidence de cette maladie chez ces derniers a augmenté d'environ 80% entre 1989 et 1995.

1.1.2.1. Les mouvements de population

L'immigration est l'un des facteurs importants influençant l'augmentation de l'incidence de la tuberculose dans les pays développés où elle était, jusque là, faible. Le développement du commerce international ainsi que l'accès à de nombreux moyens de transport ont également facilité la propagation de l'agent infectieux à l'échelle mondiale.

1.1.2.2. La pauvreté et les conditions de vie

Le lien étroit entre la tuberculose et la pauvreté est depuis des années établi. Des conditions de vie précaire, de malnutrition et le manque d'accès aux services de santé sont des facteurs affaiblissant le système immunitaire et qui par conséquent augmentent les risques d'infection et de développement de la tuberculose.

1.1.2.3. Co-infection avec le VIH

Lors d'une co-infection MTB-VIH, chaque pathologie accélère le développement de l'autre, entraînant une diminution rapide du système immunitaire et pouvant conduire à la mort prématurée du sujet co-infecté [9]. La baisse de l'immunité engendrée par le VIH augmente le risque d'infection par *M. tuberculosis* et de transformation d'une tuberculose latente en tuberculose active. La tuberculose, quant à elle, accélère l'immunodépression en favorisant la répllication du VIH. Les patients co-infectés MTB-VIH ont besoin de recevoir les

traitements spécifiques aux deux pathologies et les interactions pharmacocinétiques entre les deux types de traitements sont nombreuses, comme l'induction puissante des cytochromes P450 par la rifampicine, ce qui complique la prise en charge de ces patients [10]. Les traitements doivent également être adaptés afin de limiter le cumul des effets secondaires liés à chaque médicament comme l'hépatotoxicité ou la neurotoxicité.

Parmi les 9,6 millions de nouveaux cas de tuberculose en 2014, l'OMS estime que 1,2 millions de personnes sont co-infectés par MTB-VIH, c'est-à-dire que 12% des nouveaux cas de tuberculose sont VIH-positifs [11]. En 2014, l'OMS a estimé que 27% des personnes décédées des suites de la tuberculose étaient VIH-positives. Bien que l'incidence du VIH et de la tuberculose diminue ces derniers temps, l'amélioration de l'espérance de vie de personnes infectées par le VIH ou MTB favorise considérablement la co-infection MTB-VIH.

1.1.2.4. La résistance aux antibiotiques

Des cas de résistances sont apparus très rapidement après l'introduction d'antibiotique antimycobactérien. En effet, une souche de *M. tuberculosis* résistante à la streptomycine, antituberculeux de 1^{ère} ligne, a été décrite en 1947 lors de la première étude clinique de l'activité antimycobactérienne de ce médicament [12].

La résistance de *M. tuberculosis* face à un antituberculeux résulte de mutations spontanées et aléatoires sur ses chromosomes, dont la fréquence de mutation a été évaluée entre 10^{-6} à 10^{-8} réplifications bactériennes [13]. Ainsi selon Zhang *et al.*, la probabilité qu'un bacille développe une résistance à trois médicaments simultanément chute à 10^{-18} et 10^{-20} réplifications bactériennes, en considérant que les mutations impliquant des résistances ne soient pas liées [13]. Bien qu'il soit en théorie inenvisageable d'observer des résistances simultanées à trois antituberculeux, des cas de tuberculose multirésistante (multidrug-resistant, MDR) et ultrarésistante (extensively drug-resistant, XDR) sont reportés chaque année. La tuberculose multirésistante (TB-MDR) est définie comme résistante au moins à l'isoniazide et à la rifampicine, deux antituberculeux de 1^{ère} ligne et la tuberculose ultrarésistante présente des résistances au moins à l'isoniazide, à la rifampicine, à un médicament de la famille des fluoroquinolones et à un injectable de 2^{ème} ligne.

L'émergence de souches de MTB résistantes aux antituberculeux classiques est dûe au développement de résistances dites acquises, causées par la prise de traitement inadéquat ou inapproprié et le manque d'observance des traitements donnés [14]. Ces défauts de traitements entraînent la sélection de bacilles résistants déjà pré-existants dans la population bactérienne d'origine et favorise ainsi le développement de la tuberculose résistante. Ces

bacilles résistants sélectionnés peuvent être transmis à un autre individu et propager ainsi une souche de MTB résistante. Les résistances seront alors classées en trois catégories [14]:

- résistance primaire, lorsque le patient n'aura jamais été traité auparavant contre la tuberculose et aura contracté directement une forme résistante,
- résistance acquise, lorsque le patient aura été traité une première fois pour une tuberculose sensible qui devient résistante,
- résistance initiale, lorsque l'historique du patient ne peut être vérifié, cela peut correspondre à la combinaison d'une résistance primaire et acquise.

1.1.3. Situation épidémiologique actuelle dans le monde et en France

Selon les estimations de 2014 de l'OMS, chaque année, la tuberculose tueait 1,5 millions de personnes (soit 4400 décès par jour) et 9,6 millions de personnes contracteraient la tuberculose [11]. En 2014, 6 millions de nouveaux cas de tuberculose ont été reportés à l'OMS, ce qui signifie que 37% des nouveaux cas ne sont pas diagnostiqués ou déclarés à l'OMS. Toutefois, ce pourcentage est à la baisse, principalement suite à une amélioration des politiques de prise en charge de la tuberculose dans les pays émergents. De même, la mortalité due à la tuberculose est également en recul, avec un taux de mortalité chutant de 47% entre 1990 et 2015.

Enfin, plus d'un tiers de la population mondiale est actuellement atteint de tuberculose latente, c'est-à-dire que ces personnes sont infectées par *M. tuberculosis* mais n'ont pas encore développé la maladie. Globalement, le taux d'incidence de la tuberculose est resté relativement stable depuis les années 1990 jusqu'au début des années 2000 où il a commencé à diminuer.

Selon le rapport de 2015, l'OMS estime, en 2014, que 3,3% des nouveaux cas (soit 480 000 cas) et 20% de tuberculose déjà traitée sont des tuberculoses multi-résistantes [11]. Des cas de TB-XDR ont été reportés dans 105 pays et correspondent à environ 10% des cas de TB-MDR. Les plus forts taux d'incidence de la TB-MDR sont dénombrés en Europe de l'Est et en Asie centrale avec des taux d'incidence dépassant les 20%. L'apparition de souches résistantes partout dans le monde renforce les préoccupations de l'OMS et place les tuberculoses MDR et XDR comme un problème de santé majeur dans les pays en voie de développement, mais aussi dans les pays développés.

D'un point de vue répartition géographique, la tuberculose est répandue partout dans le monde (Figure 1). Il existe cependant des disparités puisque 58% des cas estimés de

tuberculose sont concentrés en Asie et 28% en Afrique en 2014 (Figure 1) [11]. Les pays les plus touchés sont l'Inde (2200 cas pour 100.000 habitants), l'Indonésie (1000 cas pour 100.000 habitants) et la Chine (930 cas pour 100.000 habitants) qui représentent à eux seuls 43% des cas de tuberculose en 2014. Les autres régions du globe sont moins touchées, néanmoins des nouveaux cas de tuberculoses y sont signalés chaque année : en Europe (4%) et en Amérique (3%).

La France est considérée comme un pays à faible incidence de tuberculose. Selon les données de l'Institut de Veille Sanitaire en France [15], le nombre de cas de tuberculose déclarés était de 4827 cas en 2014 soit 7,3 cas pour 100.000 habitants (Figure 2). Globalement, depuis 1972, le nombre de cas diminue régulièrement chaque année à l'exception des années 2007-2008. Il existe cependant des disparités en France avec des taux de déclaration plus élevés en Ile-de-France, en Guyane et à Mayotte comparés à ceux d'autres régions françaises. La maladie touche principalement les populations en situation de précarité, les migrants en provenance de régions où le taux de contamination est élevé et les personnes âgées.

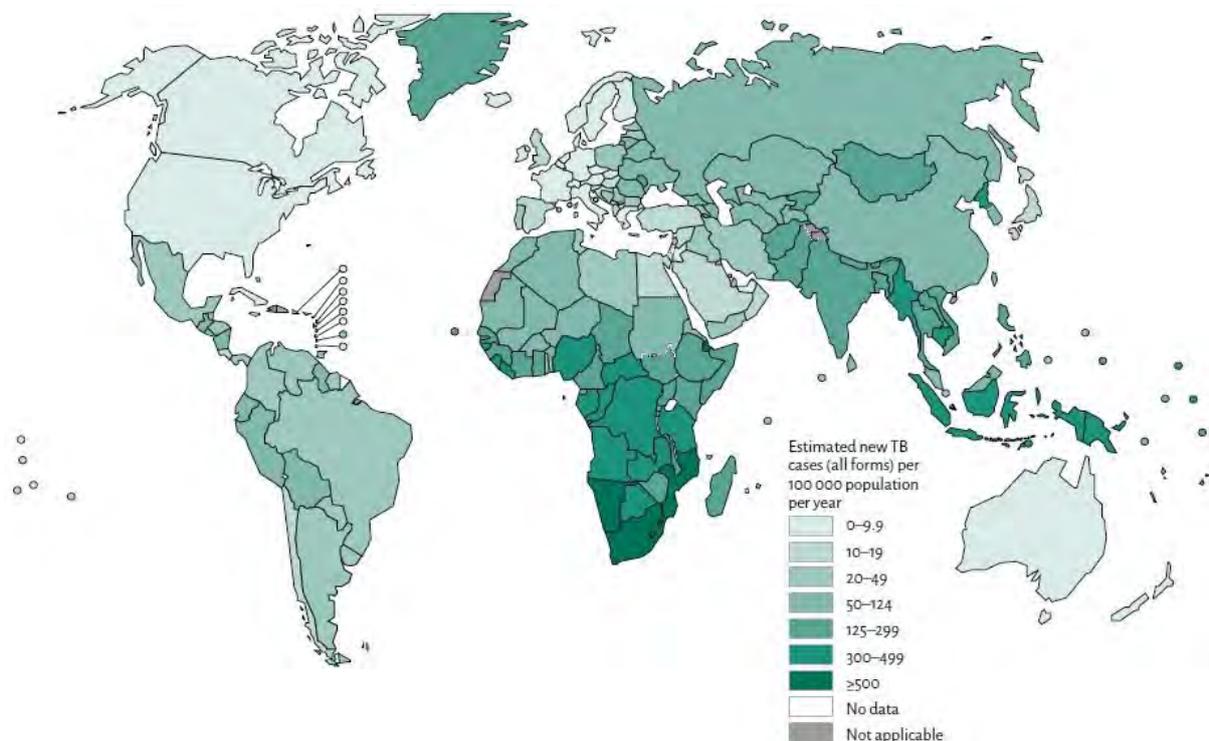


Figure 1 : Estimation du nombre de nouveaux cas de tuberculoses en 2014 [11]

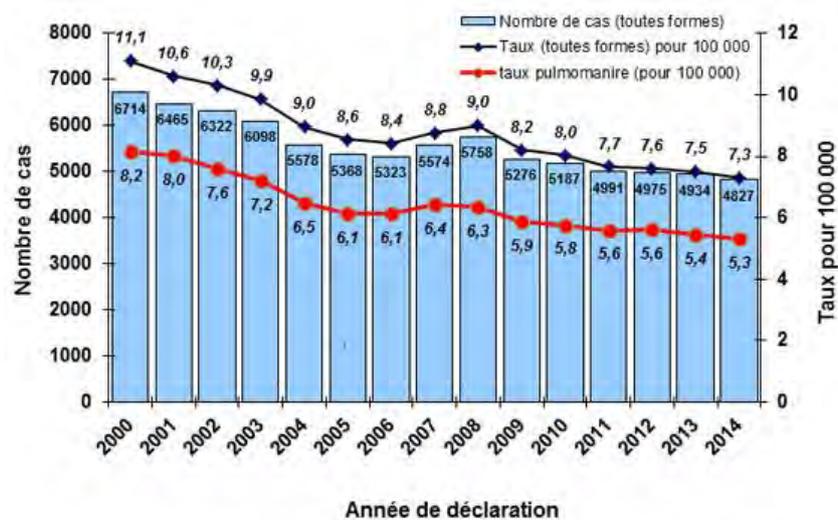


Figure 2 : Nombre de cas déclarés et taux de déclaration (pour 100 000 habitants) de tuberculose, en France en 2014 d'après les données de l'Institut de Veille Sanitaire[15]

I.2. Transmission et déclenchement de la maladie

La tuberculose est une maladie contagieuse qui se transmet d'une personne à l'autre par voie aérienne [16]. Lorsque les personnes atteintes de tuberculose pulmonaire toussent, éternuent ou parlent, elles projettent dans l'air les germes de l'agent pathogène *M. tuberculosis*, via des micro-gouttelettes de mucus et une simple inhalation suffit pour être infecté. En moyenne, un malade contagieux contamine 10 individus par an.

Après inhalation de bacilles tuberculeux, dans un premier temps, la primo-infection concerne les alvéoles pulmonaires où la multiplication des bacilles est contenue par l'organisme sans présence de signe clinique [16]. La primo-infection tuberculeuse suite à l'inhalation de bacilles guérit le plus souvent spontanément par l'action du système immunitaire de l'hôte. Cependant, bien que les bacilles tuberculeux soient phagocytés par les cellules immunitaires (macrophage alvéolaire et cellules dendritiques), ils possèdent des facteurs de virulence qui leur permettent de survivre dans les cellules phagocytaires [17]. Dans 90% des cas, le bacille tuberculeux reste au repos, c'est l'**infection tuberculeuse latente**, asymptomatique. L'hôte infecté ne présente aucun symptôme de la maladie, n'est pas contagieux et n'est alors pas malade. Seulement un faible pourcentage (10%) des personnes infectées développeront la maladie au cours de leur vie [11]. La probabilité de développer la maladie sera plus importante pour les personnes VIH-positif ou souffrant de malnutrition ou de diabète, ou encore les fumeurs. Les bacilles tuberculeux ingérés par les macrophages se multiplient à l'intérieur de ceux-ci et déclenchent une réaction chimiotactique attirant des macrophages et autres cellules défensives dans la zone infectée [17]. Cet amas de cellules

forme un granulome (ou tubercule) à l'intérieur duquel les bacilles tuberculeux se développent mal du fait de l'absence d'oxygène et peuvent donc rester à l'état de dormance. La maladie reste en phase latente et les lésions se calcifient.

Lors d'une baisse des défenses immunitaires, ces granulomes peuvent être réactivés et, en présence d'enzymes et de cytokines libérées par les cellules immunitaires présentes, provoquer une inflammation locale dommageable pour les poumons. Le patient est alors atteint de **tuberculose pulmonaire** avec des symptômes comme de la fièvre ou de la toux. En absence de traitement, la formation et prolifération des granulomes dans les poumons rendent la tuberculose mortelle. En effet, la prolifération du granulome se poursuit jusqu'à ce que celui-ci se rompe, ce qui permet aux bacilles de se disperser dans les poumons et de se répandre dans les systèmes sanguin et lymphatique. Les bacilles tuberculeux se retrouvent également dans les voies aériennes de l'hôte qui devient alors contagieux.

La propagation des bacilles tuberculeux dans tout l'organisme de l'hôte peut donner lieu à des **tuberculoses extra-pulmonaires** (14% des nouveaux cas de tuberculose selon l'OMS [11]). La tuberculose peut alors se localiser dans les ganglions lymphatiques, l'appareil ostéo-articulaire ou l'appareil génito-urinaire, les symptômes dépendant de l'organe infecté. Les cas de tuberculose extra-pulmonaire sont plus fréquents chez les patients co-infectés par MTB-VIH.

Lorsque la tuberculose est diagnostiquée suffisamment tôt, elle peut être traitée de manière très efficace, avec un taux de succès des traitements actuels de 85%.

I.3. Les caractéristiques de *Mycobacterium tuberculosis*

I.3.1. Les mycobactéries

Le genre *Mycobacterium* correspond à des bacilles aérobies à croissance plus ou moins lente appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae* sous l'ordre des *Actinomycetales* [17]. Celui-ci est composé de près de 170 espèces, dont certaines sont pathogènes pour l'homme : *M. tuberculosis* (responsable de la tuberculose), *M. leprae* (responsable de la lèpre) et *M. ulcerans* (responsable de l'ulcère de Buruli).

Les espèces de *Mycobacterium* responsables de la tuberculose sont regroupées dans le complexe *Mycobacterium tuberculosis* comprenant les sous-espèces : *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. orygis* et *M. mungi* [18]. Cependant, dans 99% des cas, l'espèce responsable de la tuberculose est *M.*

tuberculosis. *M. africanum* n'est pas répandu à l'échelle mondiale et 20 à 50% des cas sont reportés en Afrique. *M. bovis* est responsable de la tuberculose chez les bovins et est aussi pathogène pour l'homme par contamination du lait par cette bactérie. Enfin, bien que rares, certains cas de tuberculose ont été observés chez l'homme pour les autres sous-espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* [17,18].

La majorité des spécificités des bactéries du genre *Mycobacterium*, à savoir son caractère acido-alcool-résistant, sa résistance aux antibiotiques classiques ou bien sa pathogénicité, provient de sa paroi bactérienne caractéristique, très riche en acides gras et en lipides. Les mycobactéries sont des organismes ne pouvant être classés ni dans la famille des bactéries Gram-positif, ni dans celle Gram-négatif puisqu'elles possèdent des caractéristiques de ces deux familles [19]. En effet, la majorité des gènes des mycobactéries sont communs à ceux des bactéries Gram-positif. Cependant, les mycobactéries partagent également des propriétés avec des organismes Gram-négatif, telles que l'absence de conservation de la coloration de Gram ou la présence de porines dans leur couche lipidique externe, pouvant imiter le périplasme des bactéries Gram-négatif. Ainsi, dans un test de coloration de Gram colorant les bactéries Gram-positif, les mycobactéries seront très faiblement ou pas colorées.

Mycobacterium tuberculosis (ou bacille de Koch) est une mycobactérie à croissance lente. Son temps de division est de 16 à 20 heures et donne en 21 à 28 jours, sur milieu enrichi, de grosse colonies en « chou-fleur » de 3 à 4 mm avec des bacilles de 2 à 5 μm de long et de 0,3 à 0,5 μm de large (Figure 3).

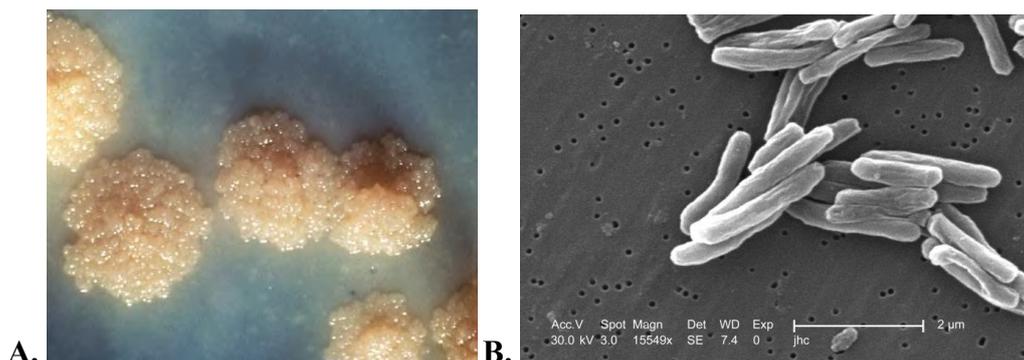


Figure 3: A. Colonies de *Mycobacterium tuberculosis*, B. Visualisation de *Mycobacterium tuberculosis* au microscope électronique

Source : Centers for Disease Control and Prevention, NIH, domaine public. © Wikimedia Comons.

1.3.2. La paroi mycobactérienne, la particularité des mycobactéries

La capacité de *M. tuberculosis* à survivre et à se répliquer dans la cellule hôte phagocytaire, constituant un environnement extrêmement hostile pour la plupart des autres

microorganismes, représente l'un des aspects clés de sa virulence. Ainsi, la paroi mycobactérienne complexe de *M. tuberculosis*, peu perméable, est son principal facteur de virulence et elle contribue à la résistance de la mycobactérie envers les traitements classiques [20].

I.3.2.1. Structure de l'enveloppe mycobactérienne.

La paroi mycobactérienne des *Mycobacteria* se distingue des autres bactéries par sa grande richesse en lipides, représentant 60% du poids de la paroi mycobactérienne [21]. L'enveloppe mycobactérienne de *M. tuberculosis* est composée de trois éléments principaux : (1) une **membrane plasmique**, (2) un **complexe d'acides mycoliques, d'arabinogalactane et de peptidoglycane (MAPc)** lié de manière covalente et (3) une **capsule riche en polysaccharides** en contact avec l'extérieur de la bactérie [22]. Ces éléments forment ainsi une double structure en bicouche avec le complexe MAPc au milieu, visualisée ci-dessous par cryo-microscopie électronique (Figure 4) [23].

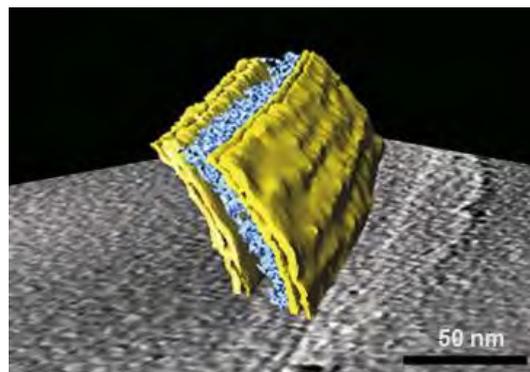


Figure 4 : Cryo-microscopie électronique de l'enveloppe mycobactérienne [23]

La **membrane plasmique ou membrane interne** est constituée d'une bi-couche lipidique semblable aux autres membranes plasmiques bactériennes. La membrane plasmique a une perméabilité sélective aux ions et aux molécules organiques et contrôle les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la bactérie.

La partie intermédiaire, la paroi mycobactérienne, est composée d'un **complexe d'acides mycoliques, d'arabinogalactane et de peptidoglycane (MAPc)**, une macromolécule géante entourant entièrement la cellule bactérienne, à l'extérieur de la membrane plasmique. Elle est constituée de peptidoglycanes (oligosaccharides formés à partir d'unités disaccharides de *N*-acétyl-glucosamine et d'acides *N*-glycolyl-muranique réticulés

par de petits peptides) liés à l'arabinogalactane (complexe polysaccharide branché composé de sous-unités arabinose et galactose). Enfin, sur l'extrémité galactose de l'arabinogalactane sont branchés des acides mycoliques (acides gras à longue chaîne α -ramifiés et β -hydroxylés) (Figure 5). La faible fluidité de la membrane est due à la longueur variable des acides mycoliques ainsi qu'à leur mode de liaison à l'arabinogalactane.

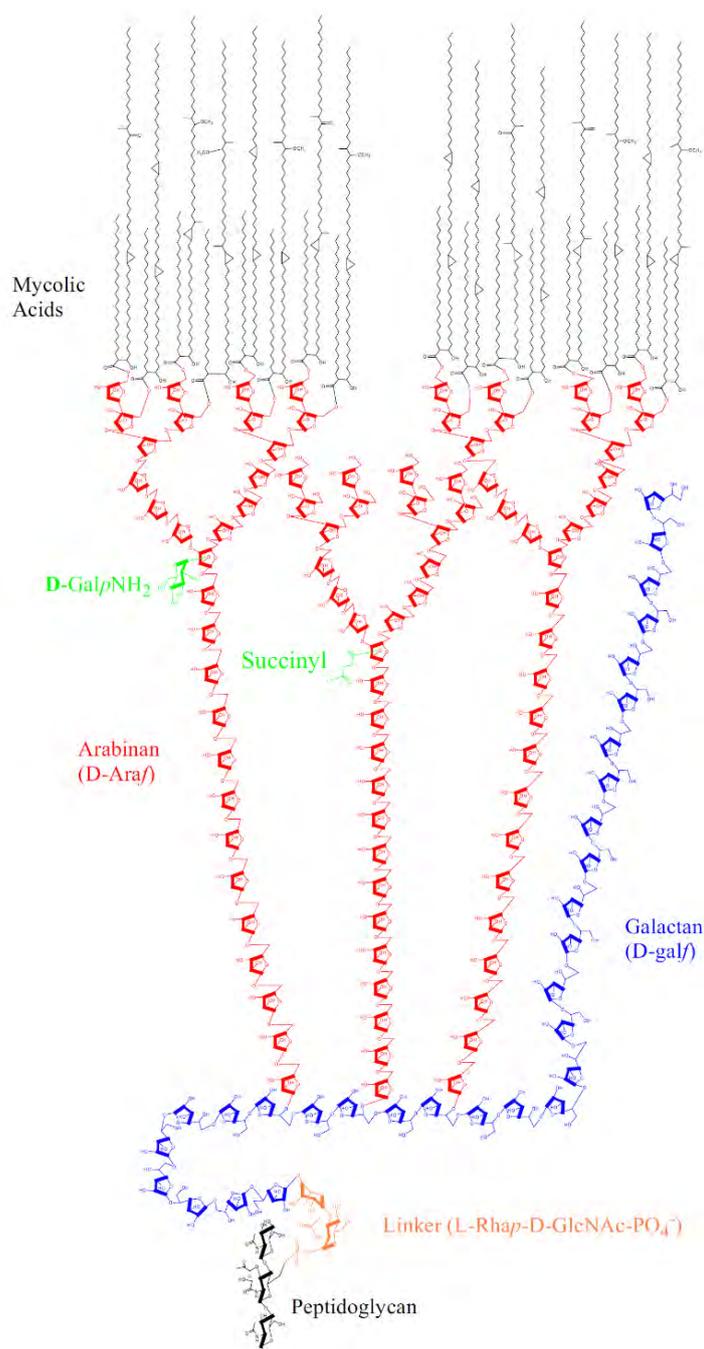


Figure 5 : Structure du complexe mycolyl arabinogalactane et de son mode de liaison au peptidoglycane [24]. L'arabinogalactane est composé d'une longue chaîne galactane (bleue) sur laquelle trois molécules d'arabinanes (rouge) sont fixées. Deux tiers des molécules arabinanes sont substitués par des résidus d'acides mycoliques. Des motifs succinyle et glucosaminosyle (vert) sont respectivement présents sur un tiers des chaînes d'arabinanes.

La partie supérieure de la paroi mycobactérienne est formée de lipides libres plus ou moins longs qui interagissent avec les acides mycoliques. En association avec le complexe MAPc, la paroi mycobactérienne contient également de nombreux lipides libres tels que des lipomannanes, des lipoarabinomannanes ou encore des phosphatidylinositol mannosides. Ces lipides jouent également un rôle dans la virulence de bactérie MTB car ils sont susceptibles de se lier aux macrophages ou aux leucocytes et modérer la réponse immunitaire [25].

La partie la plus à l'extérieur de l'enveloppe mycobactérienne consiste en un mélange de polysaccharides, protéines et lipides formant une **capsule**. La présence notable de glycolipides, de type dimycolate de tréhalose, contribue à donner la forme en bâtonnet de la bactérie [26]. Dans les milieux de culture et probablement à l'intérieur des cellules phagocytaires, cette couche est épaisse et associée à la bactérie, alors que sous agitation, elle semble se répandre dans le milieu de culture [27].

L'ensemble de cette enveloppe mycobactérienne forme une barrière hydrophobe qui permet uniquement le passage de composés hydrophobes par dissolution dans la bicouche lipidique. Afin de permettre le passage de composés hydrophiles, la paroi mycobactérienne est composée de porines [27]. Ces canaux, intercalés au sein de la paroi mycobactérienne, permettent le passage de petites molécules hydrophiles nécessaires à la bactérie.

La figure suivante (Figure 6) restitue schématiquement les différents éléments mentionnés ci-dessus.

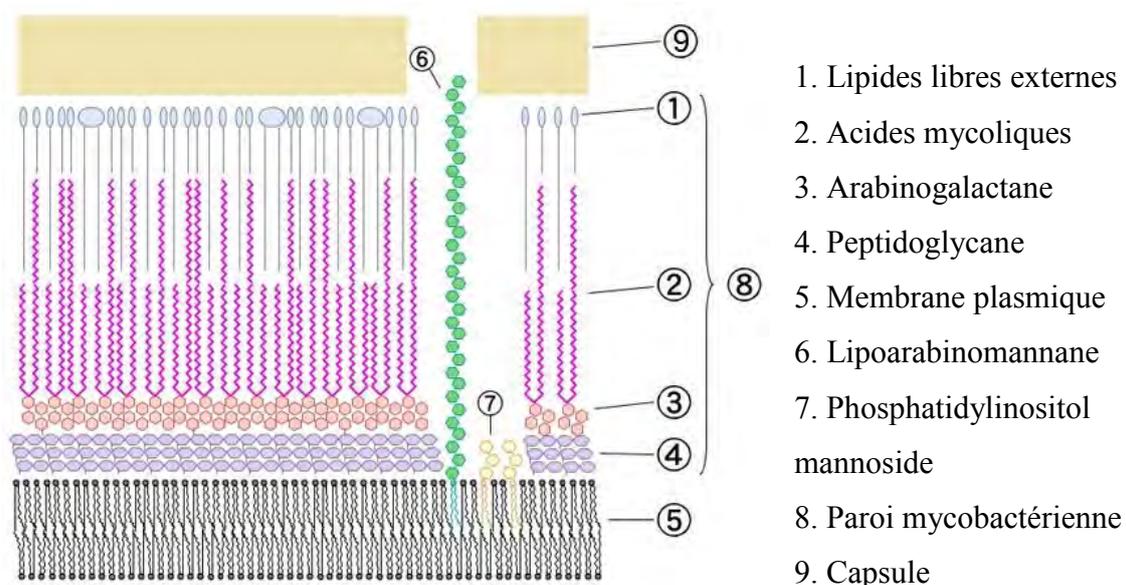


Figure 6 : Schéma de l'enveloppe mycobactérienne. Source : domaine public. © Wikimedia Commons

La complexité et la diversité de l'enveloppe mycobactérienne est un atout pour la bactérie, freinant ainsi le passage des antibiotiques vers l'intérieur de celle-ci. Toutefois, la spécificité de l'enveloppe en fait également un élément de choix pour cibler sélectivement les mycobactéries. Ainsi, l'enveloppe mycobactérienne et les protéines impliquées dans sa biosynthèse sont des cibles des médicaments spécifiques de la TB (isoniazide, éthambutol, éthionamide...) et demeurent des cibles prometteuses dans la recherche de nouveaux antituberculeux. Parmi ces antibiotiques, l'isoniazide et l'éthionamide, deux antituberculeux qui sont étudiés de façon approfondie dans ce manuscrit, inhibent la biosynthèse des acides mycoliques, composants essentiels de la paroi mycobactérienne.

I.3.2.2. Les acides mycoliques

Les **acides mycoliques** sont des acides gras à longue chaîne α -ramifiés et β -hydroxylés présents dans toutes les mycobactéries. Chez *M. tuberculosis*, la chaîne α -alkyle comprend entre 24 et 26 atomes de carbone et la chaîne β , dite chaîne méromycolique, plus longue, est composée de 54 à 63 atomes de carbone (Figure 7) [28].

Quatre classes d'acides mycoliques sont représentées chez *M. tuberculosis* : les acides α -, méthoxy-, céto- et hydroxy-mycoliques (Figure 7) [29]. Les plus représentés (plus de 70%) sont les acides α -mycoliques contenant deux cyclopropanes de configuration *cis* sur la chaîne méromycolique. Les acides méthoxy-, céto- et hydroxy-mycoliques comportent un cyclopropyle en position proximale (P) de conformation *cis* ou *trans* et, respectivement, une fonction chimique : méthoxy, cétone ou hydroxy, en position distale (D).

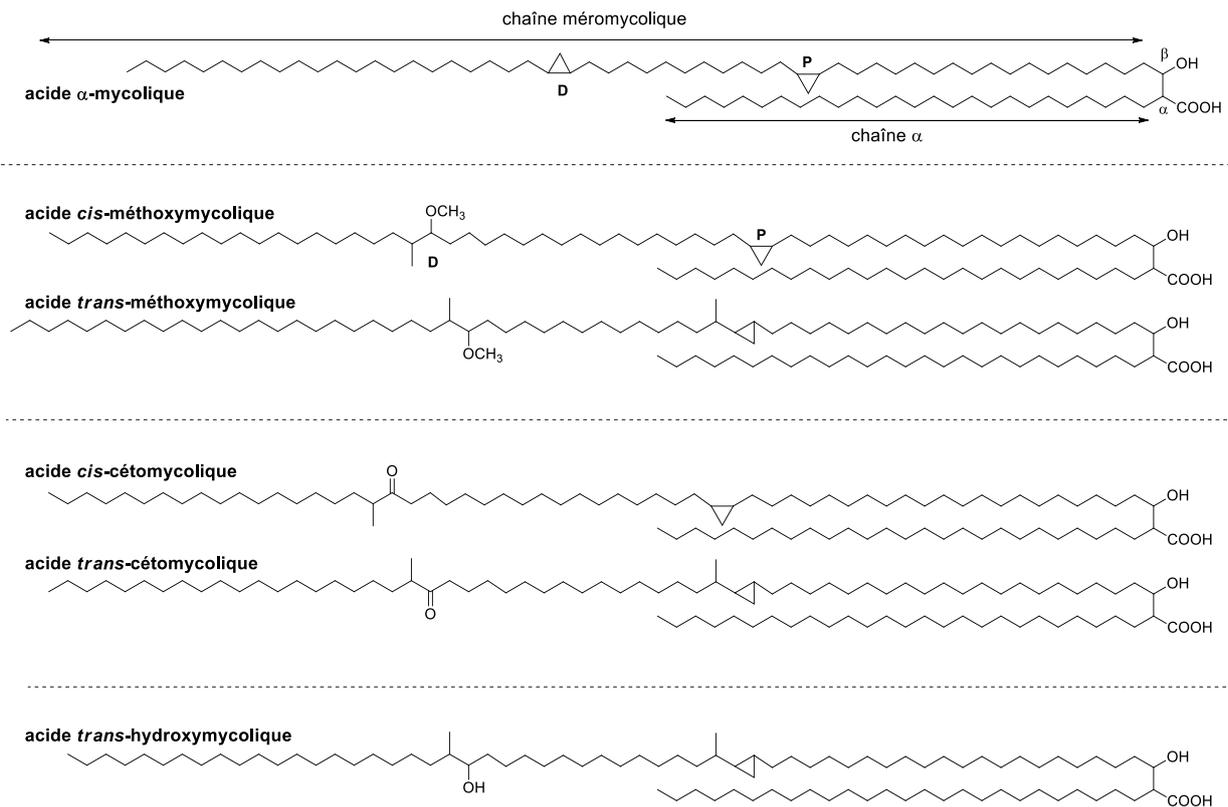


Figure 7 : Exemples de structures des acides mycoliques chez *M. tuberculosis*

I.3.2.3. Biosynthèse des acides mycoliques

La biosynthèse des acides gras mycobactériens, précurseurs des acides mycoliques, est réalisée par l'action de deux acides gras synthases (en anglais Fatty Acid Synthases, FAS) [29] :

- L'acide gras synthase de type I (**FAS-I**) est une enzyme commune aux mammifères, champignons et bactéries. Cette enzyme multi-domaines produit des acides gras avec une distribution bimodale C₁₆-C₁₈ et C₂₄-C₂₆, ces derniers correspondant à la chaîne α des acides mycoliques.
- L'acide gras synthase de type II (**FAS-II**), présente chez les plantes et les bactéries, est caractérisée par une série d'enzymes solubles monofonctionnelles. Ces enzymes sont responsables de l'élongation des acides gras issus de FAS-I et ainsi de la formation des longues chaînes méromycoliques.

Au cours de la phase d'élongation de la biosynthèse des acides mycoliques (FAS-II), des insaturations, en général deux double liaisons en configuration *cis*, sont introduites dans la chaîne méromycolique. Les mécanismes de formation de ces deux doubles liaisons sont encore méconnus et deux hypothèses sont proposées : (1) l'action de désaturases après

formation de la chaîne alkyl méromycolique ou (2) l'introduction de la double liaison par déshydratation au sein de FAS-II. Les doubles liaisons seront ensuite transformées par différentes enzymes (étapes de désaturations et modifications sur le Schéma 1). La position proximale (P) sera convertie en cyclopropyle de configuration *cis* ou *trans*, la configuration *trans* comportant systématiquement un groupe méthyle adjacent. La position distale (D) sera oxygénée pour former les classes d'acides méthoxy-, céto- et hydroxy-mycoliques [28,30].

La réunification des deux branches d'acides gras activés, issus de FAS-I et FAS-II, implique une réaction de condensation de type Claisen par l'enzyme polycétide synthase 13 (Pks13) conduisant à la formation d'un β -céto ester mycolique. Après l'action de différentes enzymes dont une réductase, l'acide mycolique sera transporté, par des transporteurs membranaires type MmpL3, du cytosol vers la paroi pour être relié au complexe peptidoglycane - arabinogalactane de la paroi.

La figure suivante (Schéma 1) résume la biosynthèse des acides mycoliques via FAS-I et FAS-II, ainsi que toutes les enzymes impliquées (en **bleu**) et les inhibiteurs connus (en **rouge**) dont les structures sont représentées en Figure 8.

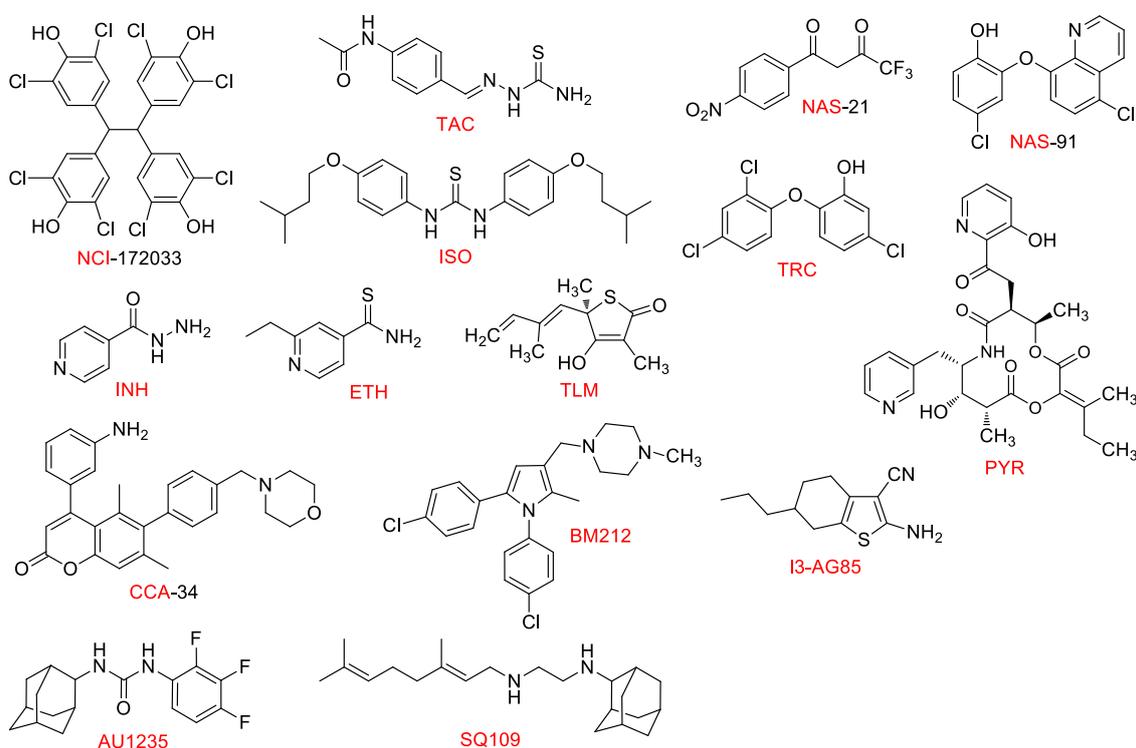


Figure 8 : Exemples de structures d'inhibiteurs d'enzymes impliquées dans la synthèse des acides mycoliques
 NCI : NCI-172033, TAC : thiacétazone, ISO : isoxyl, NAS : phénylsulfanylméthyl-[1,4]-naphthoquinones NAS-21 et NAS-91, INH : isoniazide, ETH : éthionamide, TRC : triclosan, PYR : pyridomycine, TLM : thiolactomycine, CCA : 4,6-diaryl-5,7-diméthyl coumarines, TP : composés contenant un thiophène, AU1235, SQ109, BM212, I3-AG85.

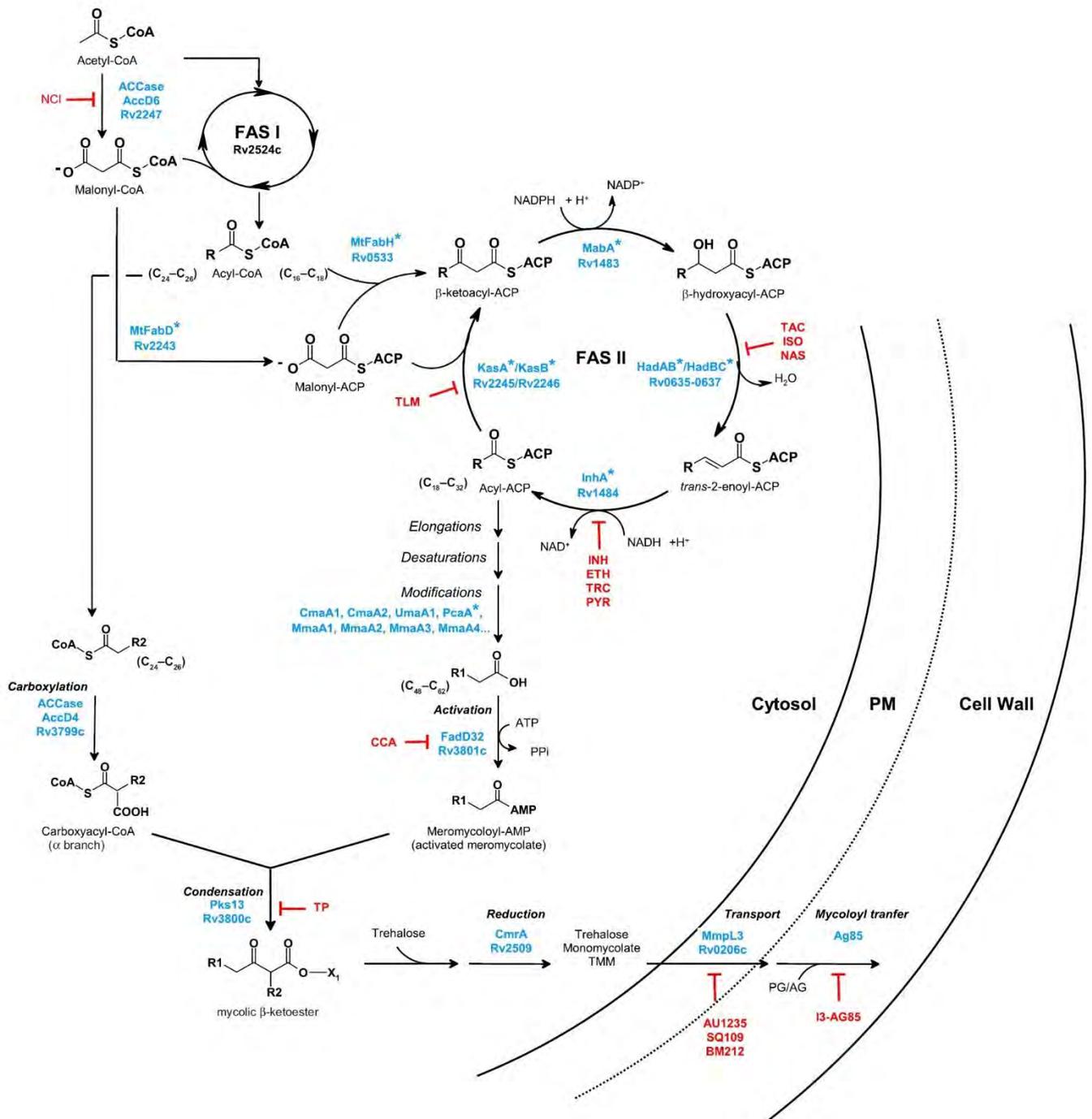


Schéma 1 : Biosynthèse des acides mycoliques extrait de [29]

Ce schéma représente les différents synthons ainsi que les protéines (bleu) impliquées dans la biosynthèse des acides mycoliques. Certaines de ces protéines peuvent être régulées par l'action de protéines kinases Ser/Thr indiquée alors par un astérisque (*). Les inhibiteurs connus (rouge) ainsi que les étapes inhibées sont indiquées sur le schéma. NCI : NCI-172033, TAC : thiacétazone, ISO : isoxyl, NAS : phénylsulfanylméthyl-[1,4]-naphthoquinones NAS-21 et NAS-91, INH : isoniazide, ETH : éthionamide, TRC : triclosan, PYR : pyridomycine, TLM : thiolactomycine, CCA : 4,6-diaryl-5,7-diméthyl coumarines, TP : composés comprenant un thiophène, AU1235, SQ109, BM212, I3-AG85. Les structures sont présentées en Figure 8.

I.3.2.4. L'énoyl-ACP réductase de *M. tuberculosis* : *InhA*

Au sein de FAS-II, parmi les cibles potentielles, l'enzyme *InhA*, une ényl-[*acyl-carrier-protein*] réductase présente un intérêt particulier. En effet, l'enzyme *InhA* a fait ses preuves en tant que cible de deux antituberculeux majeurs, l'isoniazide et l'éthionamide. De plus, cette enzyme est une cible de choix puisque l'homme ne possède pas d'enzyme orthologue à l'*InhA*, limitant ainsi les effets secondaires.

L'enzyme *InhA* est une enzyme NADH-dépendante, produite par la mycobactérie et essentielle pour la biosynthèse des acides mycoliques. Enzyme de la famille des déshydrogénases/réductases, elle catalyse la dernière étape de réduction du cycle d'élongation de FAS-II (Schéma 1 et Schéma 2) [31]. L'inhibition de l'enzyme *InhA* entraîne une altération de la paroi mycobactérienne et conduit à la lyse de la cellule mycobactérienne [32].

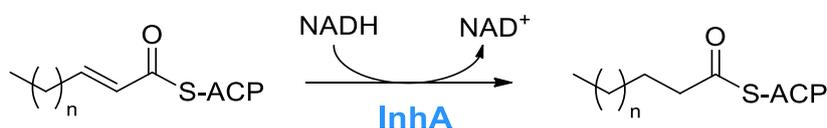


Schéma 2 : Représentation de la réaction de réduction du substrat ényl-ACP par l'enzyme *InhA*

II. Les outils de la lutte antituberculeuse

Afin de lutter contre la tuberculose, différents outils ont été mis en place pour diagnostiquer la maladie, prévenir sa propagation et soigner les personnes infectées.

II.1. Dépistage et diagnostic

La technique la plus efficace de diagnostic est l'**examen direct** des crachats et des prélèvements broncho-alvéolaires au microscope afin de rechercher des bacilles acido-alcoolo-résistants par coloration de Ziehl-Neelsen (utilisant la fuchsine) ou par coloration à l'auramine (lecture par microscope en fluorescence). Le nombre des bacilles observés sur les frottis correspond à la contagiosité du malade et un examen direct positif correspond à au moins 10 000 bactéries par mL. Toutefois, la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants ne signifie pas obligatoirement qu'il s'agit de *M. tuberculosis*.

La **culture** est la méthode la plus sensible et la plus sûre, mais son délai de réponse est long puisque le temps nécessaire pour la croissance du MTB est habituellement de 3 à 8 semaines en milieu solide et de 10 à 20 jours en milieu liquide. L'identification repose classiquement sur des caractères phénotypiques (aspect des colonies, délai de croissance,

caractères biochimiques). Un antibiogramme permet de rechercher une résistance primaire aux antituberculeux de première ligne ou secondaire lors de l'échec du traitement avec rechute.

L'OMS recommande pour les pays en développement l'utilisation de l'automate Xpert MTB/RIF, qui automatise complètement les trois processus (préparation de l'échantillon, amplification et détection) requis pour des tests moléculaires fondés sur l'amplification en chaîne par polymérase (**PCR**) en temps réel [11]. Cet automate peut être utilisé dans un laboratoire peu équipé et même dans un laboratoire mobile. Il permet une détection rapide de *M. tuberculosis* en quelques heures et il permet de diagnostiquer d'emblée la résistance à la rifampicine. Cette résistance étant rarement isolée, cet automate permet ainsi de détecter très rapidement les souches MTB multirésistantes.

Un test de **réaction cutanée à la tuberculine** (protéines obtenues à partir d'une culture chauffée de *M. tuberculosis*) peut également être réalisé. Il consiste en l'injection intradermique de 0,1 mL de tuberculine sur la face antérieure de l'avant-bras qui entraîne une réponse immunitaire chez les personnes exposées à la mycobactérie. Le diamètre de l'induration est mesuré au bout de 72 heures et le seuil de positivité correspond à une augmentation d'au moins 5 mm de ce diamètre.

Enfin, d'autres éléments de diagnostic sont également employés comme des radiographies pour détecter la présence de lésion pulmonaire.

II.2. Vaccination

II.2.1. Le vaccin BCG

L'unique vaccin utilisé en prévention d'une infection tuberculeuse chez les enfants est le BCG (Bacille de Calmette-Guérin) développé en 1921 à partir d'une souche atténuée de *M. bovis*. Il est efficace dans la prévention de la majorité des formes virulentes de MTB chez les enfants et les nouveaux nés mais son efficacité de prévention de la tuberculose chez l'adulte est limitée. L'efficacité et le faible coût du vaccin BCG en font le vaccin le plus largement utilisé dans le monde avec plus de 3 milliards de personnes vaccinées [33].

En France, la vaccination est obligatoire pour les étudiants, les assistantes maternelles, les sapeurs-pompiers et personnels exerçant des professions à caractère sanitaire ou social dans les secteurs de la santé et dans les pénitenciers. La vaccination n'est plus obligatoire pour les enfants depuis 2007 bien qu'elle soit recommandée pour certaines populations à risques. Cependant, la vaccination avec le BCG est fortement déconseillée chez les personnes

atteintes du SIDA du fait du risque de contamination par le BCG lui-même. D'autre part, l'efficacité du BCG dans la prévention de la tuberculose active chez les adultes a été contestée par plusieurs études cliniques [34], avec le plus bas niveau de protection observé dans les pays ayant la plus forte incidence de tuberculose. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'échec du BCG. L'une d'entre elles propose que le niveau de protection fourni par le BCG n'est pas assez élevé lorsque la population est en contact régulier avec le pathogène, comme dans les pays à forte incidence en tuberculose virulente. Cette sensibilisation préalable à l'agent pathogène induit un niveau d'immunité antimycobactérienne ne fournissant pas une protection significative contre l'infection par *M. tuberculosis* et portant atteinte à la capacité du BCG à persister dans les tissus hôtes après la vaccination, ce qui rend le BCG moins efficace [33].

II.2.2. Stratégies de vaccination alternatives

Pour limiter l'apparition de nouveaux cas de tuberculose dans les pays à forte incidence, la recherche de nouveaux vaccins est essentielle et, aujourd'hui, une quinzaine de nouveaux vaccins sont en développement clinique, dont trois à visée thérapeutique [35,36]. Deux objectifs sont poursuivis dans le cas de la vaccination préventive : la première vise à obtenir une meilleure efficacité que celle du BCG, tandis que la seconde a pour but de booster son efficacité.

Les vaccins préventifs en cours de développement clinique sont composés de vaccins vivants atténués et de vaccins sous-unitaires recombinants avec des protéines de fusion ou des vecteurs viraux modifiés. Les vaccins vivants atténués, développés soit en atténuant *M. tuberculosis* soit en modifiant génétiquement le BCG, ont l'avantage de persister plus longtemps dans l'hôte, pouvant ainsi fournir l'expression durable des antigènes immunodominants et donc une stimulation immunitaire plus intensive. Les vaccins sous-unitaires ne contiennent que les antigènes de *M. tuberculosis* stimulant le mieux la protection immunitaire comme des protéines recombinantes de fusion mycobactérienne ou des vecteurs viraux modifiés [37–39].

Bien que la majorité des vaccins soient conçus à des fins prophylactiques contre l'infection par *M. tuberculosis*, des recherches s'intéressent également au développement de vaccins thérapeutiques contre la tuberculose [40–42]. Le but des vaccins thérapeutiques est de renforcer le système immunitaire des patients pour éliminer les cellules infectées par *M. tuberculosis*, prévenir la réactivation de la tuberculose et réduire la durée de la chimiothérapie.

II.3. Traitements antibiotiques

Le premier antibiotique introduit pour traiter les personnes atteintes de tuberculose a été la streptomycine, découverte en 1944 par l'américain Selman Walksman [2]. La période entre 1950 et 1970 a été un point tournant dans la lutte contre la tuberculose : la plupart des médicaments antituberculeux actuels ont été découverts et avec les nouveaux schémas thérapeutiques mis en place, les scientifiques espéraient éradiquer cette maladie [43,44].

Les principales molécules constituant l'arsenal antituberculeux de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération vont être décrites brièvement dans les paragraphes suivants. Toutefois, les prodrogues utilisées dans le traitement de la tuberculose étant à la base de ce travail de thèse, elles seront détaillées dans le chapitre suivant (Chapitre III), sous la forme d'une mini-revue rédigée en anglais afin de pouvoir la soumettre pour publication.

II.3.1. Les antituberculeux de 1^{ère} ligne

Les modalités du traitement varient en fonction de la sensibilité aux antibiotiques de la bactérie isolée. Généralement le traitement curatif repose sur une association de 4 principes actifs parmi les cinq antituberculeux de 1^{ère} ligne : streptomycine, rifampicine (RIF), isoniazide (INH), pyrazinamide (PZA) et éthambutol (EMB) (Figure 9).

Le schéma classique de la quadrithérapie consiste en une seule prise orale quotidienne, à jeun, pendant les deux premiers mois, des principes actifs : rifampicine, isoniazide, pyrazinamide et éthambutol. Une bithérapie rifampicine/isoniazide est ensuite maintenue les 4 mois suivants afin d'éviter toute rechute et d'assurer une extermination complète du bacille dans l'organisme.

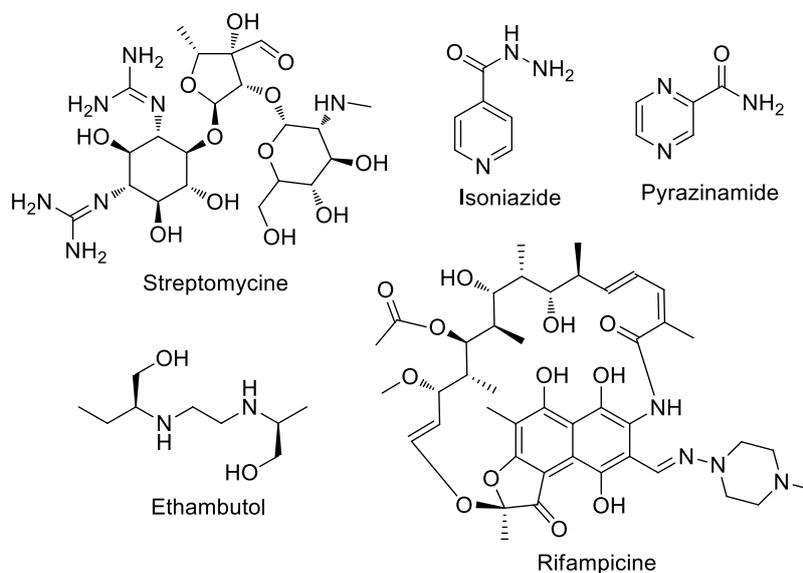


Figure 9 : Antituberculeux de 1^{ère} ligne

La Streptomycine est l'un des premiers antibiotiques utilisé dans le traitement de la tuberculose en 1946. Il a un large spectre d'action et appartient à la famille des aminoglycosides. Il est très actif sur la croissance du bacille tuberculeux avec une concentration minimale inhibitrice* (CMI) de 1,7 μM mais reste néanmoins inactif vis-à-vis des infections latentes. Il détruit les bacilles en croissance en se liant à l'ARN ribosomique 16S du bacille et interfère ainsi avec la production de protéines. Les mutations associées aux résistances à la streptomycine ont été identifiées sur les gènes codant pour l'ARNr16S (*rrs*) ou pour la protéine ribosomale S12 (*rpsL*) intervenant dans le maintien de la structure du ribosome. Ces deux mutations sont responsables de près de 70% des cas de résistance à la streptomycine.

L'isoniazide (INH), introduit en 1952, est l'un des antituberculeux les plus efficaces dans le traitement de la tuberculose avec une CMI d'environ 0,2 μM . Il n'est actif que sur les bacilles en croissance en condition aérobie. Il pénètre dans la mycobactérie en traversant la membrane par diffusion passive. L'isoniazide est une pro-drogue nécessitant d'être activée par l'enzyme mycobactérienne catalase-péroxydase KatG. Le métabolite actif, formé par liaison covalente avec le cofacteur NAD(H), cible l'enzyme InhA, une énoyl-[acyl-carrier-protein] réductase impliquée dans la synthèse des acides mycoliques qui sont des composants essentiels de la paroi bactérienne. Les principales résistances à l'INH, représentant 75% des cas, sont liées à des mutations sur les gènes *katG* (codant pour l'enzyme d'activation) ou *inhA* (codant pour l'enzyme cible) [45,46].

Le pyrazinamide (PZA) est un antituberculeux très important dans le traitement de la tuberculose, malgré une activité très modeste sur les bacilles en croissance (CMI = 130 - 400 μM). En effet, il est l'un des seuls antituberculeux à cibler les bacilles dormants résidant en milieu acide, permettant ainsi de réduire la durée du traitement antituberculeux. Cette pro-drogue, découverte dans les années 1950, est métabolisée en acide pyrazinoïque par l'action de l'enzyme pyrazinamidase, Pzase, encodée par le gène *pncA*. Son mécanisme d'action n'est à ce jour toujours pas élucidé mais plusieurs propositions sont faites dans la littérature dont une action sur la protéine ribosomale S1 (RpsA), des perturbations de la production d'énergie de la membrane de la bactérie ou encore une acidification du milieu [47]. La mutation du gène *pncA* est la cause principale de résistance au pyrazinamide.

* La concentration minimale inhibitrice se définit comme la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture d'une souche bactérienne après un temps donné de culture à 37 °C.

L'éthambutol, découvert en 1961, est un antituberculeux de 1^{ère} ligne important car il potentialise l'effet d'autres antituberculeux comme les rifamycines, les aminoglycosides et les quinolones. Sa CMI est autour de 2,5 μM et son mécanisme d'action implique l'inhibition d'une arabinosyl transférase, enzyme qui synthétise l'arabinogalactane, un des constituants de la paroi des mycobactéries. La résistance de MTB à l'éthambutol est liée dans la moitié des cas à une mutation au niveau du gène *embB* qui code pour l'arabinosyl transférase.

La rifampicine, introduite en 1972, interfère avec la synthèse d'ARN en se liant à la sous-unité β de la polymérase d'ARN mycobactérienne, enzyme encodée par le gène *rpoB* et indispensable dans la transcription et l'expression des gènes mycobactériens. Composé essentiel dans le traitement de la tuberculose, son activité CMI est d'environ 0,5 μM sur MTB. La très grande majorité des résistances à la rifampicine (96% des cas) est liée à des mutations du gène *rpoB*.

II.3.2. Les antituberculeux de 2^{nde} ligne

L'apparition de résistances aux antituberculeux de 1^{ère} ligne nécessite d'employer des antituberculeux de seconde ligne dans les cas où la polychimiothérapie n'est pas efficace. Ces médicaments sont souvent moins puissants, plus toxiques (plus d'effets secondaires), plus coûteux et moins pratiques d'utilisation lorsqu'il s'agit d'injectable. Dans le cas des tuberculoses multi-résistantes, le traitement peut comprendre jusqu'à cinq principes actifs et durer deux ans.

Les principaux médicaments de seconde ligne sont : l'acide *para*-aminosalicylique, des fluoroquinolones (moxifloxacine, levofloxacine, ciprofloxacine), des aminoglycosides (kanamycine, amikacine, capréomycine), des thioamides (éthionamide, prothionamide), ou encore la cyclosérine (Figure 10).

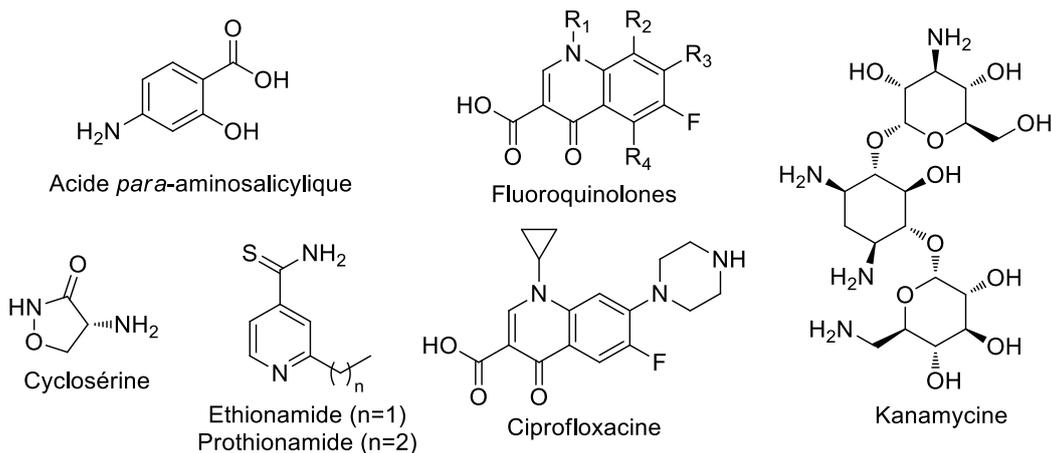


Figure 10 : Antituberculeux de seconde ligne

L'acide *para*-aminosalicylique (PAS), découvert dans les années 1940 pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, est l'un des premiers antituberculeux, avec la streptomycine, à être utilisé à la fin des années 1940 dans le traitement de la tuberculose. Son utilisation est actuellement réservée aux cas de tuberculose multi- et ultra-résistante au vu des effets indésirables qu'il engendre (troubles gastro-intestinaux). Il est considéré comme une pro-drogue qui, une fois modifié, agit en tant qu'anti-métabolite. Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse de l'acide folique via l'inhibition de l'enzyme dihydrofolate réductase. Il est également décrit pour empêcher la capture du fer par *M. tuberculosis*, le fer étant un cofacteur essentiel à la bactérie [48–50].

Les fluoroquinolones, découvertes dans les années 1980, sont représentées principalement par l'ofloxacine, la ciprofloxacine, la gatifloxacine, la levofloxacine et la moxifloxacine. Ce sont des antibiotiques à large spectre, largement utilisés pour le traitement des infections bactériennes des voies respiratoires, gastro-intestinales, des voies urinaires ou encore de certaines maladies sexuellement transmissibles (MST). La majorité des fluoroquinolones cible l'ADN gyrase, une topoisomérase de type II, enzyme essentielle à la réplication des chromosomes circulaires et donc à la réplication de l'ADN bactérien. Ils sont responsables de nombreux effets secondaires (principalement gastro-intestinal).

Les aminoglycosides, kanamycine, amikacine ou capréomycine (peptide cyclique) sont des antibiotiques qui, comme la streptomycine, se fixent aux sous-unités ribosomales, bloquant ainsi la synthèse des protéines. Ces antituberculeux sont administrés par voie intraveineuse, avec des effets secondaires au niveau de l'audition et des reins.

Les **thioamides**, éthionamide et prothionamide, sont des pro-drogues analogues de l'isoniazide, ciblant la protéine InhA impliquée dans la synthèse d'acides gras de la paroi mycobactérienne. Malgré un mécanisme d'action identique à celui de l'isoniazide, le mécanisme d'activation diffère de ce dernier puisqu'il fait intervenir l'enzyme monooxygénase à flavine EthA.

La **cyclosérine**, synthétisée en 1952, est un analogue structural de l'acide aminé D-alanine, qui est un élément essentiel à la synthèse de la paroi mycobactérienne. Il agit par compétition avec l'acide aminé D-alanine en inhibant les enzymes D-alanyl-D-alanine synthétase, alanine racémase et alanine perméase, impliquées dans la synthèse des peptidoglycanes.

II.3.3. Les antituberculeux de 3^{ème} ligne

Durant les cinquante dernières années, seulement deux molécules ont été approuvées et commercialisées comme des antibiotiques spécifiques de la tuberculose : la bédaquiline et le délamanid (Figure 11) [51,52]. Ces deux molécules, administrables par voie orale, sont recommandées pour traiter les cas de tuberculose pulmonaire multi-résistante chez l'adulte en association avec d'autres antituberculeux. Leur utilisation reste cependant limitée par manque de recul sur leurs effets à long terme.

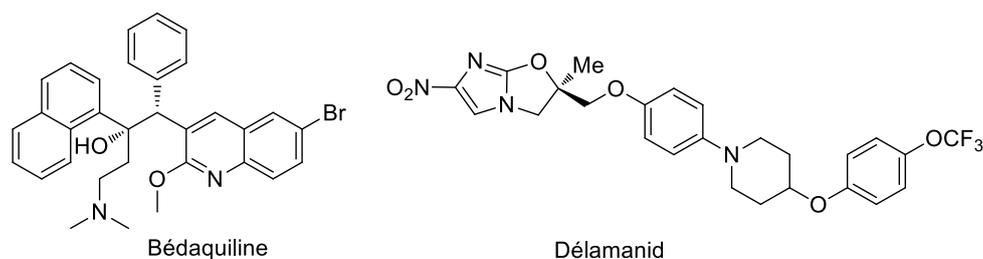


Figure 11 : Structures de la bédaquiline et du délamanid

La **bédaquiline**, développée par Janssen, compagnie pharmaceutique du groupe Johnson and Johnson, sous le nom de Sirturo[®], a été approuvée par la Food & Drug Administration (FDA) en 2012 et par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en 2014. Ce médicament est actif sur souche MTB sensible (CMI = 0,05 μM) et sur souches MTB-MDR (CMI = 0,2 μM). Il possède un mécanisme d'action original et agit en bloquant l'ATP synthase de MTB, enzyme vitale à la bactérie pour sa production d'énergie.

Le **délamanid** a été approuvé par l'EMA en 2014 et est développé par Otsuka Pharmaceutical sous le nom de Deltyba[®]. Bien que son mode d'action précis ne soit pas certain, le delamanid est reconnu pour être une pro-drogue bloquant la synthèse des acides mycoliques de la paroi mycobactérienne avec une bonne activité sur souches sauvage et multirésistante (CMI = 0,011 - 0,045 μ M) [53].

Le tableau suivant résume les différents agents antituberculeux de 1^{ère}, 2^{nde} et 3^{ème} ligne, ainsi que leur mécanisme d'action mis en jeu (Tableau 1).

Tableau 1 : Résumé des différents antituberculeux de 1^{ère} et de 2^{nde} ligne ainsi que leur mécanisme d'action, adapté de [54]

	Principe actif (année de découverte)	Origine	CMI (μM)	Mécanisme d'action	Cible
Anti-TB de 1 ^{ère} ligne	Streptomycine (1944)	Naturelle	1,7	Inhibition de la synthèse de protéines	ARN ribosomal
	Isoniazide (1952)	Synthétique	0,2	Inhibition synthèse acides mycoliques, effets sur ADN, lipides et carbohydrates ^a	Enoyl réductase (InhA)
	Pyrazinamide (1952)	Synthétique	130 - 400 pH 5,5	Rupture transport membranaire ^a	Métabolisme
	Ethambutol (1961)	Synthétique	2,5	Inhibition biosynthèse d'arabinogalactane	Arabinosyl transférase
	Rifampicine (1966)	Semi-synthétique	0,5	Inhibition synthèse ARN	Sous-unité β ARN polymérase
Anti-TB de 2 ^{nde} ligne	Acide <i>p</i> -aminosalicylique (1943)	Synthétique	1,9 - 6,5	Inhibition synthèse des acides foliques, thymidilate synthase et transport de fer ^a	Dihydrofolate réductase
	Cyclosérine (1952)	Naturelle	245	Inhibition synthèse peptidoglycane	D-alanine racémase
	Ethionamide (1956)	Synthétique	1,5	Inhibition synthèse acides mycoliques	Enoyl réductase (InhA)
	Prothionamide (1956)	Synthétique	3	Inhibition synthèse acides mycoliques	Enoyl réductase (InhA)
	Kanamycine (1957)	Naturelle	3,4	Inhibition synthèse protéines	ARN ribosomal
	Amikacine (1972)	Semi-synthétique	0,8 - 1,7	Inhibition synthèse protéines	ARN ribosomal
	Fluoroquinolones (1980s)	Synthétique	0,6 - 1,4	Inhibition réplication ADN et transcription	ADN gyrase
Anti-TB 3 ^{ème} ligne	Bédaquiline (2004)	Synthétique	0,05	Inhibition de la production d'énergie	ATP synthase
	Délamanid (2004)	Synthétique	0,01-0,5	Inhibition synthèse acides mycoliques, Production de radicaux (NO•) toxiques ^a	Inconnue

^a : Plusieurs mécanismes d'action proposés : INH [55] ; PZA [47] ; PAS [48,49] ; Délamanid [53]

En fonction des cas de tuberculose et de résistances rencontrés (MDR ou XDR), la composition et la durée du traitement seront adaptées. L'état de santé du patient ou la co-infection avec le VIH seront également pris en compte dans le choix du traitement pour éviter des effets secondaires aggravant les symptômes déjà existants.

Malgré un arsenal thérapeutique varié, il existe des cas de tuberculose résistantes à tous les antituberculeux (TDR-TB, de l'anglais totally drug resistant tuberculosis) signalés en Italie (2 cas en 2003), en Iran (1 cas en 2009) ou encore en Inde (6 cas en 2012) et en Afrique du Sud (2013) [56]. La recherche de nouveaux traitements contre la tuberculose est donc primordiale pour faire face aux tuberculoses multi-, ultra- et totalement pharmacorésistantes.

II.3.4. Nouvelles cibles et pipeline de nouvelles molécules

Parmi les nouvelles molécules en développement, le **prétomanid** (PA-824) est actuellement en phase III (Figure 12, Figure 15). Cet analogue structural du délamanid développé par TB Alliance, est également une pro-drogue de la famille des nitroimidazoles, nouvelle classe d'agents antibactériens. Cette molécule est active sur des souches sensibles (CMI = 0,4 - 0,7 μM) et multirésistantes (CMI = 0,8 - 1,5 μM) de la tuberculose et sur les formes actives et latentes (milieu anaérobie) [57]. Son mécanisme d'action, similaire à celui du délamanid, n'est pas encore élucidé et il conduit à une inhibition de la synthèse de la paroi mycobactérienne ou une intoxication respiratoire par la libération d'oxyde nitrique [58].

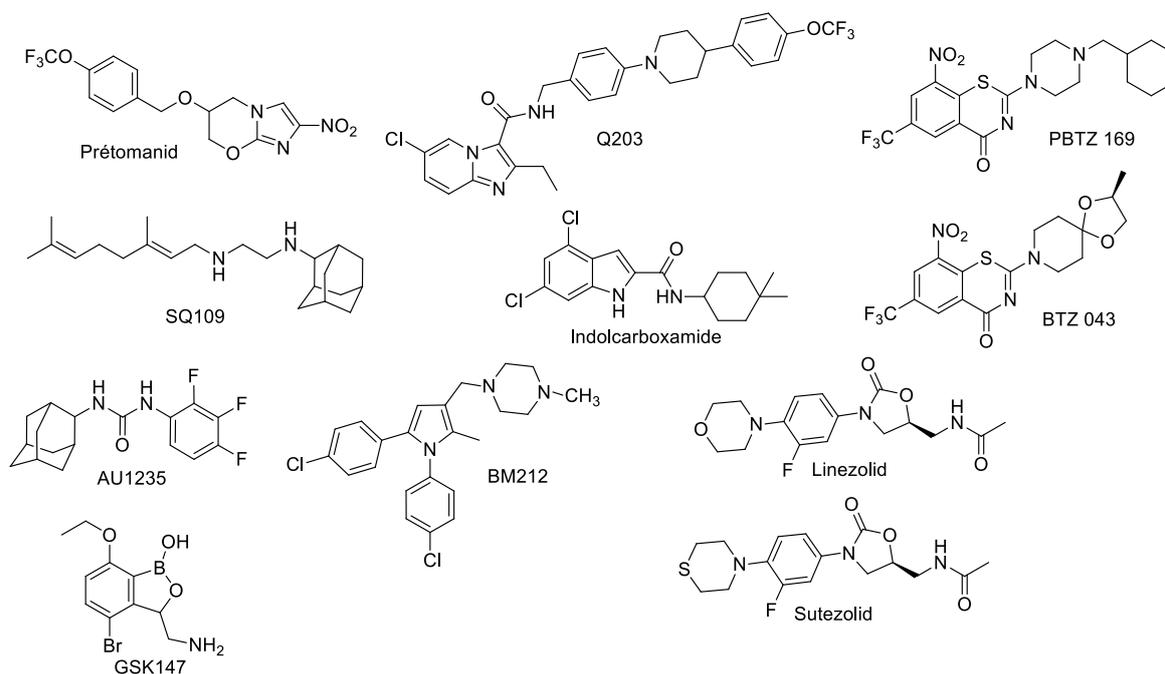


Figure 12 : Structures des composés en cours d'étude pour le traitement de la tuberculose

Différentes familles chimiques ainsi que différentes **cibles** sont en cours d'étude dont quelques exemples sont présentés ci-dessous et résumés dans les figures 12 et 13 [59] :

- les antagonistes de la **chaîne respiratoire** comme le composé Q203 (Phase I, cible le cytochrome *bc1*),

- les inhibiteurs de **DprE1**, enzyme épimérase impliquée dans la synthèse des polysaccharides arabinogalactanes, composants essentiels de la paroi mycobactérienne. L'enzyme DprE1 est la cible de benzothiazones (PBTZ169, BTZ043 en pré-clinique), de 1,4-azaindoles ou de TCA1,
- les inhibiteurs de **MmpL3**, protéine membranaire impliquée dans le transport de métabolites et dans la synthèse de la paroi mycobactérienne, dont les composés SQ109 (Phase II), AU1235, BM212 ou un composé de la famille des indolcarboxamides.
- les inhibiteurs directs de l'enzyme **InhA**,
- les inhibiteurs de la synthèse protéique de la famille des oxazolidinones ciblant l'**ARN ribosomal** comme les composés Sutezolid (Phase II) et Linezolid (Phase II),
- les inhibiteurs de **leucyl-ARNt synthétase**, enzyme essentielle pour la synthèse de protéines, comme les oxaboroles développés par GSK dont le composé GSK147.

Le schéma suivant regroupe les antituberculeux actuellement utilisés ainsi que les nouvelles cibles thérapeutiques. La majorité des études cliniques sur le traitement de la tuberculose propose des polychimiothérapies incluant les « anciens » et les nouveaux traitements.

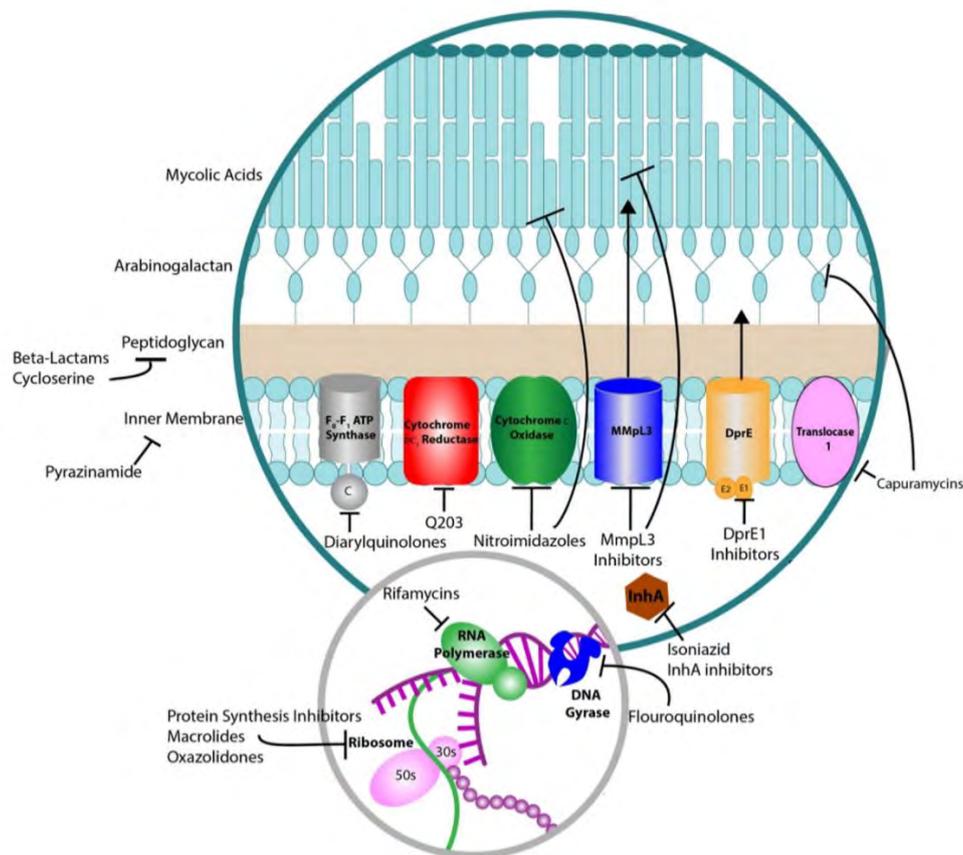


Figure 13 : Principales cibles actuelles de MTB et composés associés, adapté de [59]

Aujourd'hui, le pipeline de candidats potentiels et de nouvelles combinaisons d'antituberculeux est riche de plusieurs composés en phase clinique ou pré-clinique (Figure 14 et Figure 15). La Figure 14 présente les essais cliniques pour l'organisation TB Alliance et la Figure 15 regroupe des essais cliniques en cours dans différentes entreprises pharmaceutiques selon le groupe Working Group on New TB Drugs. Parmi les molécules en cours d'études cliniques, aucune ne présente de structure chimique originale.

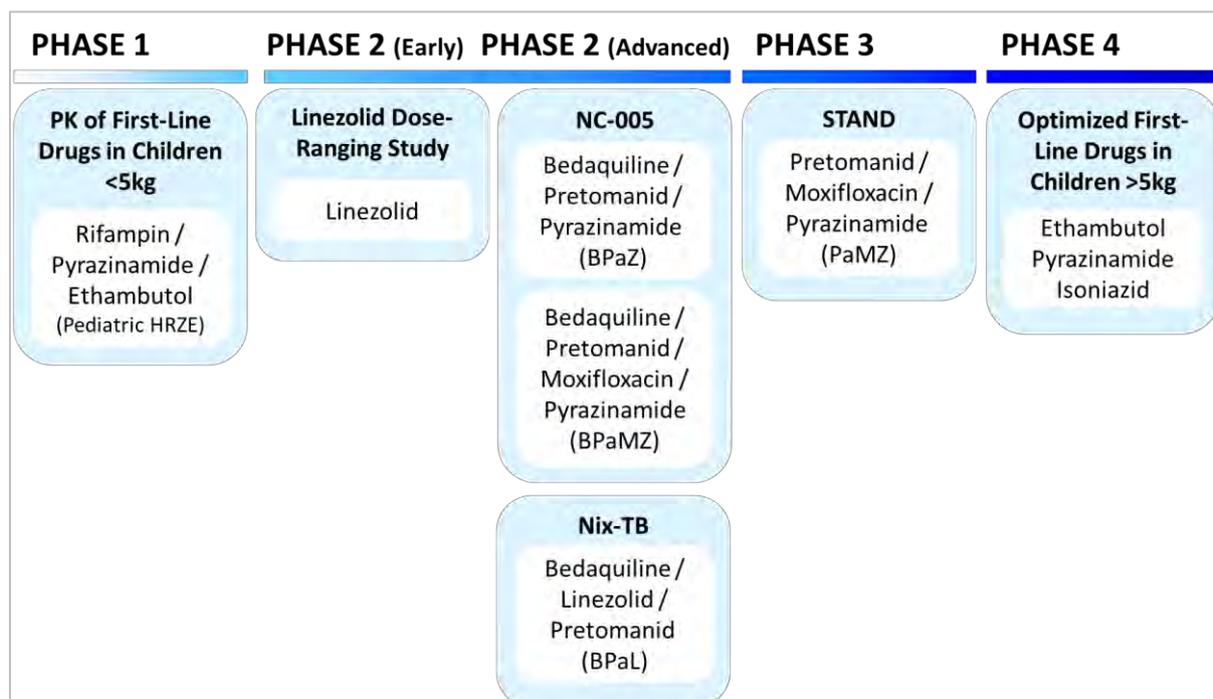


Figure 14 : Pipeline de TB Alliance pour leurs essais en phase clinique de développement.
 Source : <http://www.tballiance.org/portfolio> consulté le 21/07/2016

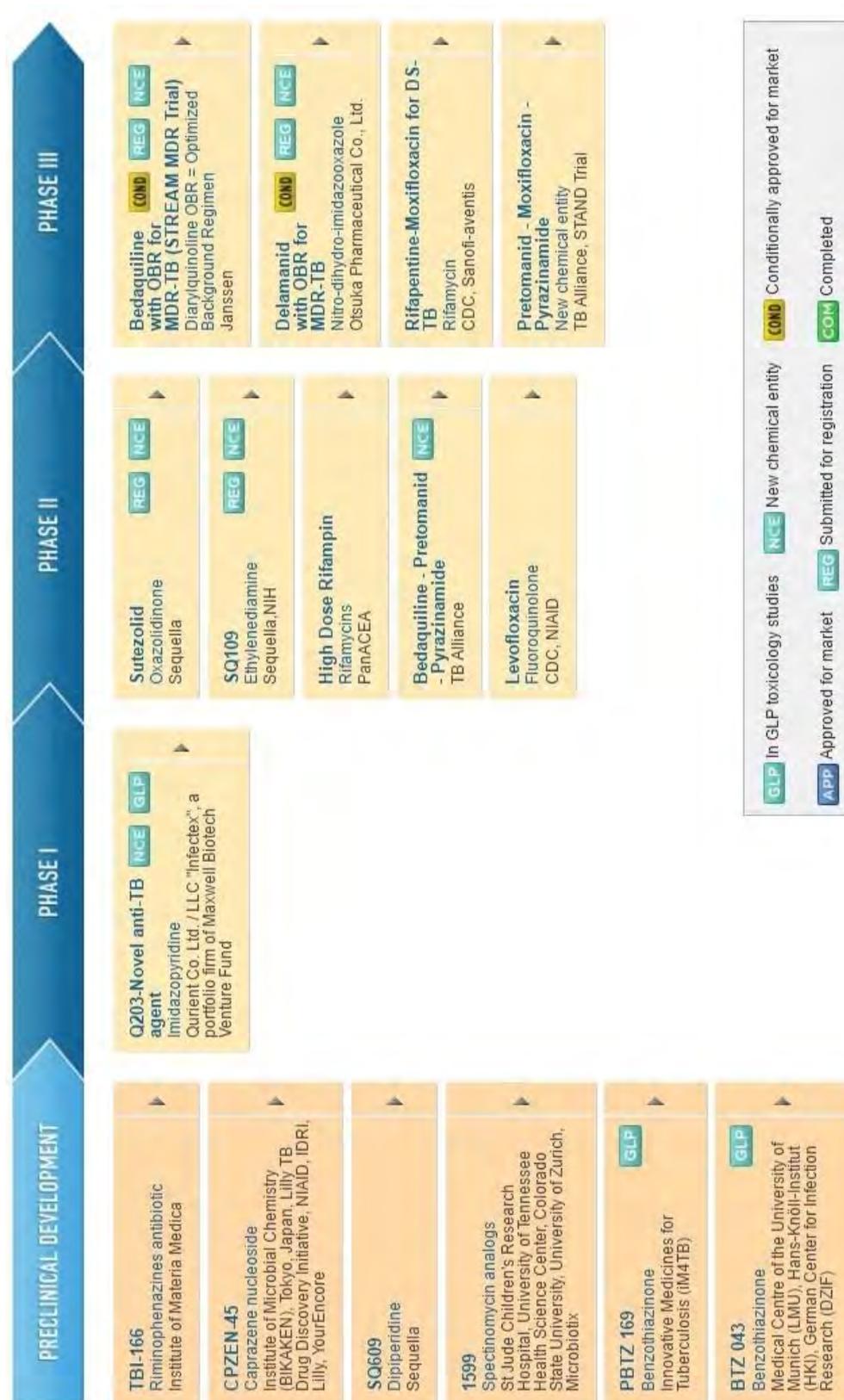


Figure 15 : Pipeline de nouveaux médicaments antituberculeux en cours d'étude, recensés par Working Group on New TB Drugs.

OBR : Optimized Background Regimen.

Source : <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>, consulté le 24/07/2016.

III. Prodrugs in tuberculosis treatment (review)

Tuberculosis, an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), is one of the leading causes of mortality related to infectious diseases in the world and it represents a serious problem since MTB strains have been developing multidrug resistance (MDR) and extensively drug resistance (XDR) to tuberculosis.

What draws our attention is that among the current treatments, prodrugs are essential elements of tuberculosis therapy and their activation and action mechanisms are not yet completely elucidated.

This section summarizes the literature data about prodrugs used in the tuberculosis treatment, regarding their mechanisms of action and of activation, as well as resistances mechanisms in MTB towards these prodrugs (Table 1). Anti-TB prodrugs can be classified according to their activation mechanism: oxidation, condensation, hydrolysis or reduction and among them oxidative activation mechanism is the most common (Figure 16).

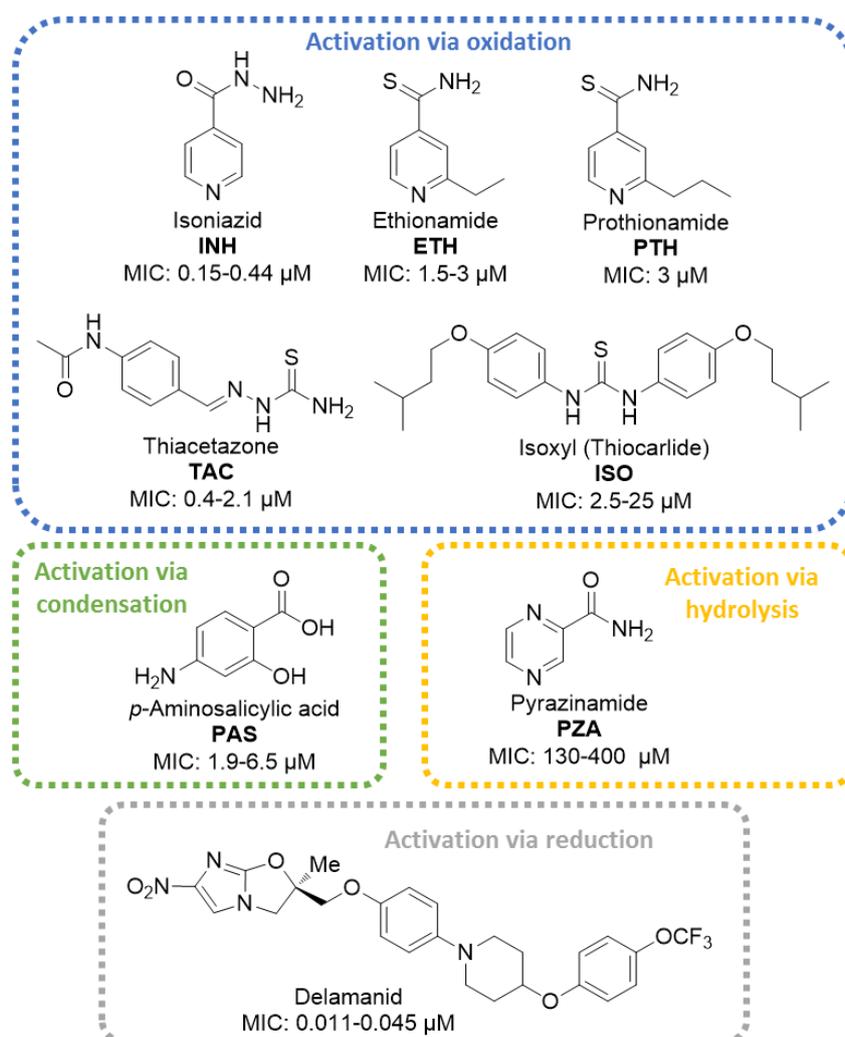
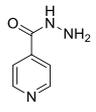
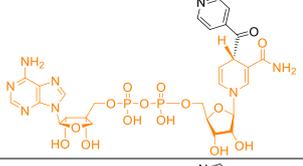
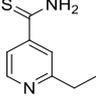
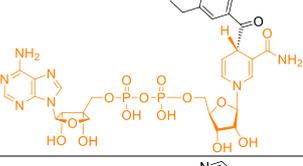
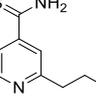
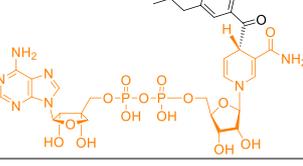
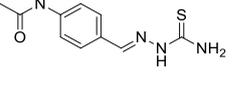
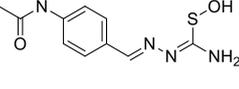
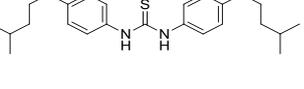
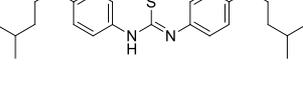
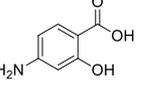
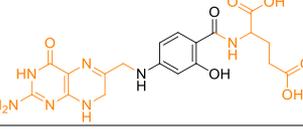
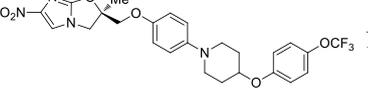
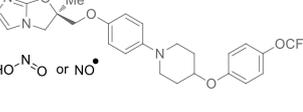


Figure 16 : Prodrugs used in tuberculosis treatment indexed by activation mechanism

Table 1: Antitubercular prodrugs, their activating enzyme and their mechanism of action

Prodrug MIC (μM)	Structure	Activating enzyme (Activation mechanism)	Active metabolite	Mechanism of action (pathway) Molecular target
Isoniazid INH 0.15 - 0.44		KatG Catalase- peroxidase (Oxydation)		Inhibition of reduction step in FAS-II. (Mycolic acid biosynthesis) Target: InhA enzyme
Ethionamide ETH 1.5 - 3		EthA Flavin monooxygenase (Oxydation)		Inhibition of reduction step in FAS-II. (Mycolic acid biosynthesis) Target: InhA enzyme
Prothionamide PTH 3		EthA Flavin monooxygenase (Oxydation)		Inhibition of reduction step in FAS-II. (Mycolic acid biosynthesis) Target: InhA enzyme
Thiacetazone TAC 0.4 - 2.1		EthA Flavin monooxygenase (Oxydation)		Inhibition of dehydration step in FAS-II and of cyclopropane mycolic acid synthases (Mycolic acid biosynthesis) Target: HadAB or HadBC
Isoxyl or thiocarlide ISO 2.5 - 25		EthA Flavin monooxygenase (Oxydation)		Inhibition of dehydration step in FAS-II elongation and oleic acid synthesis (Mycolic acid biosynthesis) Target: HadAB, HadBC and DesA3
p-Aminosalicylic acid PAS 1.9 - 6.5		FolP1 and FolC (Condensation)		Inhibition of tetrahydrofolate synthesis (Folate biosynthesis) Target: DfrA enzyme
Pyrazinamide PZA 130 - 400		PncA Amidase (Hydrolysis)		Inhibition of trans-translation, cytoplasm acidification, disruption of the redox homeostasis (Various pathways) Target: RpaS
Delamanid 0.011 - 0.045		Ddn Nitroreductase (Reduction)		Inhibition of methoxy-mycolic and keto-mycolic acids biosynthesis. Poisoning by releasing nitric oxide. (Mycolic acid biosynthesis) Target: unknown

III.1. Isoniazid

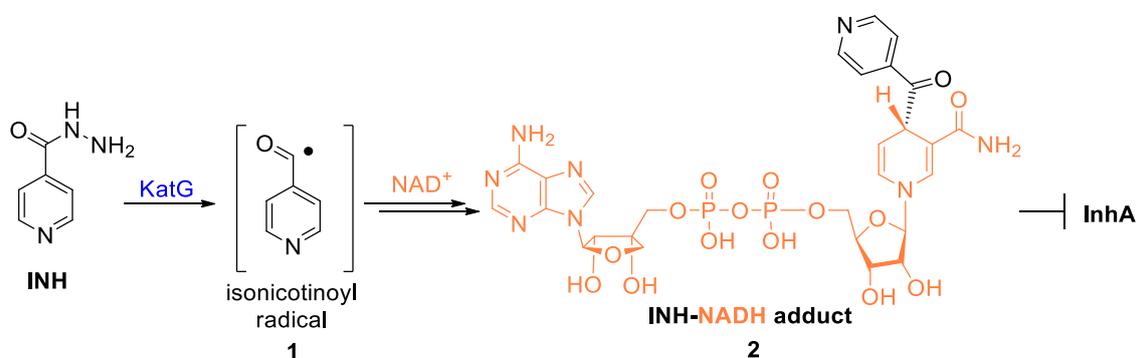
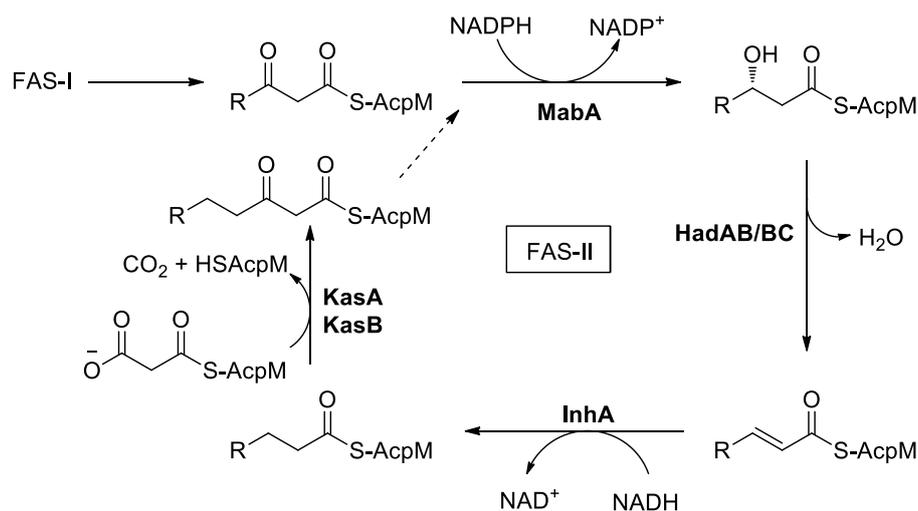
Isoniazid (isonicotinic acid hydrazide, INH) is one of the most effective, widely used and economical therapeutic agents for treating tuberculosis. It was introduced in the antituberculosis arsenal for the first time in 1952 and is used currently in frontline antitubercular multidrug therapy along with rifampicin, pyrazinamide and ethambutol [60]. INH has a simple structure containing a pyridine ring and a hydrazide group, with both components being essential for its activity. Indeed, benzoic acid hydrazide (structural analogue) or nicotinic acid hydrazide (INH regioisomer) are much less active, whereas isonicotinamide and isonicotinoic acid are inactive [61–63]. Active forms of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) are very sensitive to INH with a minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 0.15 to 0.44 μM but, unfortunately, INH shows very limited activity against dormant bacilli [64].

INH crosses MTB membranes through passive diffusion by porines present in the cell-wall [65].

III.1.1. Mechanism of action

Many research groups attempted to determine pharmacological and molecular mechanisms for isoniazid action but the complexity of the antitubercular effects of this small molecule cannot be simply explained with a single biological target [55]. In the last thirty years, a better understanding of its mechanism of action was possible thanks to the improvement of genetic tools, especially regarding mutations involved in INH resistance [66].

Currently the most convincing and accepted mechanism of action was elucidated in the early 90s: INH is a prodrug that requires oxidative activation to inhibit the final target InhA, an enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase involved in the MTB cell-wall biosynthesis. InhA is an essential enzyme of the fatty acid synthase type II system (FAS-II), which sequentially extends the C16-C18 fatty acids from FAS-I up to C56, generating thus mycolic acids precursors, which are major lipids of the mycobacterial envelope (Scheme 1) [67]. Within FAS-II, InhA catalyse the reduction of the *trans* double bond conjugated to the carbonyl group of fatty substrates using the nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) cofactor as hydrogen donor [68]. Inhibition of InhA blocks fatty acid elongation with consequently accumulation of long chain fatty acids, leading to cell death [69].



The prodrug INH is converted by the multifunctional catalase-peroxidase enzyme KatG of MTB into an active intermediate, the isonicotinoyl radical **1** (Scheme 2) [70]. The formation of the isonicotinoyl radical **1** is supported by the structure of the final metabolite **2** and the NMR structural characterisation of the isonicotinoyl radical trapped with TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl) after a manganese activation [71]. Several radicals are also observed in ESR experiments during INH oxidation by KatG enzyme, including the presumed isonicotinoyl radical **1** [62,72]. The isonicotinoyl radical **1** binds covalently to the nicotinamide adenine dinucleotide NADH cofactor to form, after a one-electron reduction step, the active metabolite, the INH-NADH adduct **2** [73]. The INH-NADH **2** adduct is a slow and tight binding inhibitor of InhA ($K_i = 0.75$ nM) [61,74]. The exact structure of INH-NADH adduct **2** in complex with the InhA enzyme was confirmed as the (4*S*)-keto-carboxamide 1,4 dihydropyridine **2** by Rozwarski and *al.* in 1998 by X-ray crystallography after $MnCl_2$ activation (Scheme 2) [73]. *In vitro*, oxidation by a biomimetic system, with manganese (III) as oxidant, shows the formation of several INH-NAD adduct forms (dihydropyridine or pyridinium with open or cyclic structures and different configurations).

However, only the (4*S*)-keto-carboxamide 1,4 dihydropyridine (INH-NADH) **2** is crystallised in the InhA enzyme and it is also the most efficient InhA inhibitor among all isolated INH-NAD adducts [31,75–77].

This mechanism is consistent with mutations related to INH resistance observed in clinical MTB isolates, which display in approximately 75 - 85% of cases, *katG* or *inhA* gene mutations [45,46]. However, other mechanisms have been proposed in the literature and the complexity of the antitubercular effects of INH and associated resistances promote the idea of complementary mechanisms [55].

According to Ducasse-Cabanot *et al.*, regarding FAS-II disruption, the isonicotinoyl radical formed during INH activation can also react with the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) cofactor and inhibit, *in vitro*, the MabA enzyme, which is structurally and functionally related to InhA [78]. MabA protein, NADPH-dependent β -ketoacyl-ACP reductase, catalyses the second step of FAS-II elongation cycle (Scheme 1). The active metabolite formed between Mn^{III}-activated INH and the MabA cofactor is an INH-NADP adduct. However, *in vivo*, INH-NADP adduct formation and MabA inhibition are awaiting demonstrations [79]. According to Wang *et al.*, the INH-NADP adduct can also inhibit, *in vitro*, the *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase (DHFR), an enzyme essential for nucleic acid synthesis [80]. Nevertheless, overexpression of DHFR, *in vivo*, did not confer any resistance to INH and INH-NADP adducts were not observed *in vivo* [81]. The INH-NAD(P) adducts could also interact with different targets and be involved in inhibition of a wide range of cellular processes but, *in vivo*, evidences are missing.

Another mycolic acid synthetic enzyme proposed as an INH target is the KasA enzyme, also involved in the FAS-II complex (Scheme 1). *M. tuberculosis* strains treated with INH overexpress KasA and the formation of a covalent complex consisting of KasA and AcpM (acyl carrier protein of MTB) is observed but KasA (or AcpM) are not direct targets of INH [82–84].

Finally, in 2006, Vilcheze *et al.* establishes InhA as the primary target of INH action by transferring clinically observed mutations, such as *inhA*(S94A) into wild-type mycobacteria and confirms that InhA inhibition via INH-NADH adduct is the main mechanism of action of INH [85].

Another mechanistic proposition is the free radical formation (in particular NO• generation) during INH oxidation, these radical species acting as antimycobacterial agents. This is however not relevant with mutations inducing resistances [86–88].

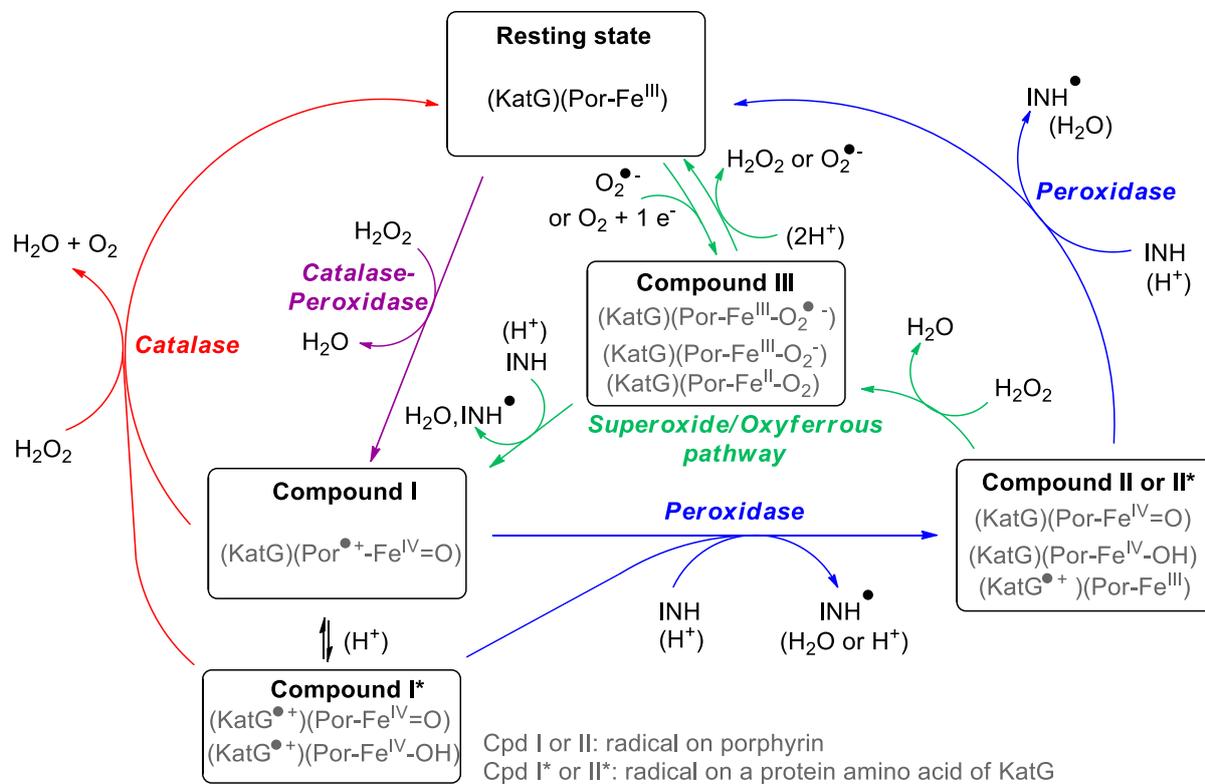
To conclude, the most accepted mechanism is the formation of INH-NADH adduct after INH activation by the KatG enzyme and the inhibition of InhA protein by this adduct [55].

III.1.2. INH activation mechanism by KatG enzyme

The activating enzyme KatG, encoded by the *katG* gene, is a multifunctional catalase-peroxidase enzyme. Catalase-peroxidases are an important class of enzymes involved in the protection of bacteria and fungi against oxidative stress [89]. *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a dimeric enzyme (homodimer) with two 80 kDa subunits, each of them containing one heme group in the *N*-terminal domain, and connected by a stabilizing disulphide bridge involving the cysteine (Cys20) of each unit [90,91]. Catalases catalyse the dismutation of hydrogen peroxide ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) in a two-step process. First, the enzyme, in its resting state [(KatG)(Por-Fe^{III})], reacts with one molecule of H₂O₂ to yield an oxyferryl porphyrin π cation radical, called compound I [(KatG)(Por^{•+}-Fe^{IV}=O)] and H₂O. In the second step, the compound I reacts with a second H₂O₂ to reform the resting state and produce H₂O and O₂. The peroxidase-type reaction also transforms hydrogen peroxide into water ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{AH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{A}^\bullet$) passing through compound I as an intermediate. Two one-electron transfer reactions (reduction) steps, from an organic or metal ion electron donor, are necessary to come back to the resting state [89,92]. In the peroxidase pathway, the organic molecule AH could be INH which would be oxidized into INH[•]. Catalases-peroxidases are distinctive in catalysing both reactions with a turnover rate for catalase reaction ($k_{\text{cat}} \approx 5600 \text{ s}^{-1}$ at pH 7 and $k_{\text{cat}} \approx 9000 \text{ s}^{-1}$ at pH 5.5 - 6) faster than the peroxidatic reaction ($k_{\text{cat}} \approx 8 - 25 \text{ s}^{-1}$) [93]. Moreover, the catalase and peroxidase rates are slower than those for the monofunctional enzymes (catalases $k_{\text{cat}} \approx 54000 - 83000 \text{ s}^{-1}$ and horseradish peroxidase $k_{\text{cat}} \approx 6000 \text{ s}^{-1}$) [92,93].

INH is activated by the peroxidase pathway of KatG enzyme as strongly suggested by several studies of INH activation using external oxidants (peroxyacetic acid, *t*-butyl hydroperoxide or low levels of H₂O₂) specific for peroxidatic activation [94–98]. Unfortunately, the INH-binding site in KatG remains unknown. Indeed, no crystal structure X-ray data are available for INH in complex with MTB KatG. Various propositions are made in the literature, suggesting that INH has several binding sites: in the heme cavity or in the heme access channel (the most frequently proposed). These propositions are based on enzymatic activation studies, molecular dynamics and X-ray studies on KatG (wild-type or mutant) from different bacteria (*Burkholderia pseudomallei*, *Synechococcus elongates*...) [91,99–104].

The mechanism of dual activity of KatG remains unclear and several propositions have been made. However, some propositions are incomplete in respect of electron balance or intermediates characterization [93,96–98,105–109]. To further complicate this understanding, the structure of KatG intermediates formed during KatG catalytic cycle depends on pH and on mutation sites studied, since KatG mechanism was studied on wild-type and on several mutant KatG [95,96,110]. The following scheme collects the various proposals of the literature for the catalytic cycle of KatG (Scheme 3) [93,96–98,101,105–109]. Although the structure of intermediates, compound I and II, remains uncertain, the overall mechanism is well accepted. The formation of the compound I is common for both catalase and peroxidase activities (purple arrows in scheme). Compound I can exist in different forms regarding the position of the cation radical (on the porphyrin or on a protein amino acid) [108]. The second step of the catalase cycle to back to the resting state is represented by red arrows in the scheme. Peroxidase activity (blue arrows) occurs via the formation of a compound II intermediate and concomitant INH oxidation. Recovery of the enzyme resting state is allowed by a second INH oxidation reaction. The compound III formation is also represented (green arrows) via superoxide or oxyferrous pathway, an other pathway described for INH activation [62,95,101,111].



Scheme 3: Review of the proposed mechanisms for the activation of INH by KatG

III.1.3. Resistances to INH

Unfortunately, INH resistance appeared at the same year as his first use as antitubercular treatment (1952) [112]. The most important cause of INH resistance in multidrug resistant strains from clinical isolates of MTB is the mutation *katG*(S315T), coding for a KatG protein in which the serine residue in position 315 is substituted by a threonine. This mutation is responsible for about 42-80% of the MDR mutants even though more than 16 other mutations on KatG were found in INH-resistant clinical isolates of MTB [46,113]. Interestingly, the mutation S315T in KatG, which increases the MIC of INH of 200 fold, occurs more frequently in MDR than in INH mono-resistant strains for which mutations in *inhA* promoter are more common [46]. The mutation S315T decreases the catalase-peroxidase efficiency of the KatG enzyme and INH activation [114]. The reduction of INH activation can be explained by structural modifications (narrowing of the heme canal access) or activation disruption (alteration of the KatG catalytic cycle or modifications of the INH binding position) [95,98,115,116]. It was observed that mutants associated with a very high level of INH resistance generally showed a drastic decrease in catalase activity and in INH activation [117].

The second most common mutation found occurs in the promoter region of *inhA* causing an overexpression of InhA or, less frequently, a mutation in InhA active site decreasing its affinity for the INH-NADH adduct [118–120]. Moreover, mutations on *mabA* gene resulted also in the upregulation of *inhA* [121]. InhA mutation confers cross-resistance to the INH structurally related drug ethionamide (ETH), a second line antitubercular agent [118]. Altogether, mutations in *katG* or *inhA* gene correspond to 75 - 85% of INH resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis* [122].

Other mutations were identified in the promoter region of the *ahpC*, *ndh*, *mshA* or *kasA* genes respectively encoding for an alkylhydroperoxide reductase (AhpC), a NADH dehydrogenase (Ndh, which regulates intracellular NADH/NAD ratios), the MshA enzyme involved in mycothiol biosynthesis or a β -ketoacyl-ACP synthase of FAS-II complex (KasA) [122–126]. The direct implication of these gene mutations in INH resistance is still obscure in some cases and some resistant strains do not present mutation in any of the above mentioned genes [46]. It has therefore been proposed that other mechanisms might be involved in INH-resistance, with additional gene mutations [127].

Finally, one other factor of INH (and other drugs) resistance concerns the increase of efflux pump function, which extrude the drug to the exterior of the MTB cell [128,129].

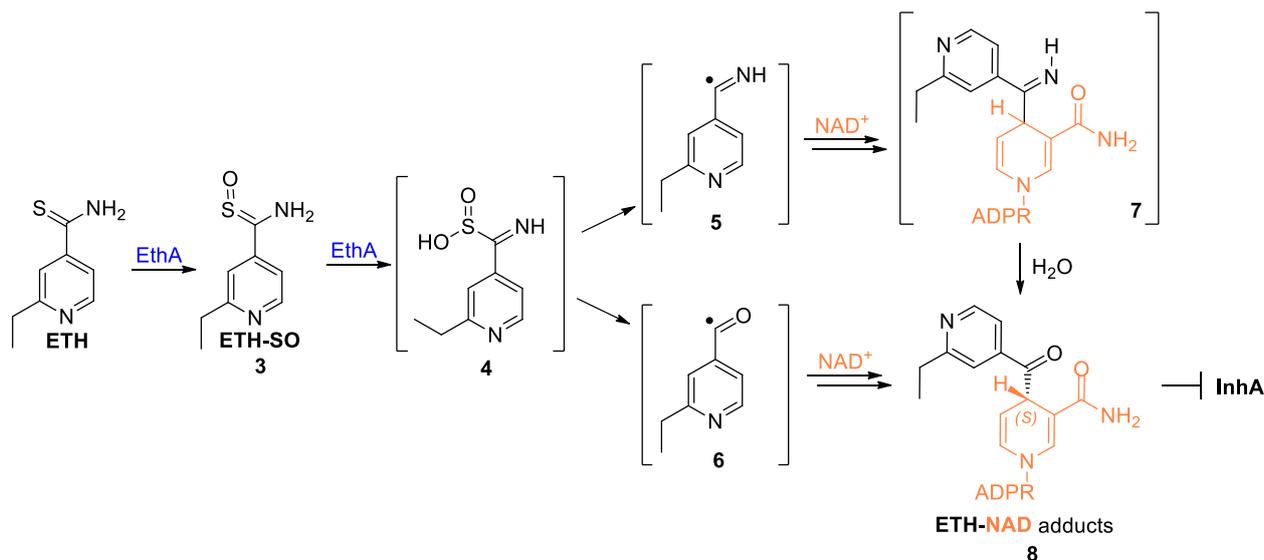
III.2. Ethionamide and Prothionamide

Ethionamide (2-ethylthioisonicotinamide, ETH) and prothionamide (2-propylthioisonicotinamide, PTH), closely related compounds, are used as oral second-line drugs in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) [130]. Although ETH is more widely available, ETH and PTH are interchangeable in TB chemotherapy regimen [131]. Even with a correct activity towards *M. tuberculosis* (MIC = 1.5 - 3 μ M), ETH and PTH are used in second line because of side effects, that are more important than those of first line drugs, particularly hepatotoxicity [132]. As other small antitubercular drugs, ETH and PTH cross MTB membranes through passive diffusion [133].

III.2.1. Mechanism of action

ETH and PTH are prodrugs that inhibit the same target as the related drug INH, the InhA enzyme, involved in the FAS-II complex of mycolic acid biosynthesis (Scheme 1) [84,118,125]. ETH and PTH are activated by the monooxygenase containing flavin adenine dinucleotide (FAD), the EthA enzyme [134,135]. Although ETH and PTH activation mechanisms still contains uncertainties, the active metabolites were identified as ETH-NADH and PTH-NADH adducts by X-ray diffraction studies of the crystal structures of the inhibitor-enzyme complex. As for the INH-NADH active adduct, the ETH-NADH and PTH-NADH adducts were found in the 4-*S* configuration in the InhA binding site (**8**, Scheme 4) [131].

In the proposed activation mechanism, the oxidation of ETH by EthA generates an *S*-oxide intermediate **3** (ETH-SO), well characterized and exhibiting the same biological activity as its parent drug (Scheme 4) [134–137]. Oxidation of the ETH-SO intermediate **3** by the EthA enzyme is necessary for the antimicrobial activity [134,136]. The oxidation of ETH-SO leads to an unisolated intermediate, proposed as a sulfinic acid intermediate **4** but for which any structural evidences were obtained [135,136]. As for INH activation, the unidentified intermediate **4** could be able to generate iminoyl **5** or aroyl **6** radicals, which then could covalently react with the NAD⁺ cofactor to form the active metabolite, the ETH-NADH adduct **8** [131].

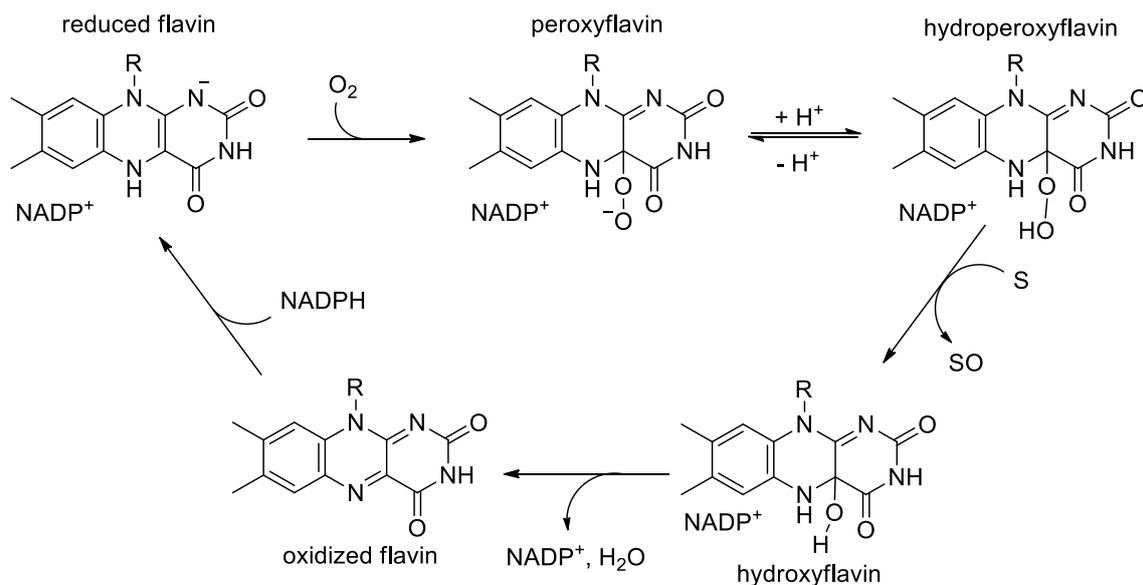


Scheme 4: Mechanism of action of ETH. (ADPR: adenosine diphosphate ribose).

III.2.2. ETH activation mechanism by EthA enzyme

EthA (encoded by the *Rv3854c* gene) is a mycobacterial flavin adenine dinucleotide (FAD) -containing monooxygenase, which is NADPH- and O₂-dependant [134–136]. This protein is membrane associated and forms oligomers in solution, leading to very low activity after purification [131,136,137]. EthA could function as a Baeyer-Villiger monooxygenase, which converts a wild range of ketones to the corresponding esters or lactones [137]. EthA also catalyses oxygenation of several thioamide or thiourea prodrugs such as ethionamide, prothionamide, thiacetazone and thiocarlide (isoxyl), thus contributing to the antimycobacterial activity of these compounds [133].

A general catalytic cycle for flavoprotein monooxygenases is presented in Scheme 5 [138]. The NADPH cofactor binds to the oxidized flavin leading to a reduced flavin which can then react with molecular oxygen to yield a peroxyflavin in equilibrium with its protonated form hydroperoxyflavin. The peroxyflavin and hydroperoxyflavin structures are stabilized in the catalytic pocket by the presence of the NADP⁺ cofactor, in complex with the EthA enzyme. The hydroperoxyflavin oxygenates the substrate (S) to yield its oxidized form (SO) and a hydroxyflavin. The latter, after a deshydration reaction with loss of water and dissociation of the NADP⁺-enzyme complex, regenerates the oxidized flavin.



Scheme 5: General mechanism of oxygenation reaction catalyzed by flavoprotein monooxygenases adapted from [138]. S, substrate; SO oxidized substrate.

The exact nature of the physiological substrate of EthA remains unknown and EthA enzyme seems not to be vital for the bacterium since ETH-resistant MTB isolates show mutations leading to non-functional EthA [137]. EthA has homologous enzymes in humans as flavin-containing monooxygenases (FMO), which oxygenate soft nucleophiles to more excretable products, corresponding to a detoxification process [132,139]. ETH metabolism by human FMO may thus contribute to the ETH toxicity and disrupt the efficacy of ETH.

The particularity of this activating enzyme towards antitubercular prodrugs is the presence of the bacterial transcriptional regulator EthR (encoded by *ethR* gene) which negatively regulates the expression of EthA enzyme [134,135,140].

Very recently, another Baeyer-Villiger monooxygenase from MTB, MymA, was discovered as an other activating enzyme for ETH [141].

III.2.3. Resistances to ETH

The main causes of MTB resistances towards ETH are mutations (about 81%) on *ethA*, *ethR* or *inhA* gene of MTB [142]. Mutations altering EthA/EthR are estimated around 37 to 76% cases of ETH resistance and are always associated with cross resistance to thiacetazone or thiocarlide, two other antitubercular compounds activated by the same enzyme [13,143]. Over-expression of EthR in mycobacteria leads to ETH-resistance whereas inactivation induces ETH hyper-sensitivity. The development of EthR inhibitors is therefore a method to

boost the EthA concentration and ETH activity, bypassing resistances linked to EthA and EthR [144–146].

As for INH, mutations altering the target protein InhA confers resistance to both INH and ETH, by modification or overexpression of InhA [85,118,120]. Mutations in *ndh* gene are also observed, increasing intracellular NADH concentration, NADH acting as a binding competitor of the INH-NADH and ETH-NADH active metabolites [125].

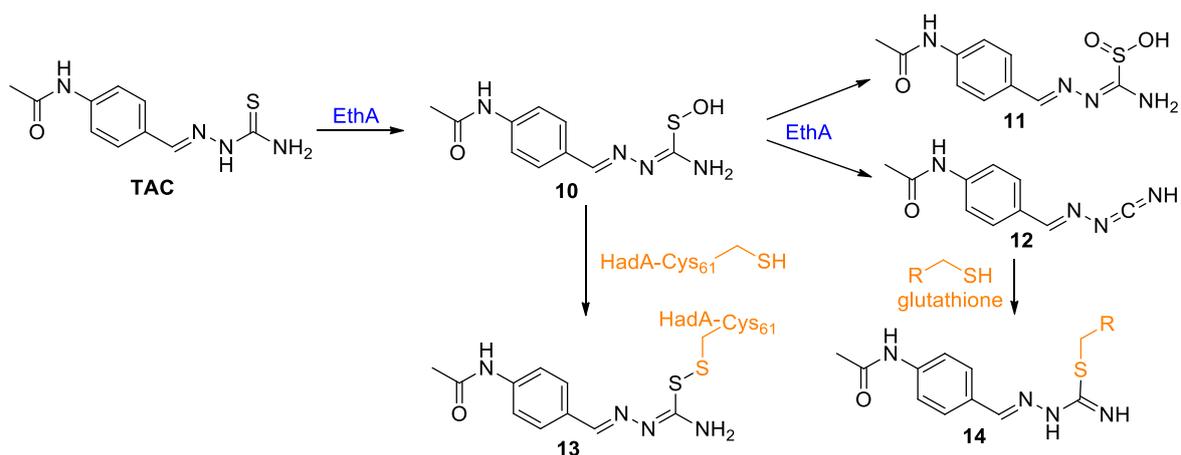
Mutations in mycothiol biosynthesis complex (*mshA*, *mshB* and *mshC* genes) are also reported to confer resistance to ETH, INH or both but the mechanism of resistance associated to these mutations is unknown [126].

III.3. Thioacetazone and Thiocarlide (Isoxyl)

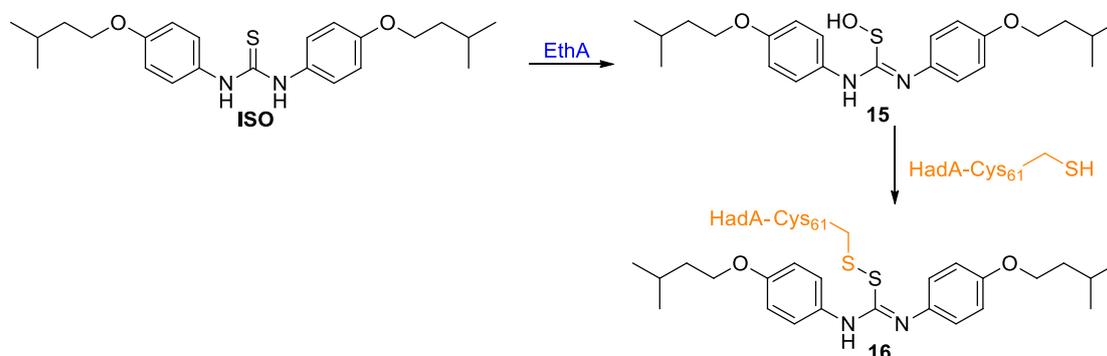
Thioacetazone (TAC, or thiacetazone, *N*-[4-[(*E*)-(carbamothioylhydrazinylidene)methyl]phenyl]acetamide,) and thiocarlide (1,3-bis[4-(3-methylbutoxy)phenyl]thiourea, or isoxyl, ISO) are oral second-line prodrugs, with a thiourea function, used only in MDR-tuberculosis treatment. TAC and ISO are active against *M. tuberculosis* wild-type and multidrug-resistant strains with similar MIC values on both strains (MIC_{TAC} = 0.4-2.1 μ M and MIC_{ISO} = 2.5-25 μ M) [147,148]. TAC is more used in Africa and South America as a cheap and effective substitute for *p*-aminosalicylic acid drug but cannot be used by patients also suffering of AIDS because of serious side effects [133].

III.3.1. Mechanism of action

As for ETH, TAC and ISO are both activated by the monooxygenase enzyme, EthA, via a *S*-oxidation of their thiocarbonyl moiety to exert their antimicrobial activity [133,135,149–151]. After EthA activation, the active metabolites proposed for TAC and ISO lead to adducts with the (3*R*)-hydroxylacyl-ACP dehydratase HadAB or HadBC through the formation of a disulphide bridge with a cysteine residue of this enzyme and the sulfur atom of the drug (Scheme 6 & 7) [149,151–153].



Scheme 6: TAC activation mechanism



Scheme 7: ISO activation mechanism

Exact mechanisms of action and targets are unknown for both prodrugs but they inhibit mycolic acid biosynthesis by targeting several common or specific enzymes [133,147,151,154]. Molecular mechanisms of action of ISO and TAC are missing due to limited understanding of all enzymes and of proteins interactions involved in mycolic acid biosynthesis [151]. Mechanisms of action of TAC and ISO present similarities for some inhibition pathways (mycolic acid synthesis for example) but show also differences since some mutations have not the same effect on TAC or ISO antimycobacterial activity [154].

TAC and ISO disturb the dehydration step of FAS-II elongation cycle [148,154–156]. More precisely, TAC and ISO inhibit the (3*R*)-hydroxylacyl-ACP dehydratase heterodimers HadAB or HadBC through, for example, the formation of a covalent complex between a cysteine residue (Cys61) of the enzyme HadA and the oxidized thiocarbonyl moiety of the drug. The resulting formation of a disulphide bridge inside the enzyme is responsible for its inactivation [151,157]. TAC also inhibits cyclopropane mycolic acid synthases, which modify double bonds on mycolic acid precursors [158]. In addition, ISO is involved in the disruption of oleic acid synthesis by inhibition of a stearoyl desaturase DesA3 [159].

III.3.2. Activation mechanism by EthA enzyme

TAC and ISO are activated by EthA enzyme, described in ETH section [134–136]. EthA oxidation leads to a *S*-oxide derivative for each prodrug, which then could react with a cysteine residue of an enzyme or undergo another oxidation to give sulfinic acid or carbodiimide derivatives (Scheme 6 & Scheme 7) [149,151–153].

TAC and ISO are substrates of human FMO and TAC carbodiimide derivative can make covalent adducts with the glutathione and thus increase the risk of oxidative stress, which may explain the cytotoxicity of the drug (Scheme 6) [149].

III.3.3. Resistances

The most common mutations associated with high-level of TAC and ISO resistances are amino acid changes in HadA dehydratase where the cysteine in position 61 is replaced by a glycine (C61G) or a serine (C61S) and more generally mutations in either HadA (at Cys61) and HadC (at Val85, Lys157 or Thr123) [151,155,156]. Other mutations involve changes in the methyltransferase MmaA4, which is required for the synthesis of keto- and methoxy-mycolic acids [156,160]. As TAC, ISO and ETH are activated by EthA enzyme, mutations on *ethA/ethR* genes lead to cross-resistance between ETH, TAC and ISO [134,135].

III.4. *para*-Aminosalicylic acid

para-Aminosalicylic acid (PAS) is a prodrug with a good antibacterial activity on MTB cells (CMI = 1.9 - 6.5 μ M) [48,50]. In the past, PAS was used as a first-line antitubercular agent in association with streptomycin and isoniazid but it was later replaced by ethambutol, a better-tolerated agent [49]. Nowadays, PAS is an important second-line antitubercular drug in multidrug therapy to treat MDR and XDR tuberculosis.

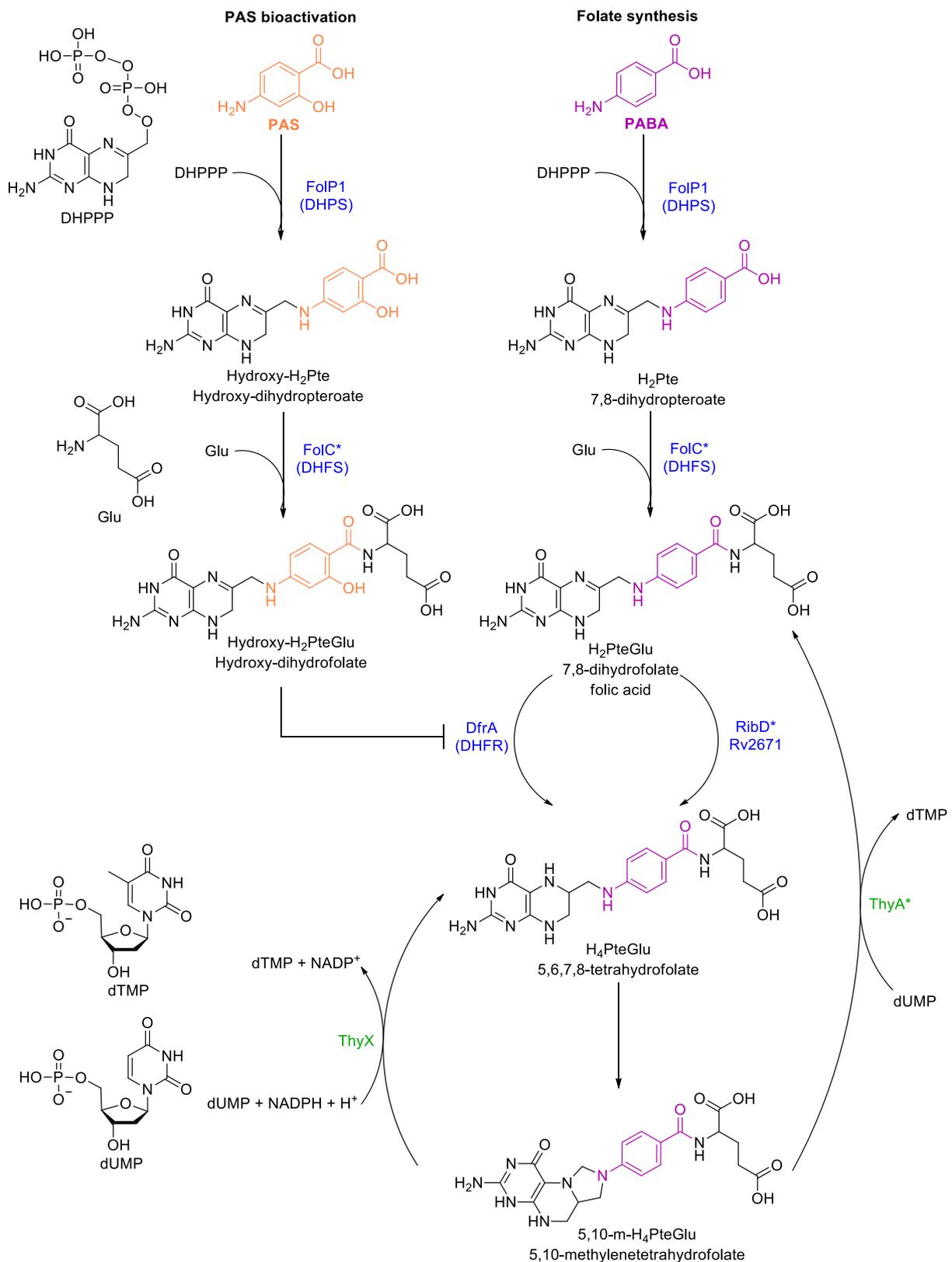
III.4.1. Mechanism of action

As other prodrugs, PAS exhibits several effects on *M. tuberculosis* and its complete mechanism of action is still unknown, even if some mechanistic proposals are made in the literature [49]. The main PAS mechanism of action is the inhibition, once activated, of the dihydrofolate reductase DfrA, encoded by *dfrA* gene, and involved in the folate metabolism for the conversion of dihydrofolate (H₂PteGlu) to tetrahydrofolate (H₄PteGlu) (Scheme 8) [49,50]. Reduced folate species, as H₄PteGlu, serve as essential cofactors in the transfer of

one-carbon units in the synthesis of several essential bacterial components as methionine, glycine, serine, pantothenate, purines and thymidine [49].

Folate synthesis starts with the production of dihydropteroate (H₂Pte) from *para*-aminobenzoic acid (PABA) and 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP) catalysed by the dihydropteroate synthase (DHPS) FolP1 (Scheme 8). In the next step, the dihydrofolate synthase (DHFS) FolC, encoded by *folC* gene in *M. tuberculosis*, catalyses the adenosine triphosphate (ATP)-dependent addition of L-glutamate to H₂Pte to generate dihydrofolate or folic acid (H₂PteGlu). H₂PteGlu is reduced by the dihydrofolate reductase (DHFR) DfrA to tetrahydrofolate (H₄PteGlu), an essential cofactor or precursor for various one-carbon-carrying folate species used in one-carbon metabolism. For example and because a such pathway is involved in PAS resistance, in Scheme 8, H₄PteGlu is converted into 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-m-H₄PteGlu), which is used for the conversion of deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP), a DNA monomer, by thymidylate synthases ThyA or ThyX. PAS, structurally related to PABA, could be bioconverted to the hydroxyl-dihydrofolate (hydroxy-H₂PteGlu) via the *M. tuberculosis* folate synthase pathway (Scheme 8) [161]. Several studies show that hydroxy-H₂PteGlu, a H₂PteGlu analogue, disturbs folate metabolism by potent inhibition of DHFR, leading to accumulation of folate-dependent metabolites as dUMP [48,161,162]. Lack of dTMP and disruption of methyltransferase functions are responsible for loss of cell viability and bactericidal effects on *M. tuberculosis*.

Another biological impact of PAS action is the disruption of mycobacterial iron acquisition by non-competitive inhibition of the salicylate incorporation into mycobacterial siderophores, mycobactin and carboxymycobactin [163–165]. Indeed PAS and salicylate are very close related compounds.



*Scheme 8: Model of PAS mechanism of action and folate metabolism in *M. tuberculosis* adapted from [48–50]* Enzymes of folate biosynthesis in **blue**, enzymes of one-carbon metabolism in **green**. Asterisk marked enzymes involved in PAS resistance in clinical isolates. Abbreviations: DHFS, dihydrofolate synthase; DHFR, dihydrofolate reductase; DHPPP, 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate; DHPS, dihydropterate synthase; dTMP, deoxythymidine monophosphate; dUMP, deoxyuridine monophosphate; Glu, glutamate; **PABA**, *para*-aminobenzoic acid; **PAS**, *para*-aminosalicylic acid; RibD, riboflavin biosynthesis protein, encoded by *Rv2671*.

III.4.2. PAS activation mechanism

PAS is activated by the same pathway as PABA. Activation of PAS, as a false substrate, by the FolP1 enzyme in presence of DHPPP leads to the formation of hydroxy-dihydropteroate (Hydroxy-H₂Pte). The latter, another false substrate, is transformed by the FolC synthase by addition of L-glutamate to generate the hydroxy-dihydrofolate intermediate (Hydroxy-H₂PteGlu). This compound can be considered as an antimetabolite which inhibits the DfrA reductase.

III.4.3. Resistances

Resistances to PAS are associated to multiple mechanisms including: a) reduction of bioactivation by FolC, b) attenuation of DfrA inhibition by RibD pathway c) attenuation of DfrA inhibition by ThyX pathway and d) active efflux pump Tap [49].

Mutations in *folC* gene, encoding PAS activating enzyme FolC, are identified as predominant mutations in PAS-resistant strains [162]. More precisely, mutations in the coding sequence of the H₂Pte binding pocket of dihydrofolate synthase FolC result in reducing dihydrofolate synthase activity and suppress the bioactivation of the PAS metabolite hydroxy-H₂Pte.

DfrA catalyses the conversion of H₂PteGlu in H₄PteGlu but another enzyme, RibD (*Rv2671*), a riboflavin biosynthesis protein, can also generate H₄PteGlu with a sufficient rate for bacterial survival [48]. In some PAS resistant clinical strains, PAS resistance is associated to overexpression of RibD that results from mutations in *Rv2671* codon and allows to overcome the DfrA-inhibition by PAS.

M. tuberculosis has the particularity, in contrast to most bacterial pathogens, to encode both ThyA and ThyX-type thymidylate synthases [166]. Thus, the conversion of dUMP into dTMP is made by two pathways: i) via ThyX, in which 5,10-m-H₄PteGlu is transformed into H₄PteGlu and ii) via ThyA, in which 5,10-m-H₄PteGlu is converted into H₂PteGlu. Both H₄PteGlu and H₂PteGlu can be re-used in folate metabolism but H₂PteGlu needs to be converted in H₄PteGlu by DfrA enzyme, which is inhibited by PAS. So, another way to decrease PAS effect is mutations in *thyA* gene leading to a non-functional ThyA, since ThyX can provide dTMP. Mutations in the targeted enzymes DfrA are also found but always in association with ThyA mutations [50].

Efflux pumps are well-known in bacterial drug resistance and a major facilitator superfamily drug efflux pump, Tap (*Rv1258c*) confers resistance to PAS in *M. bovis* [167]. Moreover, since Tap expression is induced by rifampin and ofloxacin *in vitro*, it might be

linked to MDR tuberculosis and it has been found at an elevated level in some clinical isolates of *M. tuberculosis* [168,169].

III.5. Pyrazinamide

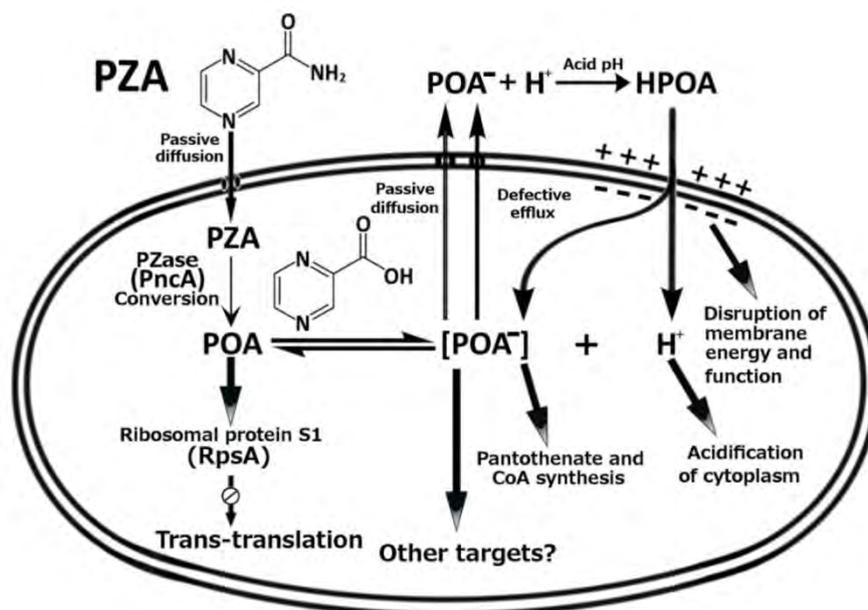
Pyrazinamide (pyrazine-2-carboxamide, PZA) is an indispensable first-line prodrug since it plays a key role in reducing TB relapse rates by targeting semi-dormant bacilli [170]. Indeed, PZA is the only drug able to inhibit semi-dormant bacilli inside macrophages where the environment is acid with pH values varying between 4.5 and 6.2 [171]. Thus, PZA is crucial in the current first-line 6-month short-course regimen and is the only first-line anti-tuberculosis drug still used to treat MDR-TB and XDR-TB and in clinical trials in association with new drugs as bedaquiline or moxifloxacin [47,172].

PZA is well-known to exhibit a strong anti-tuberculosis activity *in vivo*. However, *in vitro* studies for PZA are very controversial since the antimicrobial activity of PZA is pH dependent and evaluation of antimicrobial activity on dormant bacilli is difficult (no growth observed) [172–174]. The acid conditions required for PZA activity (pH < 6.6 outside the bacterium) are not appropriate for bacterial growth (very slow in acidic environment) and the pH of the culture medium can increase with the ammonia produced by PZA bacterial metabolism, therefore inactivating the drug [173]. The PZA activity against *M. tuberculosis* corresponds to MIC value around 130 to 400 μM at pH 5.5 [175].

III.5.1. Mechanism of action

Nowadays, the mechanism of action of PZA remains uncertain and PZA has been described to have numerous targets in the bacterium [47]. PZA crosses bacterial membranes through passive diffusion and possibly by active transport (Scheme 9) [176,177]. In cytoplasm, it is converted by PncA enzyme into pyrazinoic acid (POA), the active form of the drug. In MTB, POA (a weak acid with a pKa of 2.9) is in its anionic form because the internal pH of MTB is close to 7, even in an acidic environment [177]. POA can exit the cell by an efflux system (described as deficient for MTB) or by passive diffusion. Outside the cell, in acid environment as in macrophages, a small portion of POA anion is protonated into HPOA, which is reabsorbed and brings protons into the cell, causing cytoplasm acidification [170]. The MTB deficient POA efflux is indeed unable to counteract the effect of HPOA influx leading to accumulation of POA and H^+ inside the bacterium. This accumulation might also

disrupt the redox homeostasis resulting in oxidative stress and in cellular damages. The decrease of the membrane potential and the collapsing of the proton motive force could also affect the membrane transport function [170].

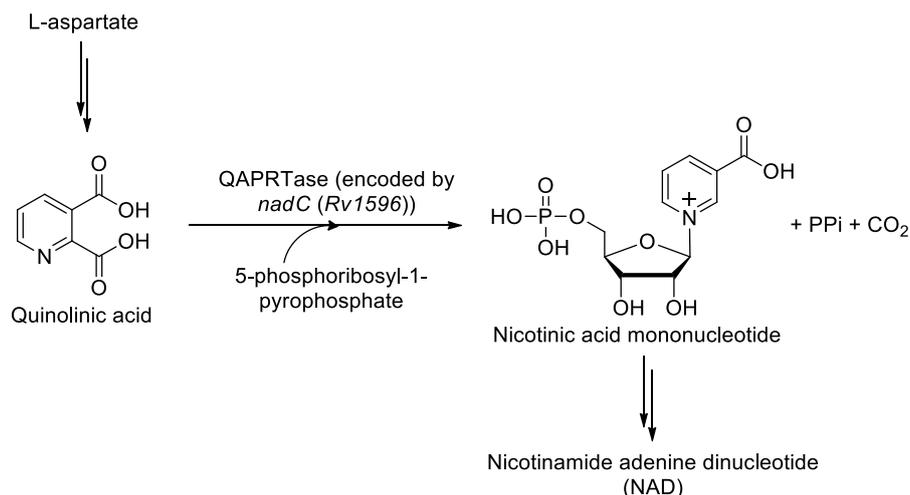


Scheme 9: PZA mechanism of action from Zhang *et al.* [47]

Several additional targets of PZA and POA have been proposed in the literature [47,178].

As a drug, PZA was suggested to disturb fatty acid biosynthesis and phosphate metabolism as a competitive inhibitor of NADPH in NADPH-binding sites of MTB FAS-I, although this suggestion has been discussed [47,179–181]. Recently, Kim *et al.* suggest that PZA or POA disturbs the *de novo* NAD biosynthesis pathway by targeting the quinolinic acid phosphoribosyl transferase (QAPRTase, encoded by *nadC*) (Scheme 10) [178,182].

As a prodrug, the active metabolite POA could also disturb many functions inside the bacterium (Scheme 9). The ribosomal protein S1 (RpsA), which is involved in the process of trans-translation, was recently identified as a new target of POA [183]. Crystal structures of the C-terminal domain of RpsA revealed that POA binds to the 30S ribosomal protein S1, inhibiting the trans-translational activity. In addition, overexpression or mutations of RpsA cause resistance to POA [183–185]. Zhang *et al.* demonstrate that pantothenate and coenzyme A biosynthesis are also targets of POA since resistances to PZA can be associated to the gene *panD*, encoding asparatate decarboxylase PanD [186,187]. This enzyme is involved in the synthesis of pantothenate and co-enzyme A precursor (β -alanine).

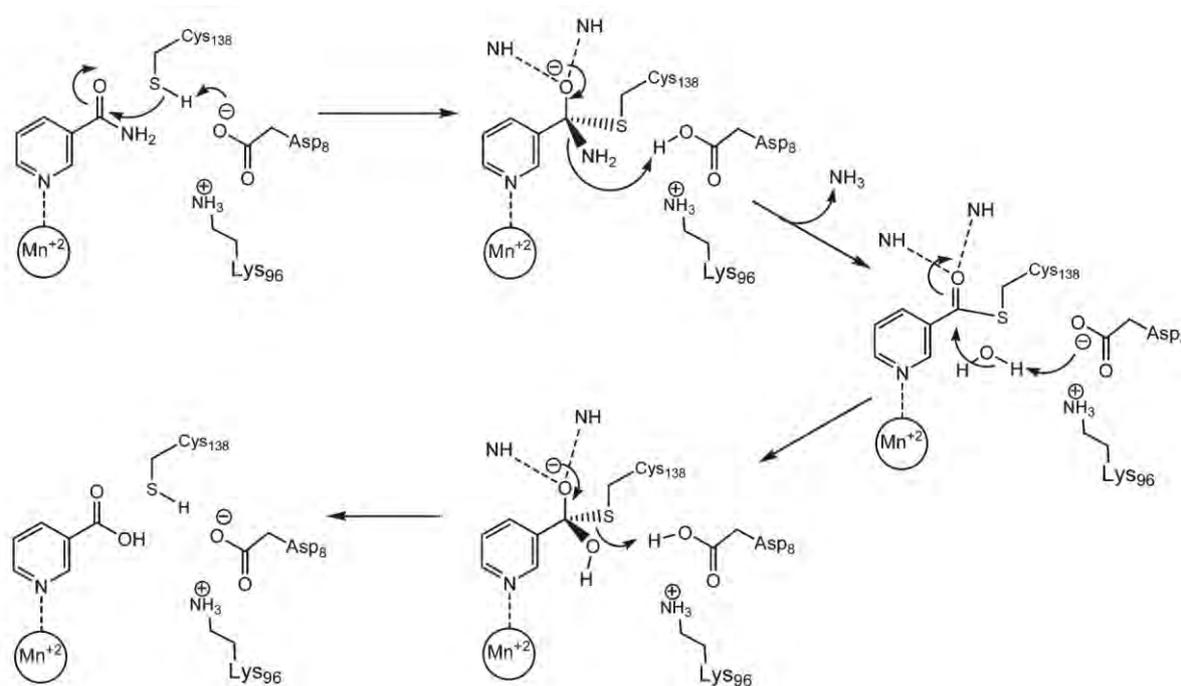


Scheme 10: Reaction catalyzed by QAPRTase in the *de novo* pathway of NAD biosynthesis adapted from [182]. PPi : inorganic pyrophosphate

III.5.2. PZA activation mechanism by PncA enzyme

In MTB, PncA is a key enzyme in the *de novo* pathway of NAD biosynthesis, recycling nicotinamide into nicotinoic acid in the secondary biosynthesis pathway [188]. PZA, a structural analogue of nicotinamide, is also activated by PncA which catalyses the formation of POA, the active form of the prodrug [189]. PncA is a cytoplasmic bacterial enzyme encoded by the *pcnA* gene. MTB PncA was crystalized for the first time in 2011 as a monomer of around 20 kDa. It is a Mn²⁺- and Fe²⁺-containing enzyme and displays a Cys138-Asp8-Lys96 motif evocating a cysteine-based catalytic mechanism [190,191].

On this basis, the mechanism for the conversion of nicotinamide into nicotinic acid, releasing ammonia, is represented in Scheme 11 [192,193]. Firstly, the nucleophilic attack upon the carbonyl of Mn²⁺-coordinated nicotinamide by the thiolate of a cysteine from the active site generates a tetrahedral intermediate. This intermediate collapses with the loss of ammonia after amine protonation and subsequent hydrolysis of the thioester bond by water. The proposed mechanism for pyrazinamide hydrolysis is extrapolated from nicotinamide hydrolysis with Fe²⁺ as coordinating metal [191].



Scheme 11: Proposed mechanism of catalysis of PncA from Seiner et al. [193]

III.5.3. Resistance to PZA

The main cause of PZA resistances are associated with *pncA* gene mutations, found in 70-97% of PZA resistant strains [47,172,178]. Mutations in the active site of PncA (Asp8, Ile 133, Ala134, Cys 138) highly affect PncA function, decreasing its enzymatic activity [191,194]. Mutations in *rpsA* and *panD* genes in *M. tuberculosis* are present in strains with a low level of PZA resistance [183,186]. Moreover, small portion of PZA resistant strains have no mutations on *pncA*, *rpsA* or *panD* genes and the mechanism of resistance in these strains remains to be determined.

Other bacterial species such as *M. smegmatis* and *M. avium* are naturally resistant to PZA due to the very effective POA exporter, although the PncA enzyme is present [178].

III.6. Delamanid

Delamanid (OPC-67683) is one of the two unique antituberculosis drugs (with bedaquiline) that were licensed after rifampicin discovery in 1967 [195,196]. It received its two global approvals by the European Medicines Agency (EMA) and by the Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor (MHWL) in 2014. Delamanid, a nitroimidazole derivative, is used in combination with an optimised background anti-tuberculosis regimen in

patients with MDR-tuberculosis when an effective treatment option cannot be composed for reasons of resistance or tolerability. It is also considered as orphan drugs.

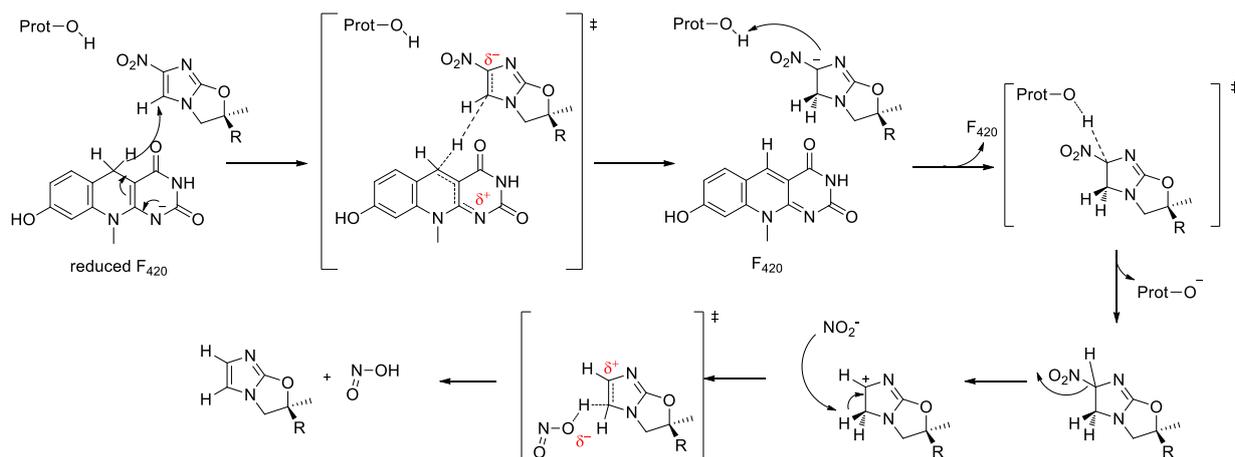
The antibacterial activity of delamanid is specific for mycobacteria and the MIC values are typically in the range of 0.011 to 0.045 μM against MTB and MDR-TB [53]. Pretomanid (PA-824), developed by TB Alliance, another nitroimidazole structurally related to delamanid is currently in clinical development for MDR-TB.

III.6.1. Mechanism of action

Although its precise mode of action is unclear, under aerobic conditions, delamanid is known to inhibit methoxy-mycolic and keto-mycolic acids biosynthetic pathways [53]. Mycolic acids are essential components of the mycobacterial cell wall and inhibition of their biosynthesis leads to cell death. Since, the synthesis of α -mycolic acid is not disturbed by delamanid, contrary to isoniazid and ethionamide, delamanid exhibits a novel mechanism of action compared to other drugs used in tuberculosis treatment. Under anaerobic conditions, delamanid also appears to kill the nonreplicating *M. tuberculosis* by poisoning bacteria with reactive nitrogen species released during its activation [52,53].

III.6.2. Activation mechanism by Ddn enzyme

Delamanid is bio-reduced by the mycobacterial deazaflavin (F_{420})-dependent nitroreductase (Ddn) encoded by *Rv3547* gene [197]. The deazaflavin F_{420} , structurally similar to riboflavin based cofactors, is involved in redox reactions as a hydride carrier associated with two electron transfer mechanisms [198]. The proposed mechanism for the activation of nitroimidazole drugs by deazaflavin F_{420} -containing Ddn nitroreductase is represented Scheme 12 [198,199]. The binding interactions, essential for the drug activation, between the nitroimidazole compound and the active site of Ddn nitroreductase are not represented. The reduced form ($F_{420}H_2$) of the deazaflavin F_{420} reacts with the nitroimidazole resulting in the formation of oxidized F_{420} and reduced nitroimidazole, which then undergoes a heterolytic C-N bond cleavage leading to reactive nitrogen species formation [198].



Scheme 12: Proposed mechanism for the activation reaction of delamanid by the reduced F₄₂₀ deazaflavin inside the Ddn active site adapted from Ellaf & al. [198].

III.6.3. Resistance

As for other prodrugs, the main risk of resistance results from mutations in the activating enzyme leading to a decrease of prodrug activation. Mutations in one of five coenzyme F₄₂₀ genes (*fgd*, *Rv3547*, *fdiA*, *fbiB* and *fbiC*) have been proposed to be involved in the resistance mechanism of delamanid [200–202]. Studies on pretomanid show that mutations, *in vitro*, in genes coding for enzymes involved in F₄₂₀ coenzyme biosynthesis and *Rv3547* lead to nitroimidazole drug-resistance [203]. The same mutations can be expected for delamanid resistant strains. Any cross-resistance between delamanid and other antituberculous agents has been detected yet.

IV. Les mécanismes de la résistance mycobactérienne aux antibiotiques

Au cours des dernières décennies, la résistance aux médicaments antibiotiques est devenue un problème croissant dans le monde entier et concerne plusieurs maladies infectieuses mortelles comme la tuberculose ou le paludisme. Malgré un arsenal d'antibiotiques conséquent et varié, les bactéries ont développé facilement et rapidement des mécanismes de résistance [204].

Les résistances sont distinguées en deux types : une « **résistance** » **naturelle** induite par les caractéristiques fonctionnelles ou structurales naturelles de la bactérie ou une **résistance acquise** suite à des mutations ou des transferts de gène.

La résistance naturelle concerne l'imperméabilité des parois des mycobactéries face à certaines familles d'antibiotiques, la présence de pompes à efflux efficaces ou l'absence d'une cible spécifique d'un antibiotique dans une bactérie [205].

La résistance acquise est développée par une bactérie vis-à-vis d'un médicament par différentes voies comme l'augmentation de la présence de pompes à efflux, l'inactivation d'un antibiotique par modification ou dégradation de celui-ci et la modification de la cible par mutation ou par protection. Certaines mutations acquises peuvent alors renforcer les propriétés de résistances naturelles de la mycobactérie.

IV.1. Les pompes à efflux

La perméabilité de la membrane et la présence de pompes à efflux font partie des mécanismes de résistance naturelle des mycobactéries contre des antibiotiques (Figure 17) [205]. Les pompes à efflux sont des protéines membranaires exportant les antibiotiques en dehors de la cellule pour maintenir une faible concentration intracellulaire. Certaines pompes à efflux ont une spécificité étroite de substrat mais beaucoup peuvent transporter une large gamme de substrats, structurellement différents, pouvant ainsi affecter toutes les classes d'antibiotiques. Les pompes à efflux sont classées en cinq familles : (1) Major Facilitator Superfamily (MFS), (2) Adenosine Triphosphate (ATP-binding cassette (ABC) Superfamily, (3) Small Multidrug Resistance (SMR), (4) Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) et (5) Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) [206].

Bien que les pompes à efflux soient naturellement présentes dans les bactéries, la résistance peut-être acquise lors de mutations, au niveau des gènes régulant l'expression de

ces pompes à efflux, entraînant une surexpression des pompes à efflux, notamment dans les cas de tuberculose multi-résistante.

Mycobacterium tuberculosis, qui possède au moins 46 pompes à efflux, est l'une des espèces de bactérie qui compte le plus grand nombre de pompes à efflux par rapport à la taille de son génome [207]. Ainsi, des cas de résistances aux fluoroquinolones, antituberculeux de 2nde ligne, sont liés à des mécanismes de pompes à efflux [208]. Des études génétiques sur des souches cliniques résistantes à l'INH et la RIF ont montré une surexpression des gènes liés aux pompes à efflux [129]. Plus récemment, des mutations sur le gène codant pour le régulateur transcriptionnel Rv0678, conduisant à une régulation positive de la pompe à efflux multi-substrat MmpL5, sont impliquées dans les résistances à la bédaquiline [209].

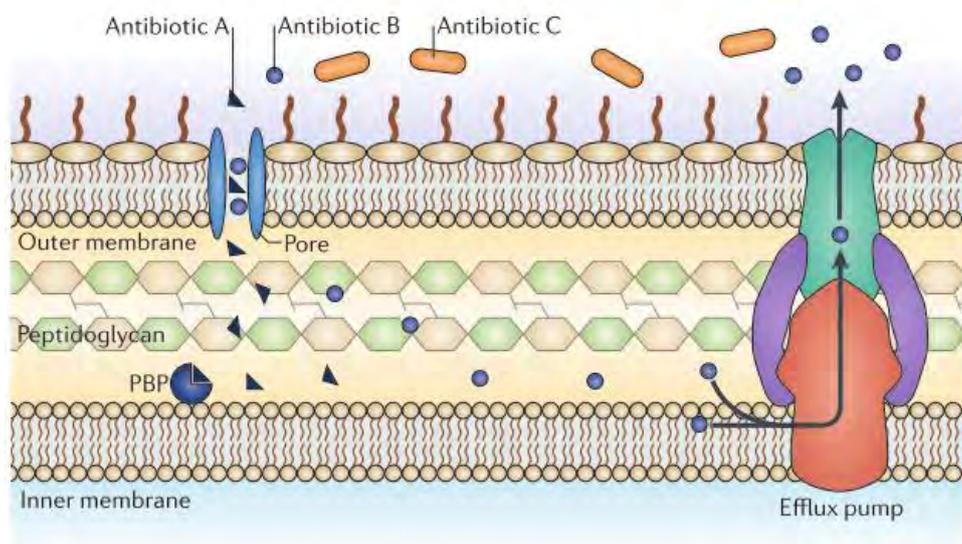


Figure 17 : Mécanismes de résistances naturelles et pompes à efflux [205]

La structure particulière de la paroi de la mycobactérie empêche certains antibiotiques de pénétrer dans celle-ci, exemple de l'antibiotique C sur le schéma. Une fois dans la bactérie, certains antibiotiques, ici l'antibiotique B, sont expulsés hors de la bactérie via les pompes à efflux. (PBP : penicillin-binding protein)

IV.2. Inactivation de l'antibiotique

Pour se protéger, les bactéries sont capables de dégrader ou de modifier une molécule non reconnue et de nombreuses enzymes assurant ce rôle ont été identifiées, agissant par hydrolyse, transfert de groupe chimique ou mécanisme d'oxydo-réduction. Ces enzymes pouvant être sécrétées à l'extérieur de la bactérie, elles agissent avant même que l'antibiotique ne parvienne à sa cible (Figure 18) [205].

Les enzymes responsables de l'hydrolyse peuvent cibler des fonctions chimiques spécifiques telles que les esters ou encore les amides (Figure 18.b). Ainsi, la β -lactamase hydrolyse, par ouverture du cycle, le lactame des antibiotiques de la famille des pénicillines et

des céphalosporines. La présence de β -lactamases chez *M. tuberculosis* explique sa résistance face à ces antibiotiques. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique, permettent de contourner cette résistance [210].

La famille la plus diversifiée d'enzymes conférant des résistances par modification de l'antibiotique est le groupe de transférases. Ces enzymes inactivent les antibiotiques, comme les aminoglycosides ou la rifampicine, par addition d'un groupement chimique (*O*-acétylation, *O*-phosphorylation, *O*-glycosylation...). La modification de l'antibiotique affecte son affinité de liaison avec sa cible (Figure 18.c). Ces modifications, nécessitant l'utilisation d'un co-substrat, sont limitées au cytoplasme. Les aminoglycosides sont particulièrement sensibles à ces modifications, leurs groupements hydroxyle et amino étant nombreux et exposés.

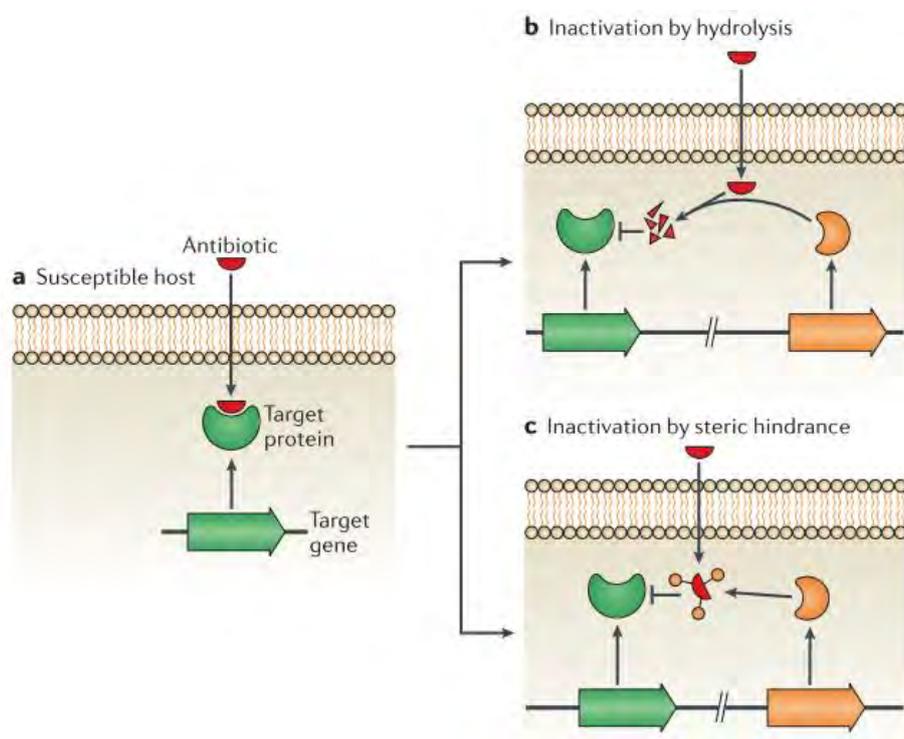


Figure 18 : Inactivation de l'antibiotique par modification directe [205]

La figure a représente le mécanisme d'action classique d'un antibiotique qui se fixe à sa cible à l'intérieur de la bactérie. Les schémas b et c montrent respectivement la dégradation ou la modification de l'antibiotique par une enzyme produite par la bactérie, avant qu'il n'ait pu atteindre sa cible.

IV.3. Modification de la cible

Par mutation

La plupart des antibiotiques se lie spécifiquement à leur cible avec une haute affinité, ce qui empêche l'activité normale de la cible (Figure 19.a). Les modifications apportées à la structure de la cible peuvent conférer une résistance en empêchant l'antibiotique de se lier

correctement, mais tout en permettant encore à la cible d'accomplir sa fonction normale (Figure 19.b). Dans le cas du traitement de la tuberculose, les cas de résistances à la drogue INH ont notamment pour origine une mutation de l'enzyme cible *InhA*, diminuant l'affinité de liaison du métabolite actif de l'INH.

Par protection

La modification ou la protection de la cible peuvent également avoir lieu sans impliquer de mutation génétique de celle-ci (Figure 19.c). Par exemple, la résistance aux macrolides et lincosamides est provoquée par la méthylation de leur cible (ribosome), empêchant ainsi les antibiotiques de se lier à celle-ci [211].

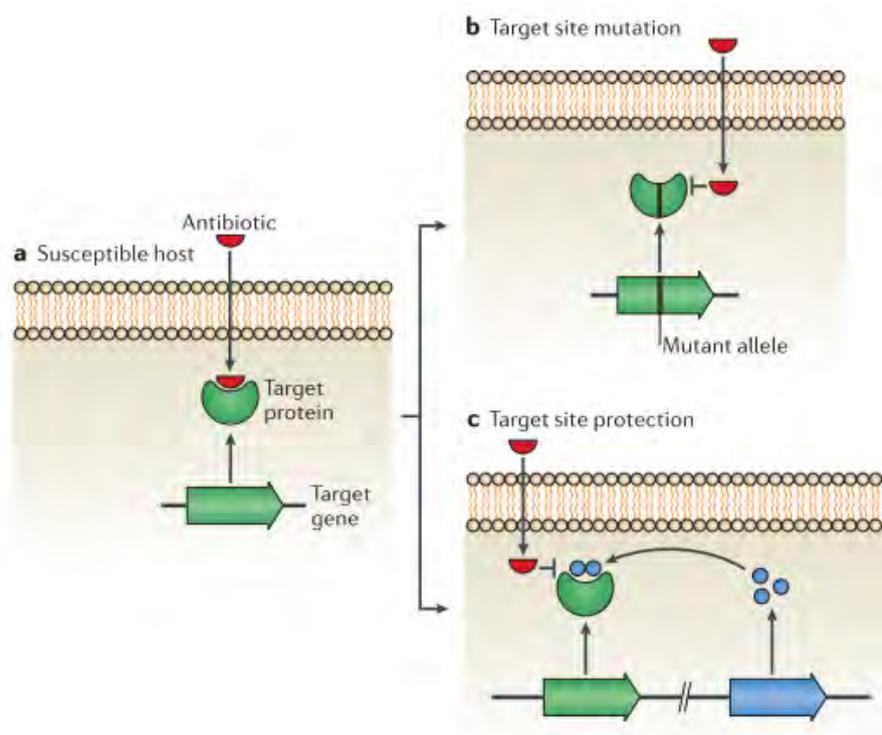


Figure 19 : Résistance par modification de la cible [205]

La figure a représente le mécanisme d'action classique d'un antibiotique qui se fixe à sa cible à l'intérieur de la bactérie. Les schémas b et c montrent respectivement la modification et la protection de la cible conduisant à une absence d'interaction entre l'antibiotique et sa cible.

V. Pro-drogues : approches étudiées dans la littérature pour contourner les résistances

Les pro-drogues (INH, ETH, PZA, PAS...) sont des composés essentiels dans le traitement de la tuberculose et les résistances associées sont majoritairement liées aux enzymes d'activation. L'activation de ces médicaments étant primordiale à leur activité antimycobactérienne, la recherche se tourne actuellement vers des approches, visant à surmonter ces résistances, que ce soit en boostant l'activation de la pro-drogue ou en contournant l'étape d'activation via des inhibiteurs directs, analogues des métabolites actifs des pro-drogues.

V.1. Boosters de l'activation de la pro-drogue

L'activation des pro-drogues étant souvent l'étape limitante dans les cas de résistance, une nouvelle approche consiste à booster leur activation en favorisant l'expression de leur enzyme d'activation et par conséquent leur activité antimycobactérienne.

Cette stratégie a été, pour le moment, uniquement développée pour l'éthionamide, pro-drogue activée par l'enzyme EthA dont l'expression est limitée par un répresseur transcriptionnel EthR (*Rv3855*) [134,135]. *In vitro*, la surexpression d'EthR entraîne une diminution de l'expression de l'enzyme d'activation EthA et par conséquent une résistance à l'ETH, alors que lorsqu'EthR est réprimé, l'activité antituberculeuse d'ETH est améliorée [140]. Par ailleurs, les effets secondaires d'ETH étant dose-dépendants, une amélioration de la bio-activation de l'ETH pourrait permettre de réduire la quantité d'ETH administrée au patient et donc les effets secondaires.

L'approche originale ainsi développée par les équipes de Alain Baulard et Benoît Deprez, depuis le début des années 2000, est de concevoir des molécules inhibitrices d'EthR et donc dites booster d'EthA. EthR réprime la transcription d'*ethA* en se liant à l'ADN et les molécules développées inhibent la capacité d'EthR à se lier à l'ADN. Ces deux équipes ont ainsi publié et breveté de nombreux inhibiteurs d'EthR développés à partir de chefs de file obtenus soit par criblage virtuel en utilisant la structure cristallographique d'EthR, soit par criblage de chimiothèque [146,212–215].

Récemment, en 2014, un répresseur naturel d'EthR a été proposé. Ainsi, la protéine kinase STPK-PknF (de l'anglais Serine/Threonine Protein Kinase) de *M. tuberculosis* diminue

l'affinité de EthR à se lier à l'ADN, par la phosphorylation d'EthR dans sa région *N*-terminale [216].

Une meilleure compréhension des systèmes de régulation des différentes enzymes (inhibiteurs, boosters ou répresseurs de l'expression des enzymes) des mycobactéries ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le choix des cibles pour des nouvelles molécules antituberculeuses. Booster les enzymes d'activation des pro-drogues est une stratégie judicieuse puisque la majorité des résistances sont dues à des mutations des enzymes d'activation mais seulement des boosters d'ETH ont été développés à ce jour.

Bien que des gènes (*furA* et *Rv2989*) ou des protéines (MDP1) aient été identifiés pour réguler négativement l'expression de l'enzyme KatG, aucun booster n'a, à ce jour, été proposé pour améliorer l'activité de l'INH [217–220].

V.2. Inhibiteurs directs de la cible de la pro-drogue

Les pro-drogues exercent leur activité antimycobactérienne via les métabolites actifs issus de leur bioactivation et les résistances liées aux enzymes d'activation empêchent la formation de ces métabolites actifs. L'une des approches développées pour contourner ces résistances est d'utiliser le métabolite actif, ou un analogue, issu de l'activation de la pro-drogue pour inhiber directement sa cible. Le métabolite actif ne peut généralement pas être utilisé en tant qu'inhibiteur direct de l'enzyme pour des raisons de perméabilité, comme pour l'acide pyrazinoïque, métabolite actif de la pyrazinamide, ou d'instabilité comme pour les adduits INH-NAD.

Cette stratégie a été développée pour les pro-drogues INH et ETH dont la bio-activation conduit à la formation d'adduits INH-NADH et ETH-NADH, inhibiteurs de l'enzyme InhA. Elle consiste à synthétiser des inhibiteurs directs de l'enzyme InhA, ne nécessitant donc pas d'activation enzymatique.

Le triclosan est un antibiotique à large spectre avec une activité modeste sur MTB (CMI = 43 μ M). Le triclosan est un inhibiteur direct de l'enzyme InhA ($K_i = 0,2 \mu$ M) dont de nombreux analogues diphenyléthers ont été étudiés (Figure 20) [221–223].

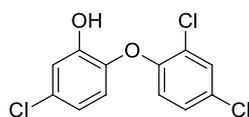


Figure 20 : Structure du triclosan

Une seconde approche concernant les inhibiteurs directs d’InhA consiste à développer des analogues structuraux de l’adduit actif INH-NADH (Figure 21.A), puisque l’utilisation des adduits eux-mêmes est impossible du fait de leur instabilité et de leur manque de perméabilité membranaire. Notre groupe s’est inspiré des adduits INH-NAD en simplifiant la partie sud de la molécule (suppression de la partie ADP, Figure 21.B) et en proposant des structures cycliques de type hémiamidal en série pyridinium (Figure 21.C) [224,225]. Toutefois, aucun de ces composés n’affecte de manière significative l’activité de l’InhA. Par ailleurs, Bonnac *et al* se sont appuyés sur le motif phénoxy-NAD en retirant la partie adénine de la molécule (Figure 21.D) mais sans succès vis-à-vis de l’activité enzymatique [226].

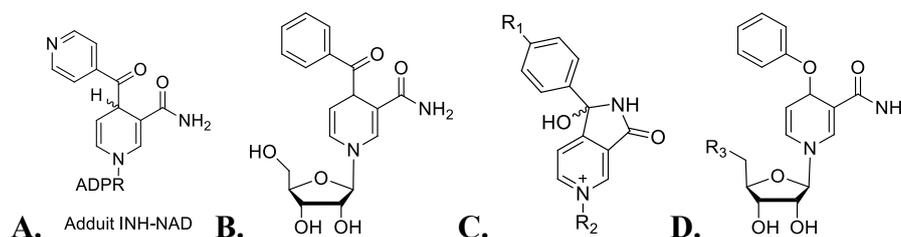


Figure 21 : Structures générales des adduits INH-NAD (A) et des adduits tronqués de INH-NAD (B, C, D) Avec R₁ = H, C₆H₅ ; R₂ : dérivés de sucre et chaînes alkyles oxygénées ; R₃ = OH, OPO(OH)₂. ADPR: adénosine diphosphate ribose.

Divers autres composés inhibiteurs directs d’InhA ont été proposés avec différentes structures chimiques de type diphenyléthers, arylamides, pyrrolodines carboxamides, pyrazoles, imidazopipéridines ou thiazoles [227–230]. Pour tous les composés proposés, l’activité inhibitrice (IC₅₀) de l’enzyme InhA varie de 0,2 à 10 μM mais la plupart des composés présentait une mauvaise activité antimycobactérienne (CMI > 45 μM), notamment sur les modèles animaux.

Des travaux plus récents au sein de notre groupe ont mis en évidence des molécules de type (aza)isoindolinone comme inhibiteur direct de l’enzyme InhA (Figure 22) [231,232]. Cependant, bien qu’étant de bons inhibiteurs de l’enzyme InhA, ces composés ne présentent pas d’activité antimycobactérienne intéressante probablement suite à une mauvaise pénétration du composé dans la bactérie.

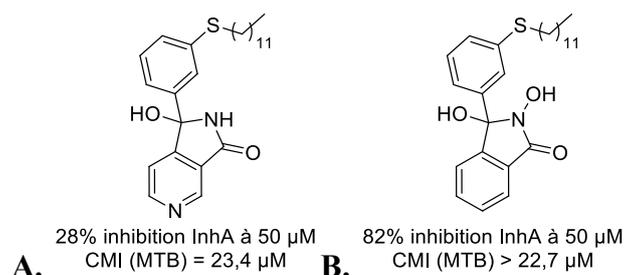


Figure 22 : Chefs de file de la série (aza)isoindolinone

Actuellement une molécule de type thiaziazole développée par GSK est en essais pré-cliniques comme inhibiteur direct d'InhA et une molécule de type 4-hydroxy-2-pyridone est en cours d'étude par Novartis (Figure 23) [59,233,234]. Récemment, l'équipe du Pr. Cole a également démontré que la pyridomycine, un composé naturel, était un inhibiteur direct d'InhA et travaille, à présent, sur le développement de dérivés de pyridomycine comme antituberculeux potentiels [235,236].

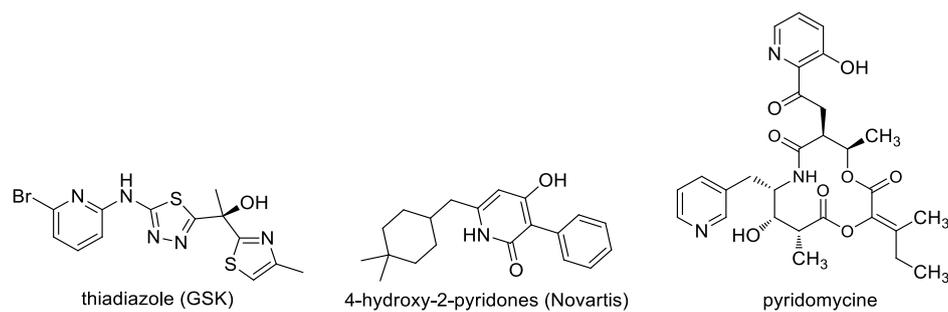


Figure 23 : Inhibiteurs direct d'InhA en cours d'étude

Objectifs des travaux de thèse

Objectifs des travaux de thèse

Les molécules utilisées actuellement dans le traitement de 1^{ère} intention de la tuberculose ont été découvertes il y a plus d'une cinquantaine d'années. Durant les cinquante dernières années, seulement deux molécules ont été approuvées et commercialisées comme des antibiotiques spécifiques à la tuberculose (bédaquiline, FDA en 2012, EMA en 2014 et délamanid, EMA en 2014) [51,52]. Ces molécules restent cependant très peu utilisées (uniquement en troisième intention) et sont réservées plutôt à des tuberculoses résistantes aux médicaments de 1^{ère} et 2^{ème} intention. En outre, face à l'augmentation des cas de MDR et de XDR, il est nécessaire de trouver de nouveaux médicaments capables de contourner les résistances.

L'INH est une pro-drogue présentant un intérêt majeur dans la chimiothérapie de la tuberculose en raison de son activité (CMI à 0,2 μ M). Cependant, comme pour la plupart des pro-drogues antituberculeuses, les résistances associées à l'INH proviennent essentiellement d'un défaut d'activation enzymatique. Face à ce problème, nous nous sommes fixés comme premier objectif de développer de nouvelles stratégies permettant de contourner ces résistances, en se concentrant sur une amélioration de l'activation de l'INH. Dans cette approche, deux autres pro-drogues, ETH et dans une moindre mesure PZA, qui sont également des molécules basées sur un squelette hétéroaromatique simple (pyridine ou pyrazine), ont également été étudiées.

La première partie de cette thèse présentera ainsi de nouvelles approches pour contourner ces résistances.

La première stratégie développée pour contourner les résistances est basée sur la conception et la synthèse de molécules hybrides entre l'INH et l'ETH. Ces molécules hybrides pourraient être activées par deux modes d'activation possibles : soit par KatG soit par EthA. Ainsi une fois bio-activées, ces molécules conduiraient à la formation du métabolite actif similaire à celui de l'INH et de l'ETH (adduit avec le NAD) et elles seraient efficaces sur des souches de MTB présentant une mutation sur l'une des deux enzymes d'activation. Dans ce contexte, la fonction thiohydrazide a été choisie comme motif hybride.

La deuxième stratégie étudiée consiste à affronter les résistances à l'INH par des molécules dérivées d'INH et potentiellement activables par l'enzyme KatG mutée. Cette stratégie s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle les mutations de KatG changeraient son

potentiel d'oxydation tout en conservant son activité de catalase peroxydase [237]. Ainsi, le but est de développer une série d'hydrazides présentant différents potentiels d'oxydation afin de les tester sur différentes souches de MTB présentant des résistances à l'INH. Les résultats issus de ces travaux sont présentés dans une première publication [63]. Toujours selon la stratégie d'affronter les résistances par des dérivés d'INH capables d'être activés par KatG mutée, nous nous sommes également basés sur une seconde hypothèse, avancée dans la littérature, proposant que l'absence d'activation de l'INH par l'enzyme KatG mutée provient d'une modification structurale de cette enzyme [238]. Pour appuyer ce travail, la littérature décrit un analogue de l'INH à chaîne longue actif sur des souches MTB, y compris celles présentant une enzyme KatG mutée et donc résistante à l'INH [116,239]. Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse et à l'évaluation biologique d'autres analogues de l'INH à chaîne longue.

La dernière approche proposée consiste à contourner les résistances liées à l'enzyme KatG en utilisant des molécules de type pro-drogue "auto"-activables ou chimio-activables, c'est-à-dire ne nécessitant pas d'être activées par une enzyme mais par une simple oxydation provoquée par un oxydant endogène de la bactérie. Une collaboration avec le Pr. E.H.S. Sousa de l'Université *Federal do Ceará* à Fortaleza au Brésil a été réalisée afin d'étudier une de ses molécules, le complexe (isoniazide)pentacyanoferrate(II) de sodium, connu sous le nom d'IQG-607 et décrit comme inhibiteur d'InhA et de la croissance de MTB [240–242]. Ce travail a pour objectif de synthétiser des analogues de l'IQG-607 et d'étudier l'hypothèse mécanistique d'activation de l'IQG-607 mettant en jeu la formation d'un métabolite actif similaire à celui de l'INH. Cette approche des molécules "auto"-activables a également été étendue au motif pyrazine dans le but de créer une molécule "auto"-activable capable de générer l'acide pyrazinoïque, métabolite actif de la pro-drogue PZA.

Au cours de ces recherches pour lutter contre les résistances, nous nous sommes aperçus qu'une compréhension détaillée des mécanismes d'activation des pro-drogues actuellement utilisées était devenue indispensable. **La deuxième partie de cette thèse sera donc consacrée à l'étude des mécanismes oxydatifs d'activation des pro-drogues INH et ETH** ayant un mécanisme d'action commun via la formation d'adduit avec le NAD et l'inhibition de l'enzyme InhA. Les mécanismes d'activation de ces pro-drogues sont de nos jours encore mal décrits d'un point de vue moléculaire, notre objectif est ainsi d'améliorer la compréhension de ces mécanismes d'activation dans le but d'aider à la conception de nouvelles pro-drogues antituberculeuses.

Un premier chapitre sera consacré à l'étude du mécanisme d'activation de l'INH dans la continuité des travaux de notre équipe. En effet, les recherches réalisées au sein de notre groupe ont été consacrées à l'activation biomimétique de l'INH et à l'étude de l'adduit actif INH-NADH par LC-MS, RMN ou cristallographie [31,76,77]. Le but est d'utiliser le système biomimétique de KatG, le pyrophosphate de manganèse, développé par l'équipe, afin d'analyser en détail le mécanisme d'activation de l'INH au niveau moléculaire. Cette étude a également été appliquée à des analogues de l'INH, des hydrazides substitués, afin de comparer leur mécanisme d'activation à celui de l'INH.

Le dernier chapitre sera consacré à l'étude du mécanisme d'activation de l'ETH d'un point de vue moléculaire. Afin de réaliser cette étude, il a été nécessaire de développer un système biomimétique de l'enzyme EthA permettant l'activation de l'ETH, l'identification des intermédiaires et la formation des adduits ETH-NAD. L'intérêt de ce système biomimétique est d'avoir un système chimique simple facilitant l'étude au niveau moléculaire du mécanisme d'activation d'ETH.

**Partie 1 : Etude de nouvelles
approches pour contourner les
résistances**

Partie 1 : Etude de nouvelles approches pour contourner les résistances

De nos jours, la recrudescence de la tuberculose est due essentiellement à l'augmentation du nombre de résistances développées par les bactéries envers les médicaments classiques. Dans le cas des pro-drogues INH et ETH, ces résistances portent essentiellement sur des mutations des enzymes d'activation responsables de la formation des métabolites actifs. Le but de cette partie est donc de présenter trois approches différentes visant à contourner les résistances qui concernent ces enzymes d'activation.

CHAPITRE I. Molécules hybrides INH-ETH

I.1. Introduction

L'INH et l'ETH sont deux pro-drogues activées selon un mécanisme oxydatif conduisant à la formation d'adduits avec le cofacteur NAD, ces derniers étant des inhibiteurs de l'enzyme InhA, leur cible commune [55,131]. Bien que ces deux pro-drogues soient toutes les deux activées selon un mécanisme oxydatif, les enzymes d'activation ainsi que les réactions d'oxydation mises en jeu diffèrent. Ainsi, l'INH est oxydé par transfert d'électron par l'enzyme KatG, une catalase peroxydase et l'ETH est oxydé par transfert d'oxygène via l'enzyme EthA, une mono-oxygénase à flavine [70,136,243]. Même si l'étape d'activation oxydante est différente pour ces pro-drogues, elle conduit dans les deux cas à la formation d'un radical aroyle ou équivalent qui va réagir avec le cofacteur NAD pour former les métabolites actifs, les adduits INH/ETH-NADH [73,131,244,245]. Ces deux adduits sont très proches d'un point de vue structural, ne différant que par la présence d'un groupement éthyle supplémentaire dans le cas de l'ETH. Comme le montrent les structures obtenues par diffraction des rayons-X sur les complexes enzyme-inhibiteurs cristallisés, ces adduits interagissent de la même manière au sein de leur cible, l'enzyme InhA [131].

Notre première stratégie pour contourner les résistances associées à KatG et EthA a consisté à créer des molécules hybrides entre l'INH et l'ETH qui auraient la capacité d'être activées par l'enzyme KatG ou par l'enzyme EthA afin de former des adduits avec le cofacteur NAD. Ainsi les chances de bio-activation de ces molécules hybrides seraient supérieures même si l'une des deux enzymes d'activation était mutée ou inactivée.

D'un point de vue structural, l'INH et l'ETH sont constitués d'un cycle pyridinique substitué en position *para* par une fonction hydrazide pour l'INH et par une fonction thioamide pour l'ETH. D'après les mécanismes proposés dans la littérature, l'oxydation de l'INH par transfert d'électron a lieu sur l'un des deux azotes de la fonction hydrazide [71,246,247] tandis que l'ETH est activé par une double oxydation du soufre via deux transferts d'atome d'oxygène [130,150,248]. Ainsi, afin de conserver au mieux les propriétés d'oxydation de l'INH et de l'ETH, nous avons proposé le thiohydrazide **I-1** comme molécule hybride entre l'INH et l'ETH (Schéma 3).

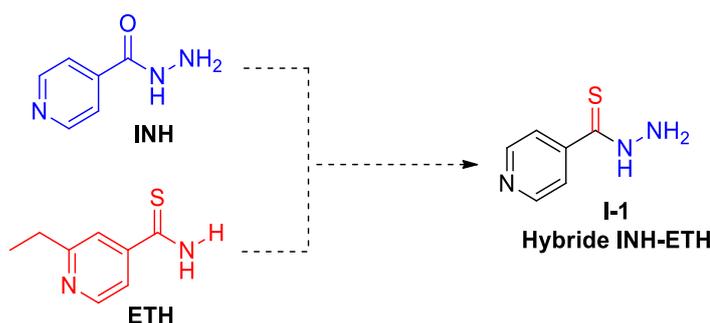
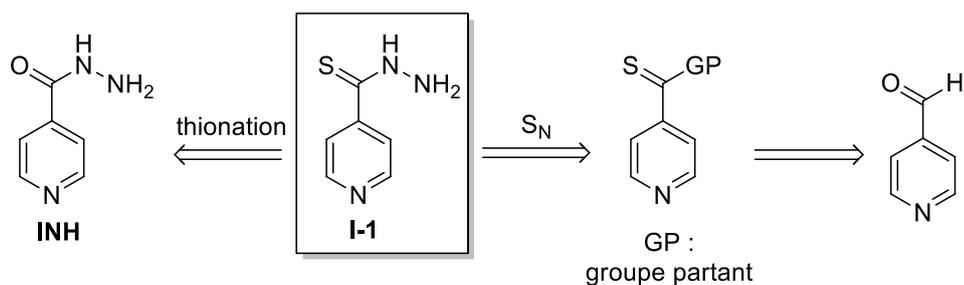


Schéma 3 : Structures de l'INH, de l'ETH et de l'hybride INH-ETH **I-1**

Notre objectif a donc été de synthétiser des thiohydrazides et, dans un second temps, d'étudier leur activation par un modèle enzymatique de l'enzyme KatG et par l'évaluation du pourcentage d'inhibition de croissance de MTB en présence ou non d'un booster EthA. Ces deux tests d'activation permettent d'évaluer si les thiohydrazides pourraient être activés par les enzymes KatG et EthA.

I.2. Synthèse des thiohydrazides

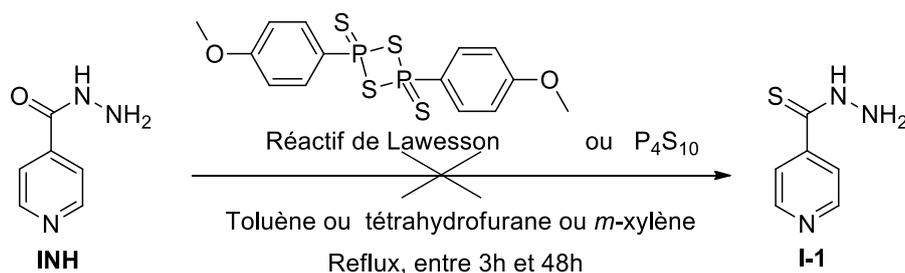
La première étape consiste en l'étude des voies de synthèse conduisant à la formation du pyridine-4-carbothiohydrazide **I-1**. Cette rubrique va être consacrée à la méthodologie de préparation de thiohydrazides dont un schéma de rétrosynthèse, envisagé pour la formation du composé **I-1**, est présenté ci-dessous. La synthèse de thiohydrazides étant peu décrite dans la littérature, nous avons essayé d'étendre les méthodes de synthèse des thioamides à la préparation des thiohydrazides. Deux voies de synthèse sont envisagées : soit par thionation de l'INH, soit par substitution nucléophile, par l'hydrazine, d'un dérivé thiocarbonyle (Schéma 4).



1.2.1. Etude de la synthèse du pyridine-4-carbothiohydrazide **I-1**

1.2.1.a Thionation

La réaction la plus simple envisagée pour synthétiser le pyridine-4-carbothiohydrazide **I-1** est la thionation, c'est-à-dire la substitution de l'oxygène de l'INH par un atome de soufre, en utilisant des agents de thionation comme le réactif de Lawesson (ou [2,4-bis(*p*-méthoxyphényl)-1,3-dithiaphosphetane-2,4-disulfide) ou le pentasulfure de phosphore P_4S_{10} (Schéma 5).



D'après la littérature, l'intérêt du réactif de Lawesson est qu'il est commercial, simple d'utilisation et conduit à de bons rendements et des temps de réaction réduits comparé à P_4S_{10} [249–251]. Ses inconvénients sont la formation de sous-produits et d'intermédiaires cycliques dont des polythiophosphates, qui sont des espèces électrophiles susceptibles de réagir avec l'oxygène ou le soufre du groupement carbonyle présent dans le milieu (Schéma 6).

Le mécanisme de thionation est identique avec le réactif de Lawesson et P_4S_{10} (Schéma 6) [249]. Dans la première étape, l'agent de thionation se dissocie pour former l'espèce active. Cette espèce activée réagit ensuite avec le groupement carbonyle du substrat présent dans le milieu pour former une liaison P-O puis un intermédiaire cyclique à 4 chaînons, qui par décomposition (coupure d'une liaison P-S) générera le composé thiocarbonyle correspondant.

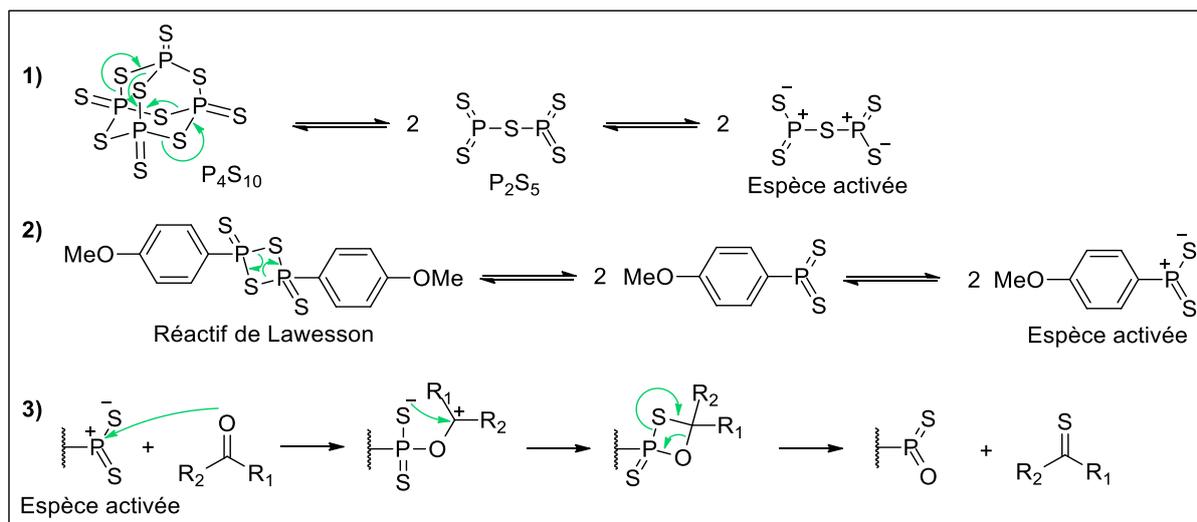
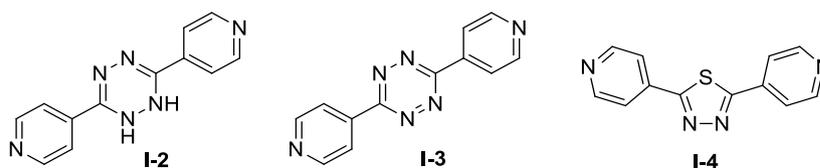


Schéma 6 : Mécanisme de thionation. : A) et B) dissociation de P_4S_{10} et du réactif de Lawesson, respectivement, C) Thionation

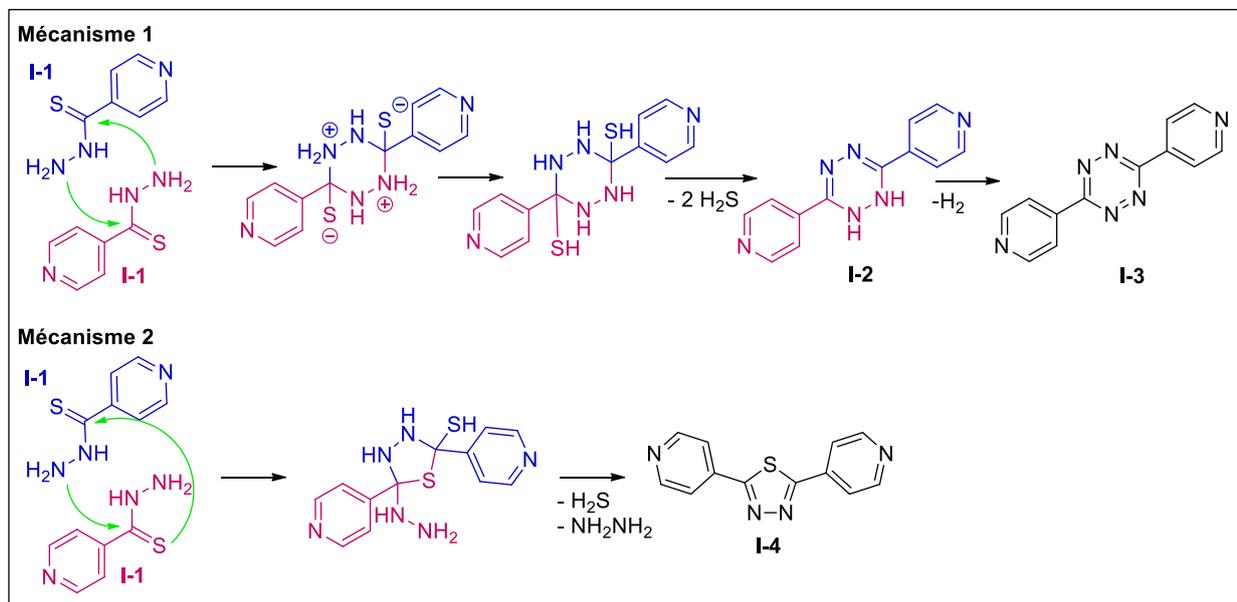
Tableau 2 : Conditions de réactions pour la thionation de l'isoniazide

N°	Agent de thionation (1,1eq)	Solvant	Température	Temps de réaction	Commentaire
1	Lawesson	toluène	t.a.	24 h	Pas de conversion
2	Lawesson	toluène	reflux (110 °C)	24 h	Conversion incomplète Nombreux produits formés
3	Lawesson	tétrahydrofurane	reflux (66 °C)	48 h	Pas de conversion
4	P_4S_{10}	toluène	reflux (110 °C)	6 h	Pas de conversion
5	Lawesson	<i>m</i> -xylène	reflux (136 °C)	3 h	Conversion incomplète Nombreux produits formés

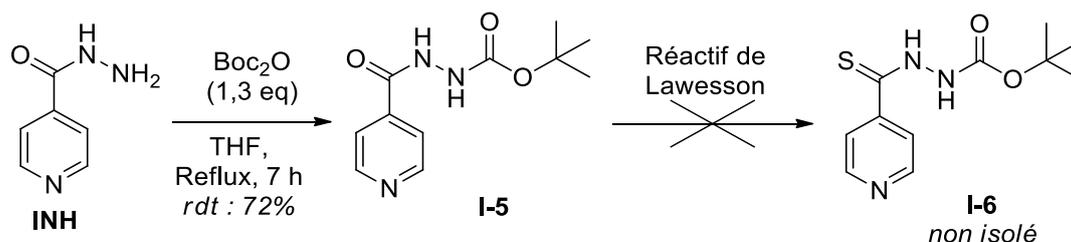
En considérant les avantages et les inconvénients de ces deux agents de thionation, nous avons choisi de les utiliser pour explorer la thionation de l'INH. La réaction à température ambiante (Tableau 2, ligne 1) ou à reflux du THF (ligne 3) avec le réactif de Lawesson n'a pas été fructueuse, montrant une absence de conversion de l'INH. Une augmentation de la température permet d'avoir une conversion du substrat (lignes 2 et 5) dans le cas du réactif de Lawesson mais n'est pas suffisante dans le cas de P_4S_{10} (ligne 4). Toutefois cette conversion est incomplète et le composé attendu **I-1** possiblement formé subit rapidement des réactions supplémentaires conduisant à la formation de nombreux produits secondaires (lignes 2 et 5). L'analyse de ces mélanges complexes a montré la formation de produits de cyclisation intermoléculaire de type tétrazine (**I-2** et **I-3**) et thiadiazole (**I-4**) (Figure 24).

Figure 24 : Structures des produits de cyclisation intermoléculaire du composé **I-1**

Ces composés ont été identifiés par spectrométrie de masse et par RMN pour le composé **I-4** et comparés aux données de la littérature [252]. Afin d'expliquer la formation de ces composés nous proposons les deux mécanismes suivants faisant intervenir comme précurseur le composé **I-1** (Schéma 7). Le premier est le résultat de l'attaque nucléophile intermoléculaire de NH_2 terminaux de chaque fonction thiohydrazone de deux molécules **I-1** sur les fonctions thiocarbonyles de **I-1** (Mécanisme 1, Schéma 7). Le composé **I-2** sera formé suite à des réactions d'élimination de sulfure d'hydrogène H_2S qui conduira au composé **I-3** après perte de H_2 avec aromatisation du cycle. Le deuxième mécanisme correspond à une attaque nucléophile d'un NH_2 terminal de la fonction thiohydrazone d'une molécule **I-1** sur la fonction thiocarbonyle d'une autre molécule **I-1**, suivie d'une attaque nucléophile du soufre de cette deuxième molécule **I-1** sur la fonction thiocarbonyle de la première molécule (Mécanisme 2, Schéma 7). Enfin, une réaction d'élimination de H_2S et d'hydrazine conduit à la formation du composé **I-4**.

Schéma 7 : Mécanismes proposés pour les produits de cyclisation intermoléculaire **I-2** à **I-4**

Afin de rendre cette cyclisation intermoléculaire plus difficile par encombrement stérique et par appauvrissement de la densité électronique de l'azote, nous avons protégé le groupe NH_2 terminal de l'hydrazide par le groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) (Schéma 8).

Schéma 8 : Synthèse du composé **I-6** via l'utilisation d'un groupement protecteur BocTableau 3 : Conditions réactionnelles pour la thionation de l'INH-Boc **I-5** par le réactif de Lawesson

N°	Réactif de Lawesson	Solvant	Chauffage	Temps
1	1,1 éq.	THF	M-O, 80°C	20 min
2	1,1 éq.	THF	Reflux	16 h
3	0,5 éq.	THF	M-O, 80°C	40 min
4	0,6 éq.	DCM	Reflux	45 min

La réaction entre l'INH et le dicarbonate de di-*tert*-butyle (1,3 éq) dans le THF à reflux génère le produit **I-5**, avec un rendement de 72%. Comme dans les essais précédents sur l'INH, la réaction de l'intermédiaire **I-5** avec le réactif de Lawesson est lente (conversion incomplète) et conduit à la formation de nombreux produits secondaires. L'utilisation des micro-ondes (M-O) permet un gain de temps par rapport au reflux, cependant les sous-produits formés sont similaires à ceux obtenus par chauffage classique (Tableau 3). Bien que le produit de thionation **I-6** désiré ait été observé en spectrométrie de masse, toutes les tentatives de purification du composé **I-6** ont échoué (colonne, précipitation, filtration...).

1.2.1.b Substitution nucléophile d'un dérivé thiocarbonyle

Afin d'éviter cette cyclisation intermoléculaire, nous avons cherché une voie alternative de synthèse permettant d'obtenir le produit souhaité **I-1** dans des conditions plus douces. Nous avons pour cela mis à profit une méthode de synthèse de thioamides, selon une réaction de Willgerodt-Kindler modifiée où la morpholine sera utilisée comme groupe partant [253,254]. La réaction de Willgerodt-Kindler consiste à synthétiser des thioamides à partir d'une cétone, d'une amine secondaire telle que la morpholine et de soufre élémentaire, dans des conditions thermiques. Cette réaction est caractérisée par un réarrangement conduisant à la migration du groupement carbonyle (Schéma 9) [253]. Cette réaction peut également être appliquée à des aldéhydes, cependant, le réarrangement étant toutefois impossible avec ce substrat, il y a directement conversion de l'aldéhyde en thioamide (Schéma 9).

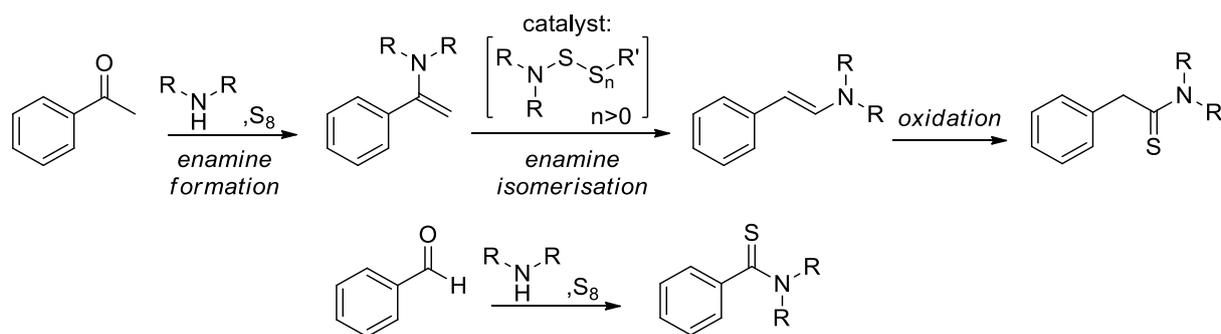
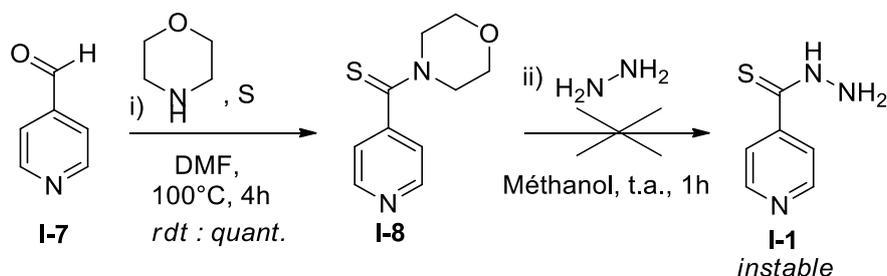


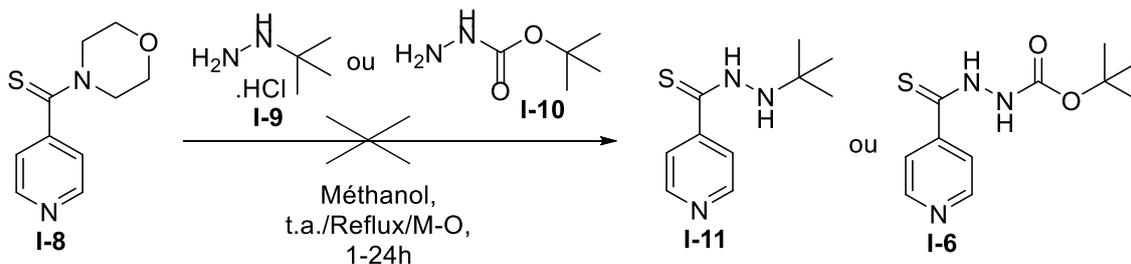
Schéma 9 : Réactions de Willgerodt-Kindler [253]

Dans notre cas, la réaction de Willgerodt-Kindler modifiée a été appliquée à la synthèse du composé **I-1** (Schéma 10). En effet, la réaction du 4-pyridinecarboxaldéhyde **I-7** avec de la morpholine et du soufre à chaud permet d'obtenir, après une étape de purification, l'intermédiaire thioamide désiré **I-8** (Schéma 10).

Schéma 10 : Synthèse du composé **I-1** dans les conditions de la réaction de Willgerodt-Kindler, en présence de morpholine (1,4 éq) et de soufre (1,5 éq), suivie d'une substitution nucléophile par l'hydrazine

L'intermédiaire **I-8** peut ensuite subir une réaction de substitution nucléophile de la morpholine par l'hydrazine [254]. Bien que cette réaction soit réalisée à température ambiante, nous avons ici encore observé la formation des produits de cyclisations intermoléculaires **I-2**, **I-3** et **I-4** issus du composé **I-1** et encore d'autres produits non identifiés. Malheureusement, le produit **I-1** s'est avéré être trop instable. La réaction secondaire de cyclisation intermoléculaire se produit à température ambiante en solution ou encore lors des étapes d'évaporation du solvant, ce qui nous a empêché d'isoler le produit.

La forte instabilité du composé **I-1** nous a conduit à essayer d'utiliser des hydrazines monosubstituées dans le but de bloquer les réactions de cyclisation intermoléculaire du produit formé (Schéma 11). Malheureusement, nous avons été confrontés à une absence de conversion, malgré un chauffage prolongé ou l'utilisation de micro-ondes. L'hypothèse avancée pour expliquer ce résultat est que l'encombrement stérique du substituant de l'hydrazine gêne la réaction.

Schéma 11 : Substitution nucléophile du composé **I-8** par des hydrazines monosubstituées

Face à ces échecs et à la grande instabilité du composé **I-1**, nous avons décidé de modifier la structure chimique de l'hybride thiohydrazide en remplaçant le noyau pyridyle par un phényle avec l'hypothèse que les benzothiohydrazides seraient moins réactifs [255,256]. En effet, la densité électronique du noyau phényle étant plus faible, la fonction thiohydrazide devrait être moins nucléophile.

I.2.2. Synthèse de benzothiohydrazides

Au vu de l'instabilité du pyridine-4-carbothiohydrazide **I-1**, nous avons cherché à étendre les méthodologies de synthèse précédentes aux benzothiohydrazides. Le schéma de rétrosynthèse ci-dessous présente les différentes voies de synthèses utilisées pour la synthèse des benzothiohydrazides, dont certaines approches ont déjà été traitées précédemment (Schéma 12). Ainsi, le thiohydrazide cible peut être obtenu par thionation de l'hydrazide correspondant (Voie A) et les voies B à D correspondent à des substitutions nucléophiles, par l'hydrazine, des dérivés thiocarbonyles.

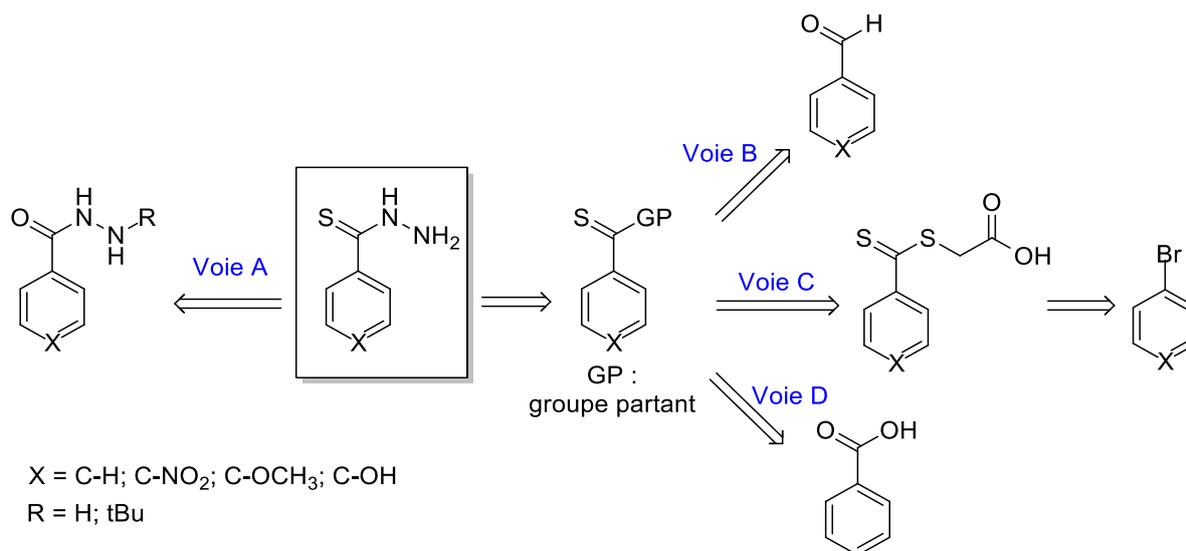


Schéma 12 : Rétrosynthèse des benzothiohydrazides

Afin de mieux comprendre la stabilité et la réactivité des benzothiohydrazides, nous avons envisagé de synthétiser, en plus du benzothiohydrazide **I-12**, différents

benzothiohydrazides substitués en position *para* par un groupement nitro (**I-13**), méthoxy (**I-14**) ou hydroxy (**I-15**). Le but est d'évaluer l'effet électronique de la substitution de ce cycle sur la réactivité et la stabilité du thiohydrazide formé. Nous avons également cherché à étudier l'influence de la substitution de l'azote *N*-distal de la fonction thiohydrazide par un groupement alkyl (**I-16**) (Figure 25).

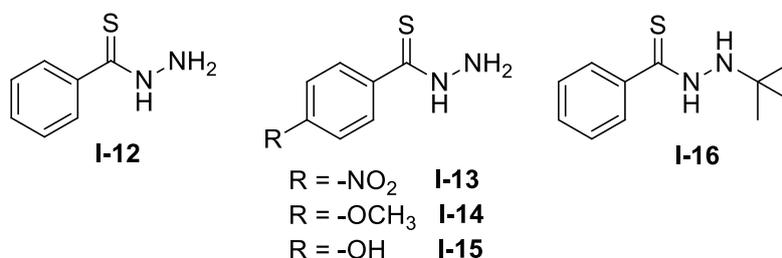


Figure 25 : Structures des benzothiohydrazides cibles

1.2.2.1. Thionation (Voie A)

La substitution de l'oxygène par un soufre reste la méthode la plus directe pour obtenir des thiohydrazides. Sur la base des résultats obtenus dans le cas du noyau pyridine et des difficultés d'élimination des sous-produits du réactif de Lawesson, nous nous sommes concentrés sur l'utilisation du pentasulfure de phosphore P₄S₁₀ comme précédemment décrit. Nous avons cependant utilisé deux améliorations proposées dans la littérature qui permettent de piéger les sous-produits électrophiles de la réaction, d'éviter ainsi les réactions parasites, d'augmenter les rendements lors de la transformation d'amide en thioamide et également de réduire le temps de réaction (Schéma 13) [257–259]. La première amélioration (A₁) est l'utilisation de la diméthicone (ou huile de silicone) permettant l'encapsulation des sous-produits de la réaction [257]. La deuxième amélioration (A₂) est l'utilisation de l'alumine Al₂O₃ comme support solide à P₄S₁₀ [258,259]. Avec le support solide, une simple filtration devrait permettre d'éliminer la majorité des sous-produits de la réaction.

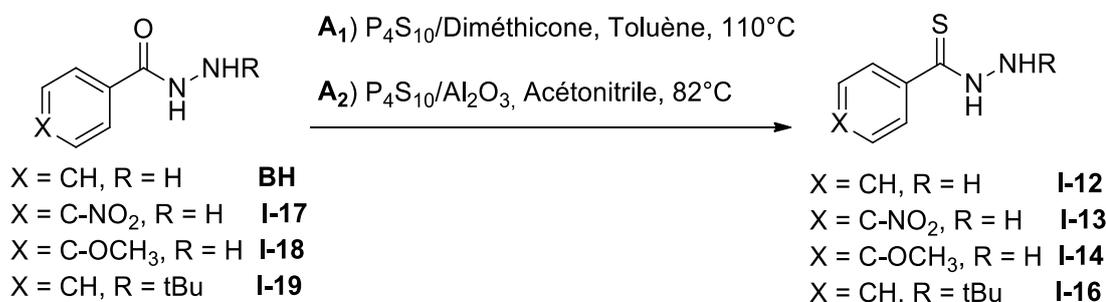


Schéma 13 : Thionation par P₄S₁₀ couplé à de la diméthicone (A₁) ou à Al₂O₃ (A₂).

Une troisième voie de thionation utilisée (A_3) est une méthode décrite par le groupe de Charrette (Schéma 14) [260]. Dans le cas d'un substrat amide, celui-ci est activé par de l'anhydride triflique en présence de pyridine, via la formation d'un sel de pyridinium **I-20** (Mécanisme Schéma 15). Cet intermédiaire, très électrophile, conduit alors à la formation de thioamide par réaction avec l'ion sulfure apporté par le sulfure d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{S}$. Nous avons cherché à appliquer cette réaction à un substrat de type hydrazide (Schéma 14).

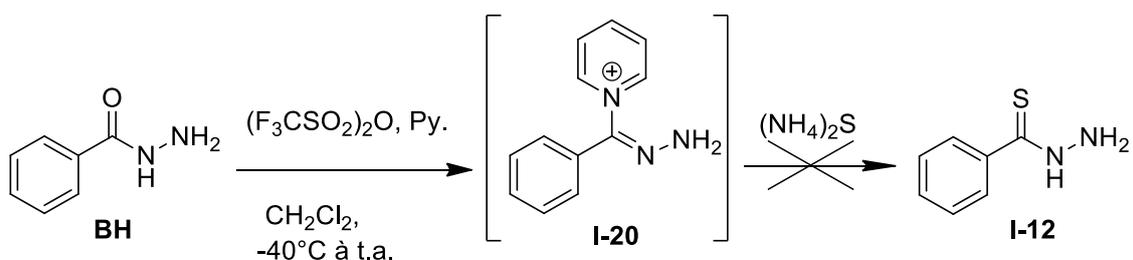


Schéma 14 : Voie A_3 : Thionation via un sel de pyridinium

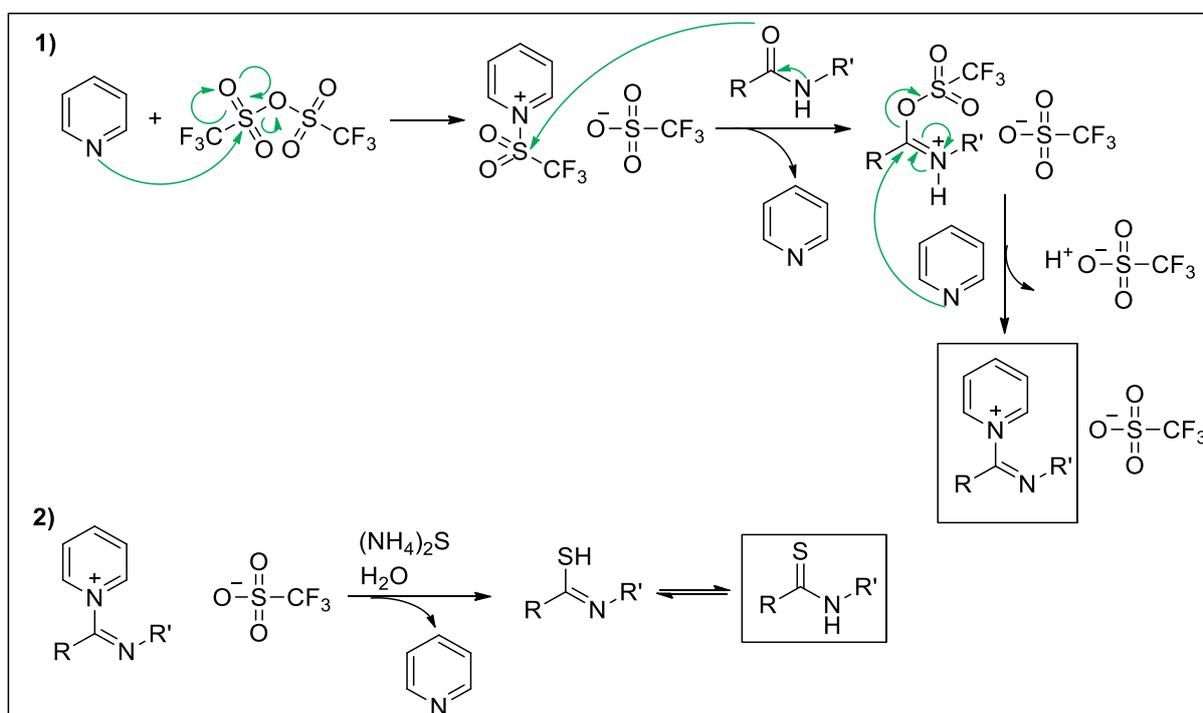


Schéma 15 : Mécanisme de la voie A_3 , thionation via un sel de pyridinium

Le tableau ci-dessous reprend les résultats obtenus lors des réactions de thionation sur les composés BH, **I-17**, **I-18** et **I-19**, selon les voies A_1 , A_2 et A_3 (Tableau 4).

Tableau 4 : Essais de thionation par la voie A

N°	Substrat	Voie	Agent de thionation	Condition	Remarques
1	BH	A ₁	P ₄ S ₁₀ /Diméthicone	Toluène, 110 °C, 2 h	Autres produits
2	BH	A ₁	P ₄ S ₁₀ /Diméthicone	Toluène, 110 °C, 16 h	Traces du produit attendu I-12 + Autres
3	BH	A ₁	P ₄ S ₁₀ /Diméthicone	DCM, 40 °C, 10 h	Pas de réaction
4	BH	A ₂	P ₄ S ₁₀ /Al ₂ O ₃	ACN, 85 °C, 3 h	Autres produits
5	BH	A ₃	(F ₃ CSO ₂) ₂ O, Pyridine, (NH ₄) ₂ S	DCM, t.a., 2 h	Autres produits
6	I-17	A ₁	P ₄ S ₁₀ /Diméthicone	Toluène, 110 °C, 20 h	Autres produits
7	I-17	A ₂	P ₄ S ₁₀ /Al ₂ O ₃	ACN, 85 °C, 12 h	Autres produits + Dégradation
8	I-17	A ₂	P ₄ S ₁₀ /Al ₂ O ₃	ACN, 85 °C, 2 h	Départ + Autres produits + Dégradation
9	I-18	A ₂	P ₄ S ₁₀ /Al ₂ O ₃	ACN, 85 °C, 1 h 30	Autres produits
10	I-19	A ₁	P ₄ S ₁₀ /Diméthicone	Toluène, 110 °C, 24 h	Produit attendu I-16 (Rdt 10%)
11	I-19	A ₂	P ₄ S ₁₀ /Al ₂ O ₃	ACN, 85 °C, 11 h	Pas de réaction
12	I-19	A ₂	P ₄ S ₁₀ /Al ₂ O ₃	ACN, M-O, 85 °C, 10 h	Autres produits

Les réactions avec le P₄S₁₀ nécessitent, comme attendu, un chauffage supérieur à 80 °C pour avoir une conversion convenable du réactif. Dans ces conditions cependant, le produit de thionation n'est pas retrouvé dans le milieu réactionnel et les produits de dimérisation par cyclisation intermoléculaire ont pu être mis en évidence par spectrométrie de masse dans le cas du 4-nitrobenzohydrazide **I-17** (Tableau 4, entrées 7 et 8). De façon décevante, la voie A₃, ne nécessitant pas de chauffage, a conduit à la consommation du réactif benzohydrazide BH mais n'a pas non plus permis d'isoler le thiohydrazide souhaité. Enfin, la réaction de l'hydrazide **I-19**, substitué en position *N*-distale par un groupement *tert*-butyle, avec le P₄S₁₀/Diméthicone (Tableau 4, entrée 10) conduit à la formation du produit attendu avec un rendement de 10%. La substitution de l'azote distal semble donc stabiliser le produit attendu mais le rendement en produit isolé reste faible. Nous avons alors cherché à explorer d'autres voies de synthèse.

I.2.2.2. Par substitution nucléophile d'un dérivé thiocarbonyle (Voies B-D)

Face à l'échec des réactions de thionation, nous avons étudié les voies B à D qui consistent à synthétiser dans un premier temps un précurseur portant une fonction

thiocarbone activée, c'est-à-dire substituée par un bon groupe partant. L'attaque nucléophile de cette fonction thiocarbone par l'hydrazine conduira alors à la formation du thiohydrazone après départ du groupe partant.

Voie B via les conditions de Willgerodt-Kindler

Nous avons tout d'abord repris les conditions de réaction utilisées précédemment pour **I-7** et les avons appliquées aux substrats benzaldéhyde (**I-21**) et 4-hydroxybenzaldéhyde (**I-22**) (Schéma 16).

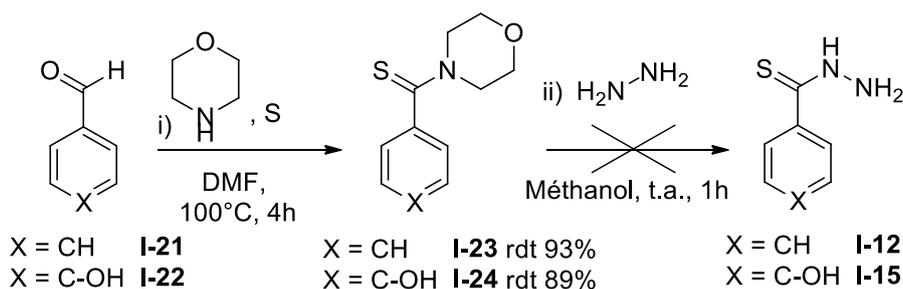


Schéma 16 : Synthèse de thiohydrazides dans les conditions de la réaction de Willgerodt-Kindler

La synthèse de l'intermédiaire (morpholin-4-yl)(aryl)méthanethione **I-23** ou **I-24** est réalisée à partir de l'aldéhyde correspondant, de morpholine et de soufre, dans du DMF à 100 °C pendant 4 heures. Une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice permet d'obtenir les produits désirés **I-23** et **I-24** avec de bons rendements, respectivement de 93% et 89%. La deuxième étape correspond à l'attaque nucléophile, par l'hydrazine, du carbone du thiocarbone avec départ de la morpholine. Toutefois, la morpholine ne semble pas être un assez bon groupe partant comparé au soufre et le produit attendu n'a pas été obtenu. Au contraire, les produits secondaires identifiés en spectrométrie de masse pourraient correspondre au composé **I-25** et à son dimère **I-26** (Figure 26) pour lesquels il y a départ de sulfure d'hydrogène et non de morpholine. Le composé **I-24** est quant à lui moins réactif et l'effet mésomère donneur du groupement hydroxy du cycle semble défavoriser la réaction. Ainsi, la conversion du composé **I-24** est faible, même après chauffage, et ne conduit pas à la formation du produit **I-15**.

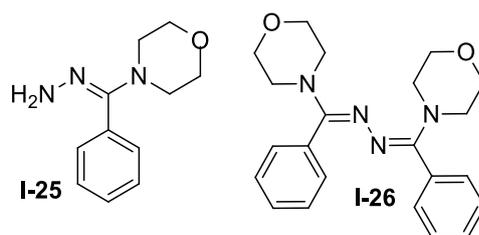
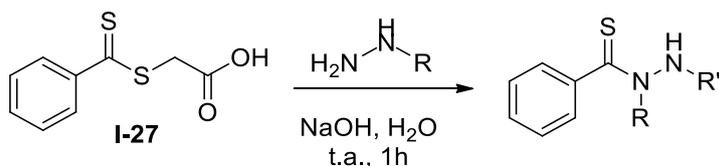


Figure 26 : Structures proposées pour les sous-produits de la réaction de substitution de l'hydrazine sur le composé **I-23**

Voie C via l'acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique (I-27)

La morpholine utilisée dans la voie B n'étant pas un bon groupe partant lors de l'attaque nucléophile, par l'hydrazine, du thiocarbonyle, nous avons envisagé l'utilisation du réactif acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique (**I-27**) commercial pour la réaction de substitution nucléophile par l'hydrazine conduisant à un départ favorable d'acide thioglycolique, bon groupe partant, selon le protocole décrit par Yadav *et al.* [255]. Dans cette réaction, les deux groupes partants possibles comportent un atome de soufre et permettent ainsi de contourner les problèmes de substitution rencontrés jusqu'à présent. La réaction de l'hydrazine sur l'acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique (**I-27**) en milieu alcalin a ainsi permis d'obtenir le benzothiohydrazide (**I-12**) avec un rendement de 67% (Schéma 17). Cette voie de synthèse est particulièrement intéressante dans notre cas puisqu'elle permet une réaction à température ambiante, sur un temps court (1 heure) et qu'une simple précipitation permet d'obtenir le produit pur en fin de réaction, atouts très importants au vu de l'instabilité des thiohydrazides. Par ailleurs, cette voie de synthèse permet l'introduction de substituants sur un azote de la fonction hydrazide grâce à l'emploi d'hydrazines substituées (Schéma 17, composés **I-28** à **I-30**). Il est intéressant de noter que dans le cas de la méthylhydrazine, le composé majoritaire est issu de la réaction de l'azote substitué, donc le plus nucléophile, sur le thiocarbonyle, conduisant au produit substitué en position *N*-proximale du benzothiocarbonyle et accompagné de seulement 10% de son analogue substitué en position *N*-distale (Schéma 17, composé **I-28**). Les hydrazines les plus encombrées (isopropyle et *tert*-butyle hydrazine) réagissent, quant à elles, sur le groupe thiocarbonyle via leur fonction amine primaire, conduisant à des thiohydrazides substitués en position *N*-distale (Schéma 17, composés **I-29** et **I-30**).

Enfin, il est également possible de faire réagir l'acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique (**I-27**) avec des hydrazides à la place des hydrazines, conduisant à la synthèse de molécules bicycliques de type *N*-aroylbenzothiohydrazides. Ces structures, bien qu'éloignées de la structure cible **I-1**, présentent également les motifs essentiels pour un hybride INH-ETH (Schéma 17, composés **I-31** à **I-35**).



	I-12	I-28	I-29	I-30	I-31	I-32	I-33	I-34	I-35
R =	-H	-Me	-H						
R' =	-H	-H	-iPr	-tBu					
rdt =	67%	55%	48%	84%	84%	76%	74%	33%	48%

Schéma 17 : Benzothiohydrazides synthétisés à partir de l'acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique **I-27**

Cette voie de synthèse s'est avérée très efficace et a conduit à la préparation de 9 composés de type benzothiohydrazide. La synthèse de ces composés **I-12** et **I-28** à **I-35** est décrite dans la partie expérimentale suivante et a également été publiée dans l'article présenté dans le chapitre suivant [63]. Cependant, cette approche est limitée à la préparation des benzothiohydrazides puisque seule la forme benzoyl du précurseur acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique (**I-27**) est commerciale.

Dans le but d'introduire de la diversité au niveau du noyau aromatique des thiohydrazides, nous avons cherché à étendre la réaction précédente à de nouveaux substrats de type acide *S*-(thioaroyl)-thioglycolique modifiés. Ainsi, nous avons cherché à synthétiser des analogues de cet intermédiaire en faisant varier le cycle aromatique soit par un groupement pyridyl soit par un groupement 4-nitrophényl. Ceux-ci pourraient être préparés par réaction de l'acide chloroacétique sur le dithioacide correspondant, lui-même préparé par attaque d'un dérivé organomagnésien aromatique sur le disulfure de carbone (Schéma 18). La deuxième étape, identique à celle réalisée avec l'acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique (**I-27**), permettrait d'obtenir, par attaque nucléophile de l'hydrazine, les thiohydrazides correspondants. Cependant la synthèse des précurseurs **I-38** et **I-39** n'a pu être menée à terme par manque de réactivité. En effet, dans le cas de la 4-bromo-pyridine (**I-36**), les produits majoritaires observés ont été la pyridine et la 4,4'-bipyridine, traduisant la formation de l'organomagnésien attendu mais un manque de réactivité vis-à-vis du disulfure de carbone. Dans le cas du 1-bromo-4-nitrophényle (**I-37**), il n'y a pas eu de conversion lors de l'étape d'échange halogène-métal, probablement dû à un manque de réactivité causé par la présence du substituant nitro désactivant sur le cycle aromatique.

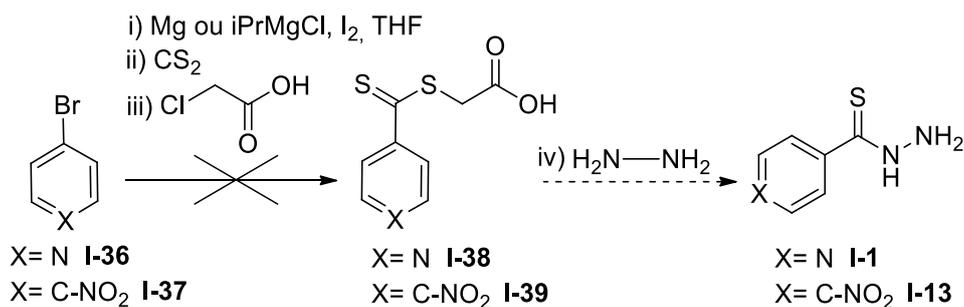


Schéma 18 : Voie de synthèse C via un organomagnésien

Voie D via un phosphorodithioate

D'autres groupes partants, comme le phosphonate, ont été également décrits dans la littérature pour la synthèse de thioamides à partir d'acide carboxylique [261]. Ainsi, dans le but d'étudier d'autres approches de synthèse des thiohydrazides en partant de substrat différent, nous avons utilisé un sel d'hydrazinium phosphorodithioate pour la synthèse du benzothiohydrazide (**I-12**) (Schéma 19).

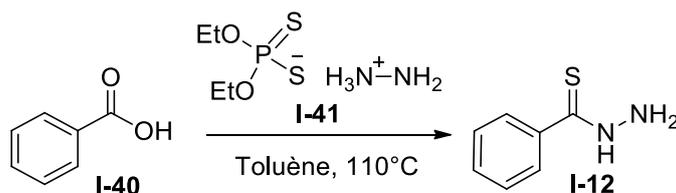
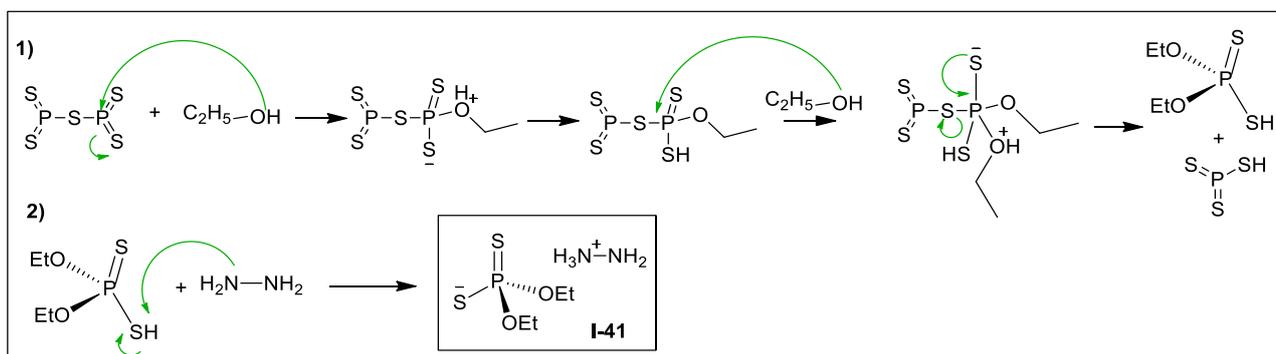


Schéma 19 : Voie de synthèse D via un phosphonate

La voie D fait intervenir le précurseur *O,O*-diéthyl phosphorodithioate d'hydrazinium (**I-41**) qui est préparé par réaction de P_2S_5 (ou P_4S_{10}) avec de l'éthanol en présence d'hydrazine (Schéma 20) [261].


 Schéma 20 : Mécanisme de formation du *O,O*-diéthyl phosphorodithioate d'hydrazinium **I-41**

La seconde étape est la réaction entre l'acide carboxylique et le *O,O*-diéthyl phosphorodithioate d'hydrazinium (**I-41**) dans le toluène à reflux afin de former l'intermédiaire **I-42** (Schéma 21-1). Cet intermédiaire peut réagir par substitution nucléophile

par l'hydrazine par deux voies (Schéma 21-2a et 2b) pour former le thiohydrazide correspondant.

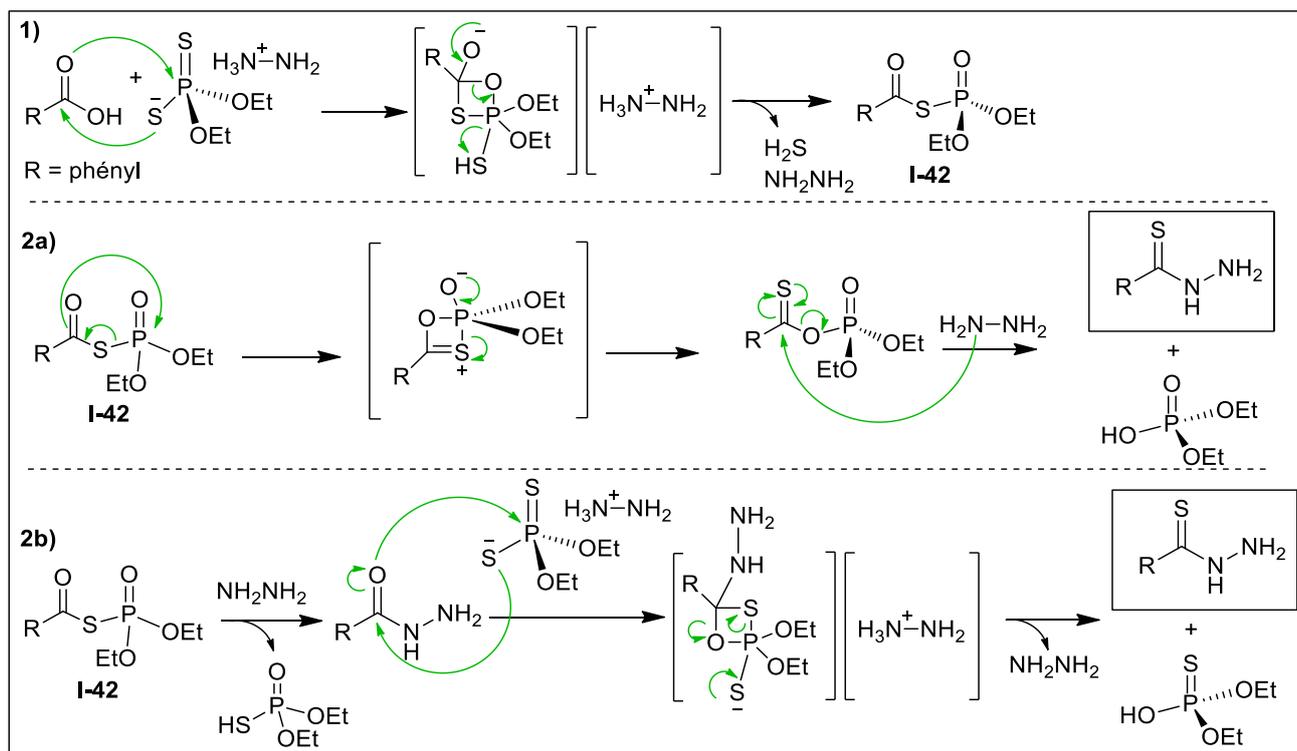


Schéma 21 : Mécanisme de la voie D

Malheureusement cette voie s'est avérée inefficace pour la synthèse du benzothiohydrazide (**I-12**) et les sous-produits de la réaction n'ont pas été identifiés, excepté le benzohydrazide BH qui a pu être caractérisé. L'obtention du benzohydrazide laisse supposer la formation de l'intermédiaire **I-42** qui a réagi directement avec l'hydrazine sans réarrangement.

1.2.3. Conclusion

La synthèse de thiohydrazides s'est révélée compliquée du fait de leur instabilité. Ainsi, la molécule cible, la pyridine-4-carbothiohydrazide (**I-1**), n'a pu être isolée à cause de sa dimérisation en composés de type thiadiazole et tétrazine, en solution à température ambiante. Toutefois, le remplacement du noyau pyridyle par un noyau benzyle permet de limiter cette réaction de dimérisation du benzothiohydrazide (**I-12**).

Concernant la synthèse de ce dernier, les conditions classiquement utilisées pour la synthèse des thioamides n'ont pu être extrapolées de façon satisfaisante à la synthèse de thiohydrazides. En particulier, la thionation par le réactif de Lawesson ou par P_4S_{10} s'est révélée inappropriée à cause des conditions de chauffage trop drastiques et de problèmes de

purification. La synthèse du composé **I-12** a été possible par réaction de substitution nucléophile, par l'hydrazine, d'un dérivé thiocarbonylé substitué par un bon groupe partant. Dans cette approche, les motifs morpholine et phosphonate se sont révélés être des groupes partants inefficaces, à la différence de l'acide thioglycolique.

Ainsi, la voie de synthèse, utilisant l'acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique (**I-27**) comme précurseur des benzothiohydrazides, a permis grâce à des conditions de réaction douces de synthétiser différents dérivés benzothiohydrazides éventuellement substitués sur les azotes proximal ou distal de la fonction thiohydrazide. Ces molécules vont pouvoir être mises à profit en tant que modèles dans l'étude de l'activation des thiohydrazides par les enzymes KatG et EthA.

I.2.4. Partie expérimentale

General

All solvents and commercially available reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification including isonicotinoic acid hydrazide (INH, **1**) and *tert*-butylhydrazine hydrochloride (**I-9**). Hydrazides **I-17**, **I-18** and **I-19** and thiohydrazides **I-12** and from **I-28** to **I-35**, are described in Laborde et *al.*, Partie 1, Chapitre II [63]. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel-coated aluminium plates with fluorescent indicator 254 nm (Merck or Fluka). Preparative chromatography was performed on silica gel column (Merck 63–200 μm) or using a CombiFlash Companion (Teledyne Isco) with RediSep prepacked cartridges (SiO_2 35–70 μm). The purity of compounds was assessed by microanalysis and/or by thin layer chromatography coupled to ^{13}C NMR.

General instrumentation and analysis conditions

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 300, 400 and 500 MHz using CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ or $\text{MeOD-}d_4$ as solvent. The residual proton signal of the deuterated solvent was used as an internal reference: CDCl_3 $\delta = 7.29$ ppm, DMSO $\delta = 2.50$ ppm and MeOD $\delta = 3.31$ ppm. ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 75, 100 and 126 MHz. Electrospray mass spectra (ESI) were obtained on a Perkin-Elmer SCIEX API 365 instrument and desorption chemical ionization (DCI) mass spectra were acquired on a Finnigan TQS 7000 spectrometer. The melting points were determined on an Electrothermal

9300 capillary melting point apparatus and are not corrected. Infra-red spectra were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer with ATR functionality.

Synthesis

tert-Butyl 2-(pyridine-4-carbonyl)hydrazine-1-carboxylate (I-5): A solution of isonicotinoyl hydrazine (1 g, 7.29 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (1.67 mL, 7.29 mmol) in anhydrous THF (25 mL) was stirred under reflux for 6 hours. Additional di-*tert*-butyl dicarbonate (0.5 mL, 2.19 mmol) was added to the mixture, which was heated under reflux for 1 hour more. After cooling to room temperature, diethyl ether was added dropwise to the mixture. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with diethyl ether, affording **I-5** as a pure product. Yield 72% (1.25 g). White solid, mp 204 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 10.50 (br s, 1H); 9.06 (br s, 1H); 8.75 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H); 7.75 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H); 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 164.9 (Cq); 155.7 (Cq); 150.9 (CH); 139.9 (Cq); 121.7 (CH); 79.9 (Cq); 28.5 (CH₃). HRMS (DCI-CH₄): for C₁₁H₁₆N₃O₃ ([M+H]⁺): calcd: 238.1196; found: 238.1199. Anal. calcd. for C₁₁H₁₅N₃O₃•0.05 H₂O: C, 55.48; H, 6.39; N, 17.64. Found: C, 55.76; H, 6.78; N, 17.52. IR √ (cm⁻¹): 3314, 3169, 2984, 1726, 1712, 1683, 1547, 1497, 1413, 1369, 1273, 1255, 1158, 1002, 853, 741, 689.

(Morpholin-4-yl)(pyridin-4-yl)methanethione, compound I-8, was synthesized according to classical conditions for the Willgerodt-Kindler reaction [253] and was previously described in the literature [262,263]. A solution of 4-pyridinecarboxaldehyde (1.0 g, 9.34 mmol), elemental sulphur (0.45 g, 14.01 mmol) and morpholine (1.14 mL, 13.08 mmol) in anhydrous DMF was stirred at 100 °C for 4 hours. The reacting mixture was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography (eluent: DCM / methanol: 100/0 to 90/10). Yield 99% (1.94 g). Yellow powder. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.64 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H); 7.17 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H); 4.42 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); 3.90 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); 3.67 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); 3.55 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 8.60 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H); 7.27 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H); 4.30 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); 3.79 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); 3.60 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); 3.55 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H). MS (DCI/NH₃) *m/z* = 209 [M+H]⁺.

***N*-tert-butyloxycarbonyl-hydrazine (I-10)** was synthesized according Jablonski *et al.* [264]. To a round bottom flask, hydrazine monohydrate (0.10 mL, 2.01 mmol) was dissolved in isopropanol (3 mL) at 0 °C. A solution of Boc₂O (0.21 mL, 0.92 mmol) in isopropanol (1

mL) was added dropwise. The reaction was allowed to stir at 0 °C for an additional hour. The reacting mixture was concentrated under vacuum and the crude product was solubilised in ethyl acetate and dried on MgSO₄. Pure product **I-10** was obtained after removing the solvent and preserved in freezer. Yield 97% (118 mg). White solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.83 (s, 1H); 3.69 (s, 2H); 1.48 (s, 9H). MS (DCI/NH₃) m/z = 133.1 [M+H]⁺.

(Morpholin-4-yl)(phenyl)methanethione, compound **I-23**, was synthesized according to classical conditions for the Willgerodt-Kindler reaction [253] and previously described in the literature [262]. A solution of benzaldehyde **I-25** (1 mL, 9.8 mmol), elemental sulphur (0.47 g, 14.7 mmol) and morpholine (1.2 mL, 13.7 mmol) in anhydrous DMF was stirred at 100 °C for 6 hours. The reacting mixture was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography (eluent: DCM / methanol: 100/0 to 95/5). Yield 93% (1.88 g). Yellow powder. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7.39 (m, 3H); 7.28 (m, 2H); 4.32 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); 3.78 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); 3.54 (m, 4H). MS (ESI⁺) m/z = 208.2 [M+H]⁺.

(4-Hydroxyphenyl)(morpholin-4-yl)methanethione, compound **I-24**, was synthesized according to classical conditions for the Willgerodt-Kindler reaction [253]. A solution of 4-hydroxybenzaldehyde **I-26** (0.50 g, 4.09 mmol), elemental sulphur (0.20 g, 6.13 mmol) and morpholine (0.50 mL, 5.73 mmol) in anhydrous DMF was stirred at 100 °C for 6 hours. The reacting mixture was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography (eluent: DCM / methanol: 100/0 to 90/10). Yield 89% (0.81 g). Yellow powder. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 9.82 (br s, 1H); 7.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H); 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H); 4.27 (m, 2H); 3.74 (m, 2H); 3.61 (m, 4H). MS (ESI⁺) m/z = 224.2 [M+H]⁺.

***O,O*-diethyl phosphorodithioate d'hydrazinium (I-41)** : Hydrazine hydrate 64% (2.4 mL, 50 mmol) was added to a mixture of phosphorus pentasulfide (5.5 g, 12.5 mmol) in EtOH (50 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at 60 °C. The reaction mixture was cooled to room temperature and filtered. Evaporation of the solvent under reduced pressure and recrystallization in ethanol gave the pure ammonium *O,O*-diethyl phosphorodithioate hydrazinium **I-41** as a white solid. Yield 81% (9.06 g). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 6.83 (br s, 5H); 3.79 (m, 4H); 1.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

I.3. Les thiohydrazides sont-ils activables par l'enzyme KatG ?

Notre hypothèse dans la conception d'une structure de type thiohydrazide, hybride de l'INH et de l'ETH, potentiellement capable de contourner les résistances développées par MTB, est qu'une telle molécule aurait la possibilité de subir une double activation par les enzymes KatG et EthA. Nous avons donc tout d'abord voulu vérifier si les molécules thiohydrazides synthétisées dans ce travail étaient activables par l'enzyme KatG. Cette enzyme n'étant pas disponible commercialement, nous avons développé une collaboration avec l'équipe du Pr. Peter C. Loewen, à l'université de Manitoba au Canada, qui étudie les réactions de stress oxydant chez les bactéries de type *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* ou encore *Burkholderia pseudomallei*. En particulier, cette équipe s'intéresse aux mécanismes par lesquels les catalases détruisent le peroxyde d'hydrogène avant qu'il n'endommage les composants cellulaires. Elle étudie également les catalases peroxydases KatG ou leurs équivalents chez ces trois bactéries afin d'avoir une meilleure compréhension de leur fonctionnement. Dans ce contexte, cette équipe a développé un test qui permet de suivre le taux d'activation de l'INH par des catalases peroxydases sauvages ou mutées.

L'équipe du Pr. Loewen étudie préférentiellement la catalase peroxidase KatG de la bactérie *Burkholderia pseudomallei* (BpKatG) qui sert de substitut à la KatG de *M. tuberculosis* (MtKatG). *Burkholderia pseudomallei* est un bacille à coloration de Gram négative hautement pathogène responsable de la mélioïdose, une maladie infectieuse pouvant être mortelle [265]. BpKatG est identique à 65% à MtKatG et l'équipe de Peter Loewen a publié la première structure cristallographique du complexe BpKatG-INH dans laquelle l'INH est situé à proximité de l'hème [99,101,103]. Les structures cristallographiques de BpKatG et MtKatG ont d'autre part confirmé des similitudes entre ces deux enzymes [91,99,266]. De plus, BpKatG présente des propriétés catalytiques quasiment identiques à celle de MtKatG et a l'avantage d'avoir un plus grand nombre de mutants disponibles et une cristallisation plus facile et plus reproductible [101].

Leur test d'activation de l'INH utilise donc l'enzyme BpKatG en présence de NAD^+ et consiste à mesurer la vitesse de formation de l'adduit INH-NADH. Cette réaction est suivie en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 326 nm, longueur d'onde caractéristique de l'adduit INH-NADH de type dihydropyridine ($\epsilon_{326\text{nm}} = 6900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [101]. Le résultat est exprimé en nmol d'adduit INH-NADH formé par minute et par mole de BpKatG (monomère).

Cette méthode a été validée sur les enzymes MtKatG et BpKatG et différents mutants, ainsi qu'avec différents oxydants dans le milieu. Dans ce test, l'activation de l'INH par BpKatG ou MtKatG, en présence d'ions Mn^{2+} et de NAD^+ , en milieu aérobie dans un tampon Tris-HCl à pH 8, a conduit à la formation de l'adduit INH-NADH avec un taux de $2,17 \pm 0,02$ nmol/min avec $0,625 \mu M$ de MtKatG contre $2,21 \pm 0,17$ nmol/min avec $0,625 \mu M$ de BpKatG. Ces deux valeurs, similaires quelle que soit l'enzyme utilisée, démontrent bien que BpKatG est un bon modèle de MtKatG pour ce test d'activation [101].

L'équipe de Peter Loewen a donc étudié dans ces conditions l'activation du benzothiohydrazide **I-12**, composé représentatif de la série, par la catalase peroxydase BpKatG. Les taux de formation d'adduits de type X-NAD ont été mesurés d'après l'absorbance à 326 nm et la valeur $\epsilon_{326nm} = 6900 M^{-1}.cm^{-1}$ donnée pour l'adduit INH-NADH et les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau suivant (Tableau 5).

Tableau 5 : Taux de formation des adduits X-NAD par BpKatG

Entrée	Molécule X	Taux d'adduit (nmol de X-NAD / min)
1	INH	1,95
2	BH	0,37
3	I-12	0,79
4	ETH	0

L'INH, utilisé comme contrôle positif, montre un taux d'activation comparable à celui décrit dans la publication précédemment citée. L'ETH a quant à lui été testé comme contrôle négatif, puisqu'il est également capable de former l'adduit ETH-NADH mais n'est pas activé par l'enzyme KatG. Les résultats du test d'activation du benzothiohydrazides (**I-12**) sont très intéressants puisque ce composé est effectivement activé par KatG et conduit à la formation d'adduits X-NAD avec une vitesse de $0,79$ nmol de X-NAD / min avec $0,625 \mu M$ de BpKatG. Cette valeur est 2,5 fois plus faible que celle mesurée pour l'INH mais permet tout de même de valider notre hypothèse d'activation de structures de type thiohydrazides par KatG.

Par ailleurs, le benzohydrazide BH a également été inclus dans ce test de manière à étudier l'influence de l'atome de soufre de la fonction thiohydrazide (par comparaison de **I-12** et de BH) ainsi que l'influence de la structure du noyau aromatique (BH comparé à INH) pour l'activation par KatG. Ainsi le composé thiohydrazide **I-12** est deux fois plus réactif que son analogue hydrazide BH pour la formation des adduits X-NAD, montrant un effet favorable de l'atome de soufre comparé à l'oxygène. D'autre part, l'INH génère un taux d'adduits cinq fois

supérieur à celui mesuré pour le benzhydrazide BH, démontrant ainsi l'avantage du noyau pyridinyl par rapport au noyau benzyl dans la série hydrazide.

Ces résultats de relation structure-activation laissent donc supposer que le composé cible **I-1**, présentant à la fois un cycle pyridyle et un thiocarbonyle aurait été, si isolable, un substrat très intéressant pour l'activation par l'enzyme KatG.

I.4. Les thiohydrazides sont-ils activables par l'enzyme EthA ?

Après avoir démontré que la structure hybride thiohydrazide était activable par l'enzyme KatG, nous avons poursuivi notre étude afin de déterminer si cette molécule était également activable par EthA. Nous avons pour cela développé une collaboration avec Alain Baulard, à l'Institut Pasteur de Lille, afin de réaliser des tests antimycobactériens dans un contexte d'activation par EthA.

L'étude proposée par Alain Baulard a consisté à évaluer les composés synthétisés non pas par action directe de l'enzyme membranaire EthA, qui est relativement difficile à manipuler, mais plutôt sur MTB en présence et en absence de booster de l'enzyme EthA. En effet, la pro-drogue ETH est bio-activée par l'enzyme monooxygénase à flavine EthA. L'efficacité limitée de l'ETH a été expliquée par une répression transcriptionnelle du gène *ethA* exercée par le régulateur bactérien EthR [140]. EthR contribue à la résistance innée de MTB envers l'ETH et son inhibition est une approche envisagée pour améliorer la bio-activation de l'ETH par inhibition d'EthR. L'équipe d'Alain Baulard en collaboration avec l'équipe du Pr. Benoit Deprez ont ainsi développé des boosters d'EthA (inhibiteurs d'EthR) qui ont fait l'objet de nombreuses publications et de brevets [146,212–215,267–269].

Les composés thiohydrazides ont ainsi été évalués en mesurant le pourcentage d'inhibition de la croissance de la bactérie MTB en absence et en présence de booster d'EthA.

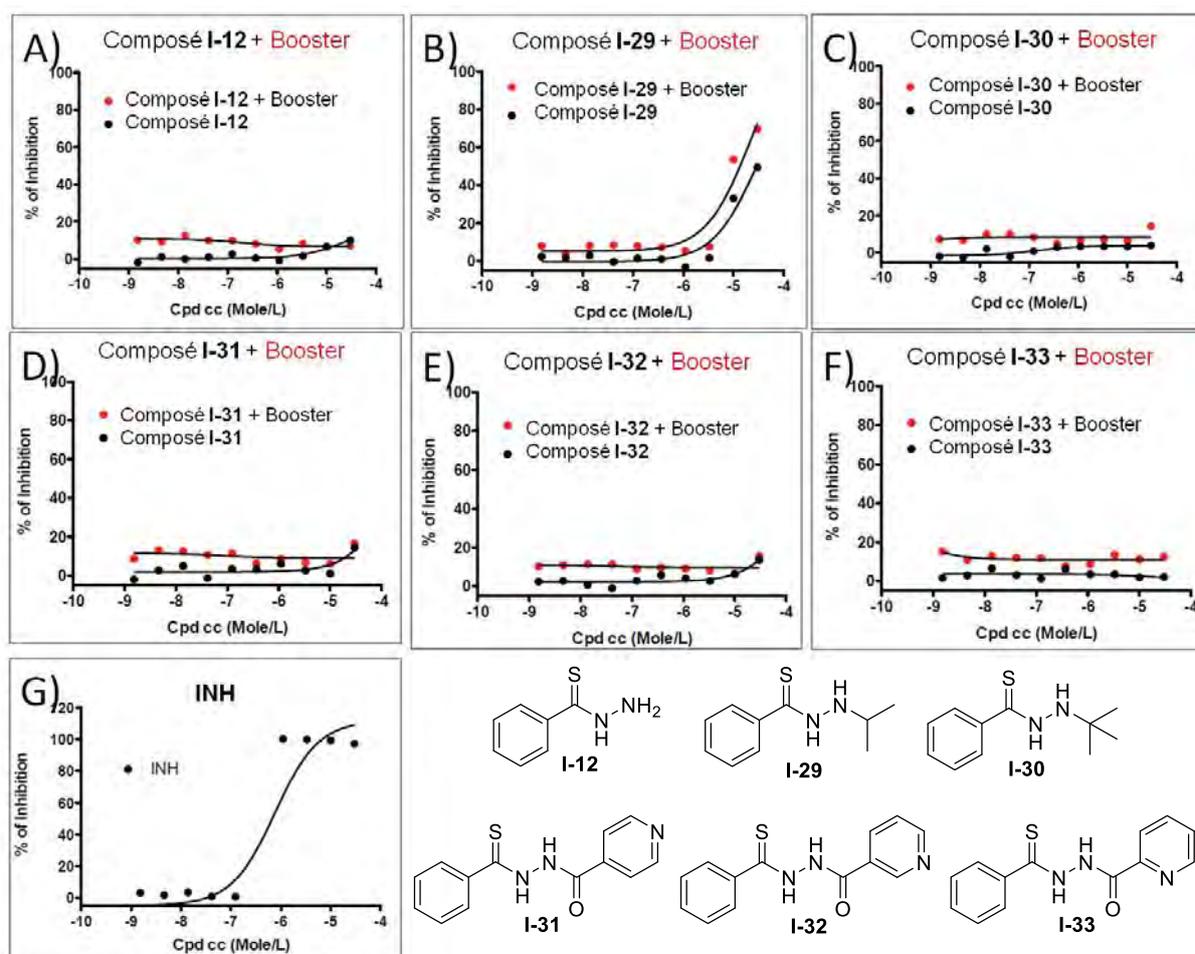


Figure 27 : Test d'inhibition de la croissance de MTB par les thiohydrazides en présence ou non de booster d'EthA

Comparés à l'INH (Figure 27-G), les composés thiohydrazides (Figure 27-A, C-F) ne présentent pas d'activité anti-MTB, à l'exception du composé **I-29** (Figure 27-B). Malheureusement, le booster ne provoque pas d'augmentation de la sensibilité des bactéries aux différents composés et le composé **I-29** conserve lui aussi la même activité en présence de booster d'EthA, ce qui suggère que soit il agit comme drogue, soit comme pro-drogue et dans ce dernier cas, son activation ne passe pas par EthA.

Ce test infirme donc l'hypothèse selon laquelle les thiohydrazides pourraient être des mimes d'ETH activables par EthA.

1.5. Conclusion

La synthèse de thiohydrazides s'est révélée complexe, notamment du fait de leur instabilité en série pyridine. Malgré les difficultés de synthèse, nous avons réussi à synthétiser neuf thiohydrazides en série benzyle. Cependant, la voie de synthèse utilisée impose que la

fonction thiohydrazide soit portée par un noyau phényle non substitué, limitant ainsi la diversité des structures.

Notre stratégie était de synthétiser des molécules hybrides de l'INH et de l'ETH activables par les enzymes KatG et EthA afin de contourner les mutations liées à l'une des deux enzymes. Il s'avère cependant qu'une structure de type benzothiohydrazide ne répond pas à ces critères. Les résultats ont montré que la fonction thiohydrazide choisie peut-être un mime de l'hydrazide (activé par KatG) mais n'est pas un équivalent de la fonction thioamide et de ce fait n'est pas activable via EthA.

Ces premiers résultats ne répondant pas à nos attentes, nous avons cherché à développer d'autres stratégies pour combattre les résistances, notamment celle de développer des analogues de l'INH activables par KatG mutée.

CHAPITRE II. Conception de molécules analogues de l'isoniazide potentiellement activables par KatG mutée

Bien que le nombre de cas de résistances à l'INH augmente, ce médicament reste l'un des meilleurs traitements contre la tuberculose dans le cadre d'une polychimiothérapie car l'un des plus efficace (CMI de 0,2 µM).

Il a été démontré dans la littérature que les résistances à l'INH provenaient principalement de mutations au niveau du gène codant pour l'enzyme d'activation KatG, une catalase-peroxydase [45]. Par exemple, la mutation la plus fréquente, retrouvée dans 50-90% des cas de résistance à l'INH, est la mutation KatG(S315T) où le résidu d'acide aminé sérine en position 315 est remplacé par une thréonine [46]. Des études sur cette mutation KatG(S315T) ont mis en évidence que l'enzyme mutée conservait son activité catalase-peroxydase mais de façon réduite [114]. Une catalase catalyse la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Une peroxydase transforme l'hydrogène peroxyde en eau ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{AH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{A}\cdot$) via l'oxydation de deux molécules (AH) présentes dans le milieu. Dans les conditions de l'étude où KatG sensible et mutée ont été exprimées dans *E. Coli*, l'activité catalase est six fois moins importante et l'activité peroxydase est deux fois moins importante pour KatG mutée que pour KatG sensible. Bien que l'activité catalase-peroxydase soit en partie conservée, cette mutation diminue très fortement l'activité de KatG(S315T) vis-à-vis de l'activation de l'INH. L'absence de bio-activation de l'INH est ainsi responsable des principales résistances à l'INH observées et la CMI est entre 80 et 200 fois plus élevée pour une souche présentant la mutation KatG(S315T) que pour une souche sensible [114]. Aujourd'hui, les recherches tentent donc d'expliquer l'effet négatif de cette mutation sur la bio-activation de l'INH et de découvrir des dérivés d'INH capables de contourner ces résistances.

Deux hypothèses, présentées dans la suite de ce travail, sont avancées dans la littérature pour expliquer les résistances à l'INH de souches de MTB mutées sur KatG et notamment la mutation KatG(S315T) :

- La première hypothèse propose que le défaut d'activation de l'INH, par KatG mutée, provient d'une modification du potentiel d'oxydation de l'enzyme en raison de changements électrostatiques de l'environnement à proximité de l'hème ou des acides aminés impliqués

dans la cascade d'oxydation de KatG mutée [95,116,237]. Nous avons ainsi choisi d'étudier le lien entre le potentiel d'oxydation d'hydrazides analogues de l'INH et leur activité antituberculeuse sur des souches MTB sensibles et mutées.

- La deuxième hypothèse propose que le défaut d'activation de l'INH par KatG mutée provient d'une difficulté d'accès de l'INH au site actif de l'enzyme KatG mutée. La mutation induirait un changement structural de KatG empêchant à l'INH d'accéder ou d'interagir correctement avec le site actif de l'enzyme [238,270]. Pour étudier cette approche, nous avons développé des dérivés d'une molécule analogue de l'INH présentant une longue chaîne alkyle et décrite dans la littérature comme capable de contourner la résistance liée à la mutation KatG(S315T) [116,239].

II.1. Hypothèse d'une modification du potentiel d'oxydation de KatG : stratégie des hydrazides plus facilement oxydables

II.1.1. Introduction

La première hypothèse considère que la mutation S315T sur l'enzyme KatG peut entraîner une modification de potentiel d'oxydo-réduction du fer hémique de l'enzyme KatG.

Cette idée a été mise en avant en 2000 par les travaux de Wengenack *et al.* [237]. Dans cette étude, le potentiel d'oxydo-réduction (KatG $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) est déterminé par voltammétrie à vague carrée (SWV) comme étant entre -0,082 et -0,034 V/ENH pour KatG sauvage et entre 0,112 et -0,042 V/ENH pour l'enzyme KatG(S315T) mutée. Les résultats obtenus sont donc proches pour l'enzyme KatG sauvage ou mutée. Cependant, l'étude a été réalisée sur une enzyme KatG au repos et, comme présenté en introduction, le cycle catalytique de KatG passe par différents intermédiaires (composés I, II et III) pour l'activation de l'INH.

Ainsi en 2004, Ghiladi *et al.* ont mis en évidence une différence de réactivité entre les composés II et III de KatG sauvage et de KatG(S315T) reprenant, entre autres, l'hypothèse d'un potentiel redox différent de l'hème ou d'une cascade d'oxydation différente autour de l'hème de KatG [95]. L'étude de la réactivité de l'enzyme KatG sauvage et mutée KatG(S315T) par radiolyse pulsée a montré des intermédiaires d'oxydation de KatG (composé II ou composé III) différents entre les KatG sauvages ou mutées. Ainsi, pour l'enzyme KatG sauvage, lors de l'analyse par radiolyse pulsée, il y a formation de l'intermédiaire appelé composé III en absence du substrat INH. En présence de l'INH, c'est le composé II qui est observé ; en effet, suite à l'activation de l'INH par l'intermédiaire du composé III, celui-ci se réduit alors pour former le composé II. Cette même analyse réalisée

avec l'enzyme KatG(S315T) montre la formation du composé III en absence ou en présence de l'INH. L'INH n'est donc pas activé via le composé III issu de KatG(S315T) mutée. Le mécanisme et les intermédiaires d'oxydation de KatG proposés dans cette étude sont représentés dans la figure suivante (Figure 28). La réaction B permettant le passage du composé III (en bleu) au composé II (en rouge) et ainsi l'activation de l'INH semble impossible dans le cas de l'enzyme KatG(S315T) mutée. L'utilisation de peroxyde dans le cas de l'enzyme KatG(S315T) mutée permet, dans le cas des réactions C, de retrouver une activation de l'INH avec des taux d'activation inférieurs à ceux de l'enzyme KatG sauvage (cumul des voies d'activation B et C dans le cas de KatG sauvage).

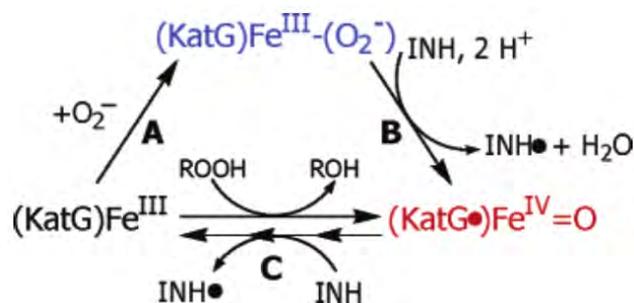


Figure 28 : Mécanisme proposé pour l'activation de l'INH par l'enzyme KatG par Ghiladi et al. [95]. En bleu le composé III, et en rouge le composé II.

Plus récemment, en 2015, des chercheurs ont émis l'hypothèse que la mutation de l'enzyme KatG(S315T) pouvait influencer l'environnement électrostatique de l'hème de KatG(S315T) mutée par une modification du réseau de liaisons hydrogène autour de l'hème [116]. En effet, la modification d'un acide aminé à proximité de l'hème (la sérine remplacée par la thréonine) peut entraîner une modification du réseau de liaison hydrogène et ainsi un changement de conformation de certains acides aminés. Ces modifications amèneraient à une variation électrostatique de l'environnement de l'hème pouvant impliquer une réactivité et un potentiel d'oxydation différents pour l'enzyme KatG(S315T).

Même si dans le passé de nombreux analogues de l'INH ont été synthétisés et décrits dans la littérature, peu d'études ont été consacrées à l'influence des modifications structurales sur le potentiel d'oxydation ou encore au lien existant entre le potentiel d'oxydation et l'activité biologique. Afin d'examiner si les résistances à l'INH, via la détermination de la CMI sur souches résistantes à l'INH, pourraient être corrélées aux potentiels d'oxydation de divers hydrazides, nous avons choisi de synthétiser une famille d'hydrazides présentant une

large gamme de potentiels d'oxydation et d'étudier leur activité antimycobactérienne sur des souches sauvages et résistantes à l'INH.

L'article suivant présente les synthèses d'hydrazides et de thiohydrazides, analogues de l'INH, l'étude de leurs potentiels d'oxydation et de leurs activités inhibitrices de la croissance mycobactérienne de souches sauvages et résistantes à l'INH [63]. Le but de cet article est de s'interroger sur la relation entre le potentiel d'oxydation et l'activité biologique. Cette publication présente également le détail du mécanisme d'activation de l'INH au niveau moléculaire. Ce point sera développé plus en détails dans la partie 2.I de cette thèse.

II.1.2. Article 1: *ChemistrySelect*, 2016, 1(2), 172-179

Synthesis, oxidation potential and anti-mycobacterial activity of isoniazid and analogues: insights into the molecular isoniazid activation mechanism

Julie Laborde, Céline Deraeve, Léa Lecoq, Alix Sournia-Saquet, Jean-Luc Stigliani, Béatrice S. Orena, Giorgia Mori, Geneviève Pratviel and Vania Bernardes-Génisson.

ChemistrySelect, 2016, 1(2), 172-179

Résumé de l'article en français (hors mécanisme d'activation de l'INH) :

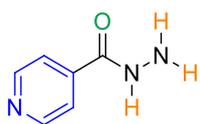


Figure 29 : Structure de l'isoniazide

Pour la synthèse des hydrazides analogues de l'INH, trois types de modifications ont été apportés :

- Modification du cycle pyridine
- Substitutions des azotes proximal et distal
- Remplacement du groupement carbonyle par un groupement thiocarbonyle (Partie 1, Chapitre I).

La modification du cycle pyridine ou la substitution des azotes de la portion hydrazine a conduit à la préparation de douze hydrazides. Différentes voies de synthèses ont été utilisées soit en faisant réagir un acide activé (ester ou un chlorure d'acyle) avec des hydrazines, soit par amination réductrice du produit résultant de la réaction entre l'acétone et l'INH ou le benzohydrazide (BH). La réactivité des hydrazines substitués sera différente (position du substituant) selon la nature de la forme activée de l'acide (dérivé ester ou chlorure d'acyle) utilisée. Neuf benzocarbothiohydrazides ont été synthétisés en utilisant l'acide *S*-(thiobenzoyl)-thioglycolique, dont cinq molécules bi-cycliques présentant à la fois une fonction carbonyle et thiocarbonyle, de part et d'autre de la fonction hydrazine.

L'étude électrochimique de ces composés a montré des potentiels de pic d'oxydation compris entre 0,37 et 1,21 V/ENH dans une solution de tampon phosphate et avec une électrode de travail en carbone vitreux. Le potentiel de pic d'oxydation de l'INH dans les mêmes conditions a été mesuré à $1,01 \pm 0,04$ V/ENH, ce qui est en accord avec la plupart des études de la littérature [271–275].

La modification du cycle pyridine (composés **2-8**) entraîne une légère diminution du potentiel d'oxydation sans améliorer l'activité biologique sur des souches de MTB sauvages ou résistantes à l'INH, voire même en entraînant une perte d'activité. Au regard des propriétés chimiques et physico-chimiques des hydrazides apparentés : INH, BH, **3** et **4**, la légère diminution du potentiel d'oxydation ne peut pas expliquer cette disparité sur l'activité biologique. Cette différence d'activité entre les différents hydrazides pourrait donc provenir de modes d'interactions différents au niveau de l'enzyme KatG, de la stabilité du radical formé ou de la capacité du radical à former des adduits avec le cofacteur NAD.

La substitution des azotes de l'hydrazide (composés **10-15** et **17-19**) entraîne par ailleurs soit une augmentation du potentiel d'oxydation, soit une diminution de celui-ci mais sans corrélation avec l'activité antimycobactérienne.

La substitution de l'oxygène par le soufre diminue considérablement le potentiel de pic d'oxydation. Cependant, l'activité antimycobactérienne, moins bonne que celle de l'INH, est en désaccord avec l'hypothèse de départ proposant que les résistances soient liées à une diminution du potentiel redox de KatG. Les molécules bi-cycliques **20-24**, présentant deux pics d'oxydations dont un d'une valeur basse, ne montrent pas non plus d'amélioration de l'activité antimycobactérienne comparé à l'INH.

Ces résultats montrent que des hydrazides et des thiohydrazides plus facilement oxydables ne présentent pas une meilleure activité anti-TB *in vitro* sur des souches de MTB sauvages ou résistantes à l'INH et que le potentiel d'oxydation n'a pas d'influence directe sur l'activité antimycobactérienne des hydrazides étudiés.

Medicinal Chemistry & Drug Discovery

Synthesis, oxidation potential and anti-mycobacterial activity of isoniazid and analogues: insights into the molecular isoniazid activation mechanism

Julie Laborde,^[a, b] Céline Deraeve,^[a, b] Léa Lecoq,^[a, b] Alix Sournia-Saquet,^[a, b] Jean-Luc Stigliani,^[a, b] Beatrice S. Orena,^[c] Giorgia Mori,^[c] Geneviève Pratviel,^[a, b] and Vania Bernardes-Génisson*^[a, b]

Tuberculosis (TB) is one of the leading causes of death due to infectious diseases. Among the specific drugs currently employed to treat tuberculosis, isoniazid (INH), a pro-drug, attracts a great interest. However, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) clinical isolates resistant to INH are significantly increasing thus compromising the efficiency of TB-treatment. Concerning the mechanism of resistance to INH, it is nowadays well established that it mainly results from mutations in the *katG* genes encoding for INH enzymatic activator. Recently, it was proposed that mutation in *katG* induces differences in heme or side chain redox potential so that the enzyme loses its ability to oxidize INH to radical species. In this work, we synthesized and selected a

series of INH analogues for a study of their oxidation potential and evaluation of their anti-TB efficiency toward MTB wild-type and drug resistant strains. On the contrary to what was postulated, no correlation exists between the easier oxidation of a molecule and its anti-MTB activity toward resistant strains. Based on experimental data and theoretical calculations, we proposed an activation mechanism for INH and analogues based on a one-electron oxidation step of the hydrazyl function at the proximal nitrogen followed by a radical transposition to the distal nitrogen, which then induces a β -homolytic cleavage of the C(=O)-N bond to afford diazene and the isonicotinoyl radical species.

Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the leading causes of death in the world among the infectious diseases. According to WHO, one-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and approximately 1.5 million deaths occur from tuberculosis each year.^[1] The specific drugs used currently to treat TB were discovered long time ago. During the last forty years only one molecule was approved and commercialized as specific anti-MTB drug (bedaquiline FDA-2102)^[2] and it still suffers of many drawbacks and has a limited use (third-line antibiotic). It illustrates how difficult and complex is the research for new anti-TB drugs.

Among the specific drugs employed currently to treat tuberculosis, isoniazid (INH), used since 1952 as a frontline antibiotic, conserves up to current date a great interest due to its specificity and efficiency of action, its relatively few side effects

and its low cost. Despite this success, *M. tuberculosis* isolates resistant to INH are significantly increasing compromising the efficiency of the TB-treatment. Even though INH is an old medicine, its mechanisms of action and of resistance are not completely elucidated. Better knowledge of these mechanisms seems to be essential in view of the rational design of more efficient drugs, ideally, able to overcome resistance phenomena.

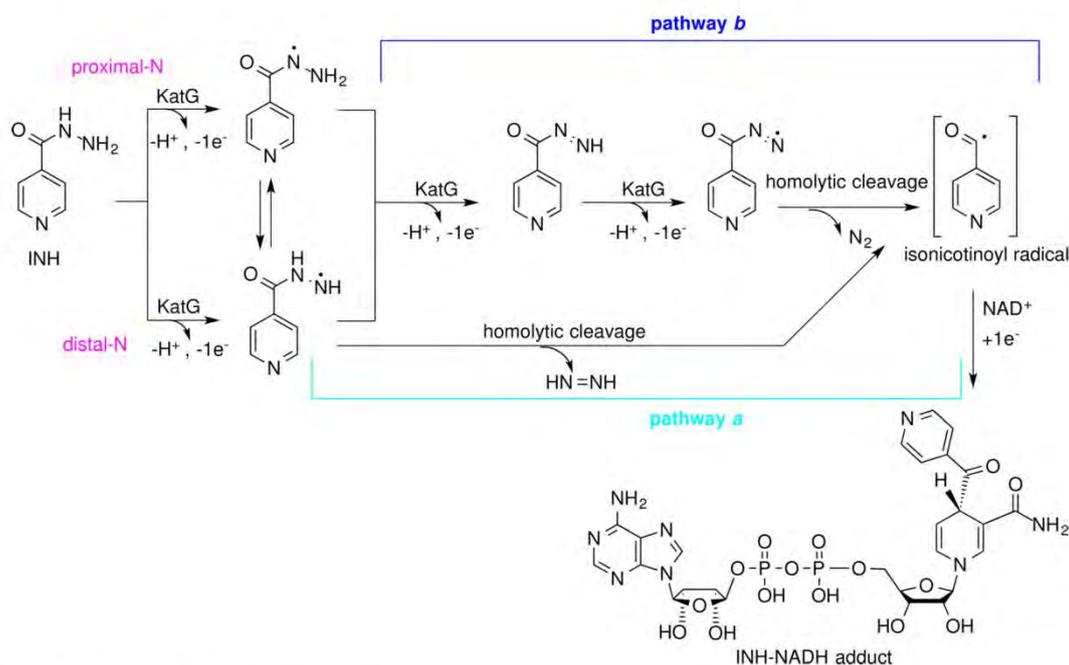
For INH, several hypotheses have been proposed to account for its efficacy against MTB growth.^[3] The most accepted mechanism of action proposes INH as a pro-drug. In fact, INH requires, to become active, an oxidative activation step by the mycobacterial catalase peroxidase enzyme KatG to generate the isonicotinoyl radical. This radical then reacts covalently with the NAD cofactor (nicotinamide adenine dinucleotide) to form the active metabolite (INH-NADH adduct), which inhibits InhA, an essential enzyme implicated in the mycolic acid synthesis.^[4] *In vitro*, during the oxidation step of INH by KatG, which is a heme-protein, and in the presence of manganese ions (Mn^{3+}), other metabolites such as isonicotinic acid, isonicotinamide and isonicotinaldehyde were also detected^[5] but they were devoid of anti-mycobacterial activities. In addition, it is proposed that *in vivo* the activation of INH by KatG can also lead to alternative pathways through which other potent radical species (diazanyl, hydrazyl, nitric oxide, etc) are formed, disabling many MTB cellular processes and contributing thereby to the global anti-mycobacterial activity of the drug.^[3,6]

[a] J. Laborde, Dr. C. Deraeve, L. Lecoq, Dr. A. Sournia-Saquet, Dr. J.-L. Stigliani, Dr. G. Pratviel, Prof. Dr. V. Bernardes-Génisson
CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205, route de Narbonne, BP 44099, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France
E-mail: vania.bernardes-genisson@lcc-toulouse.fr

[b] J. Laborde, Dr. C. Deraeve, L. Lecoq, Dr. A. Sournia-Saquet, Dr. J.-L. Stigliani, Dr. G. Pratviel, Prof. Dr. V. Bernardes-Génisson
Université de Toulouse, UPS, INPT, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

[c] B. S. Orena, G. Mori
University of Pavia, Dipartimento di Biologia e Biotechnologie "Lazzaro Spallanzani", via Ferrata 1, 27100, Pavia, Italy

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201600040>



Scheme 1. Possible oxidation pathways for isoniazid.

Recently, it was shown that, besides INH, hydrazide of the benzoic acid can also be activated *in vitro* by KatG and Mn^{3+} forming the benzoyl-NADH adduct and inhibiting InhA target in nanomolar concentration.^[7]

Concerning the mechanism of resistance of MTB toward INH, it is well established nowadays that it results mainly from mutations in the genes encoding for MTB KatG enzyme that diminish its ability to oxidize INH into the active form.^[8] *In vitro*, the INH drug, to be activated by KatG, should first penetrate into MTB cells by a passive diffusion, reach the active site of KatG enzyme and then undergo an oxidative reaction allowing formation of reactive radical species. In the case of mutated KatG, two possibilities may be proposed: a) mutation induces structural changes in KatG and INH cannot access and/or interact correctly with KatG b) mutation induces differences in heme or side chain redox potential of KatG and the enzyme loses its ability to oxidize INH to radical species.^[9]

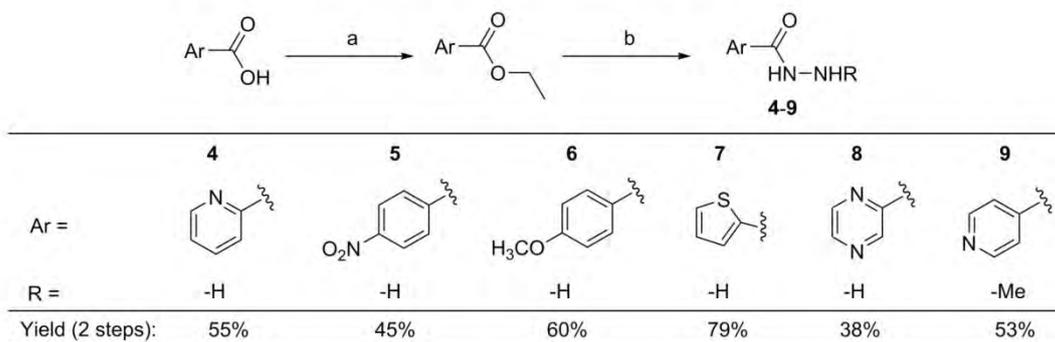
Although some proposals intended at understanding the mechanism of oxidation of INH and hydrazide analogues were reported in the past,^[10] the detailed knowledge of this oxidative mechanism is still rather limited and confused. In the literature, some authors propose that the INH oxidation reaction first occurs upon distal (related to the carbonyl group, scheme 1) nitrogen atom.^[11] Others postulate that the hydrazyl radical, formed from the initial oxidation, can reside on the proximal nitrogen atom (related to the carbonyl group) (Scheme 1).^[11–12] In addition, the number of electrons implicated and the compounds formed (nitrogen or diazene) in the INH activation processes are still a matter of debate.

Since the discovery of INH as anti-tubercular drug, several analogues were prepared and evaluated. However, very few studies were carried out in the aim of understanding how INH structural modifications could influence the oxidation potential, the oxidative mechanism by KatG, the mode of interaction with this target and hence the efficacy against MTB growth. The understanding of the influence of these structural features on the anti-TB activity is fundamental and may lead to a more effective and low cost strategy for the design of novel anti-tubercular compounds.

The purpose of the present paper is to synthesize and to select a series of INH analogues as candidates for a study of determination of their oxidation potential and evaluation of their activity against wild and resistant MTB strains. This, to get insights into the correlation that might exist between the redox potential and their anti-MTB activity. Moreover, in order to contribute with new elements for the understanding of the INH oxidation mechanism, theoretical calculations were also performed.

Results and Discussion

To obtain several analogues of INH (1) with a wide range of oxidation potential, to evaluate the influence of chemical modifications on the oxidation potential, INH was modified in three main distinct regions: i) modifications of pyridine cycle (including commercial benzohydrazide 2, pyridine-3-carbohydrazide 3 and others), ii) introduction of substituents upon proximal and distal hydrazide nitrogens and iii) replacement of carbonyl by a thiocarbonyl group that could have an interference in the oxi-



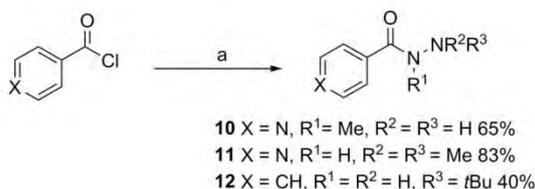
Scheme 2. Synthesis of hydrazides **4–9** from the corresponding carboxylic acids. Reagents and conditions: a) EtOH, H₂SO₄, MW, 2 h, 100 °C; b) H₂N-NHR, EtOH, MW, 2 h, 120 °C.

dation potential and also in the radical stability. In addition, we were also interested in evaluating benzocarbthiohydrazides substituted in nitrogen distal position by a pyridoyl, pyrazinoyl and thienoyl group since they represent hybrid compounds of both hydrazide and thiohydrazide series. The relationship between oxidation potential and anti-mycobacterial activity has also been questioned in this study.

Synthesis

Hydrazides were easily obtained in two steps by esterification of the corresponding carboxylic acid followed by addition of hydrazine hydrate or methylhydrazine (Scheme 2, **4–9**). The use of microwave (MW) activation allowed reducing the reaction time when compared to classical thermal activation (from 48 hours to two hours).

In the case of the employ of methylhydrazine, surprisingly, the attack on the carbonyl occurs through the reagent's primary amine, leading to *N*'-methylpyridine-4-carbohydrazide **9**. The regioisomer, *N*-methylpyridine-4-carbohydrazide **10**, was prepared through the reaction of methylhydrazine with isonicotinic acid chloride, at room temperature, and in these conditions, the nucleophilic attack proceeds through the more nucleophilic amine, as expected (Scheme 3). Because of steric

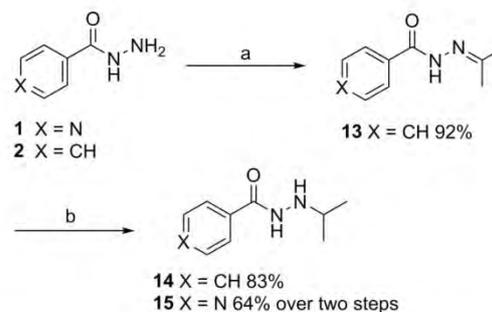


Scheme 3. Synthetic pathways for substituted arylhydrazides **10–12** from the corresponding acyl chlorides. Reagents and conditions: a) NHR¹NR²R³, DCM, RT, 18 h.

hindrance in the carbonyl proximity for the latter compound **10**, two rotamers are observed in a 80 : 20 ratio in ¹H and

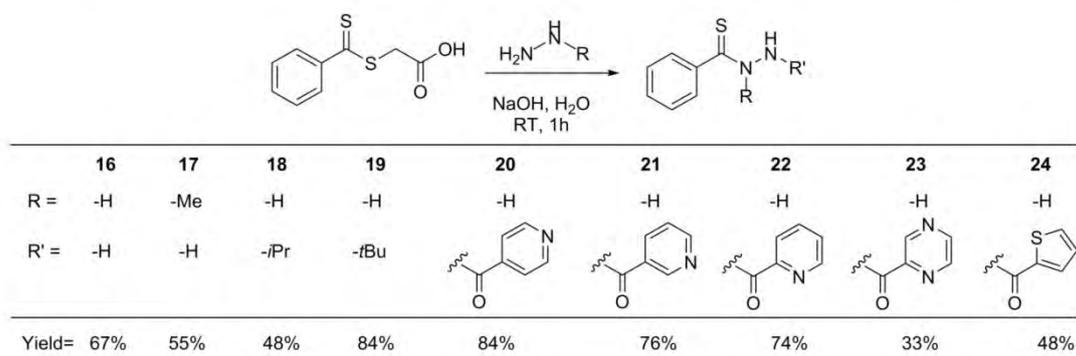
¹³C NMR experiments in DMSO-*d*₆ at 298 K that equilibrate into a single form when heating to 373 K. Furthermore, the use of the more sterically hindered *tert*-butyl- or isopropyl hydrazines instead of hydrazine according to Scheme 1 failed to produce substituted hydrazides from the corresponding esters. More reactive acyl chlorides were thus employed for substitution by *N,N*-dimethylhydrazine or *tert*-butylhydrazine (compounds **11** and **12**, Scheme 3).

In the case of a substitution by an isopropyl group, *N*'-(propan-2-yl)benzocarbthiohydrazide **14** and *N*'-(propan-2-yl)pyridine-4-carbohydrazide **15** were prepared in two steps by reacting benzohydrazide **2** or INH **1**, respectively, with acetone, followed by the reduction of the resulting imines by sodium cyanoborohydride (Scheme 4).

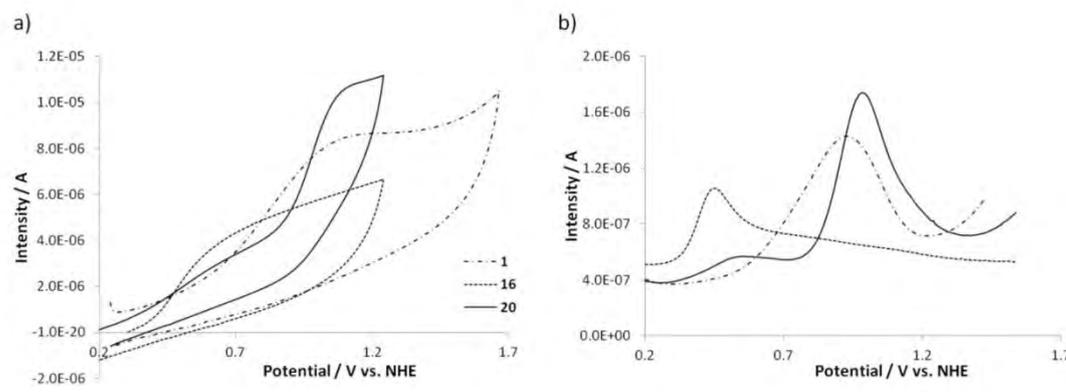


Scheme 4. Synthetic pathways for substituted arylhydrazides **14–15** from INH and benzohydrazide. Reagents and conditions: a) acetone, acetic acid, RT, 15 min; b) NaBH₃CN, MeOH, 0 °C, 1 h30.

Benzocarbthiohydrazides were synthesized according to a classical procedure by reacting various hydrazines with 5-(thiobenzoyl)thioglycolic acid in the presence of sodium hydroxide (Scheme 5). Considering the moderate stability of carbthiohydrazides, this method is very convenient since the reaction proceeds quickly at room temperature and allows the final product to be recovered by filtration after neutralization. While methyl hydrazine reacts on the thiocarbonyl through the more nucleo-



Scheme 5. Synthesis of benzocarbothiohydrazides 16–24.

Figure 1. Cyclic (a) and square wave (b) voltammograms on glassy carbon ($r=0.5$ mm) of compounds **1**, **16** and **20** (10^{-3} M) in phosphate buffer (100 mM, pH 7.5) /DMSO 90/10 at room temperature, scan rate 0.2 V/s.

philic secondary amine (compound **17** ($R=Me$, $R'=H$)), as already described by Jensen *et al.*^[13] more hindered isopropyl- and *tert*-butyl hydrazines attack the $C=S$ group through their primary amine (**18**, **19**). Furthermore, when the reaction is carried out with hydrazides instead of hydrazines, N' -aroyl benzocarbothiohydrazides are also easily obtained (Scheme 5, **20–24**).

Electrochemical studies

Cyclic and square wave voltammetry experiments were performed with phosphate buffer (100 mM, pH 7.5) solutions of studied compounds (solubilized in DMSO, 10% final DMSO percentage) at ambient temperature, on a glassy carbon-working electrode. Oxidation peak potential is an average of 10 measurements. Each measurement was realized after polishing working electrode.

All compounds display a first irreversible oxidation process, along with the adsorption of the oxidized compound on the electrode surface. The adsorption occurrence on oxidation process of INH was previously reported by Mellado *et al.*^[14] Anodic peak potentials (E_a) versus NHE are listed in Table 1.

Typical voltammograms are depicted in Figure 1. For hydrazides and carbothiohydrazides (represented by compounds **1** and **16**, respectively), the shape is similar although the first anodic peak appears at lower potential in the case of carbothiohydrazides (0.53 V/NHE for **16** compared to 1.01 V/NHE for **1**). In the case of N' -aroylbenzocarbothiohydrazides (Figure 1, compound **20**), two successive oxidation peaks are observed. The first wave (0.63 V/NHE) is large and the intensity very small but is clearly visible on the square wave voltammogram, followed by a second wave, more pronounced, at 1.07 V/NHE. Since these values are comparable to the anodic peak potentials of **16** and **1** respectively, it is possible to attribute these values to the oxidation of the carbothiohydrazide moiety first, followed by the oxidation of the hydrazide. Compound **24** behaves similarly, but in the case of compounds **21**, **22** and **23**, the first wave is too weak to be measured and the first anodic peak is observed at high potentials.

Evaluation of activity against *M. tuberculosis* growth

The activity of compounds **2–24** against H37Rv and two INH resistant clinical strains was evaluated as previously reported.^[15]

Table 1. Oxidation potentials scale (first anodic peak) of compounds (10^{-3} M) in phosphate buffer (100 mM, pH 7.5) measured on glassy carbon working electrode by cyclic voltammetry at room temperature, scan rate 0.2 V/s.

Compound	E_{a} (V/NHE)
1 (INH)	1.01 ± 0.04
2	0.84 ± 0.03
3	0.84 ± 0.07
4	0.97 ± 0.08
5	0.71 ± 0.04
6	0.74 ± 0.02
7	0.68 ± 0.05
8	0.82 ± 0.07
9	0.84 ± 0.04
10	1.25 ± 0.05
11	1.21 ± 0.03
12	0.91 ± 0.03
13	0.78 ± 0.05
14	0.81 ± 0.01
15	0.93 ± 0.04
16	0.53 ± 0.03
17	1.08 ± 0.03
18	0.42 ± 0.01
19	0.37 ± 0.02
20	0.63 ± 0.03
	1.07 ± 0.01 ^a
21	1.10 ± 0.03
22	0.96 ± 0.01
23	1.21 ± 0.01
24	0.59 ± 0.03
	1.01 ± 0.09 ^a

a. value for the second oxidation peak.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) was determined as the lowest drug concentration inhibiting bacterial growth. INH 1 was used as a positive control. The results are presented in Table 2.

Relationship between structure, oxidation potential and anti-tubercular activity

The oxidation peak potential of INH in phosphate buffer solution was measured at 1.01 V/NHE on a glassy carbon-working electrode. This value is in accordance with previously reported studies in buffered media.^[16] In the same conditions, the oxidation potential of the synthesized analogues of INH vary from 0.37 to 1.21 V/NHE. Analysis of structure, oxidation peak potential and anti-MTB activity relationship, performed with these compounds, reveals that the position of the nitrogen of pyridine (*para*, *meta* and *ortho* with respect to the hydrazide function), does not significantly impact the oxidation potential in the above conditions. The regioisomer *para*, *meta* and *ortho* exhibited almost similar oxidation potential (compounds 1, 3 and 4, respectively). Although these compounds have alike oxidation potential, suggesting that KatG would be able to activate these three molecules, their anti-MTB activities are significantly different (1 MIC = 0.05 µg/mL, 3 MIC > 20 µg/mL and 4 MIC = 1.0 µg/mL, Table 2) against MTB wild-type strain. Additionally, the replacement of the pyridine ring by a phenyl (substituted or not), thienyl and pyrazinyl aromatic group leads to hydrazides with lower oxidation potentials than INH (compounds 2

and 5–8, Table 1) but without improvement of anti-mycobacterial activity toward MTB INH resistant strains (MIC = 40 µg/mL for compound 5, Table 2). The poor activity of 2 toward MTB wild-type strain is particularly surprising since it has been reported in the literature that the benzoyl-NAD adduct is, *in vitro*, an inhibitor of InhA as potent as INH-NAD adduct.^[7] Taking into account that one can expect relatively close chemical and physico-chemical properties (molecular weight, penetrability, etc) between isoniazid (1) and benzohydrazide (2), and that the respective adducts inhibit InhA in the same order of magnitude, we hypothesize that the difference of activity likely originates from the activation step by KatG. As the measured oxidation potential cannot account for this difference of behavior between these two compounds, it is now conceivable that the pyri-

Table 2. Activity of the compounds against *M. tuberculosis* wild type (H37Rv) and clinical mutant strains (IC₁ and IC₂).

Compounds	MIC (H37Rv strain)			MIC clinical mutant IC ₁ ^a		MIC clinical mutant IC ₂ ^b	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	
1 (INH)	0.05	0.36	> 0.2	> 1.45	> 0.2	> 1.45	
2	> 20	> 145	> 20	> 145	> 20	> 145	
3	> 20	> 145	> 20	> 145	> 20	> 145	
4	1.0	7.3	> 20	> 145	> 20	> 145	
5	20	110	40	220	40	220	
6	> 20	> 120	n.d.		n.d.		
7	≥ 20	≥ 140	n.d.		n.d.		
8	> 20	> 145	n.d.		n.d.		
9	2.5	16.5	> 20	> 130	> 20	> 130	
10	20	130	> 20	> 130	> 20	> 130	
11	20	120	> 20	> 120	> 20	> 120	
12	> 20	> 104	n.d.		n.d.		
13	> 20	> 115	> 20	> 115	> 20	> 115	
14	> 20	> 115	> 20	> 115	> 20	> 115	
15	20	112	> 20	> 112	> 20	> 112	
16	20	132	40	264	40	264	
17	> 20	> 120	> 20	> 120	> 20	> 120	
18	≥ 20	≥ 103	n.d.		n.d.		
19	10	48	> 20	> 96	> 20	> 96	
20	> 20	> 77	n.d.		n.d.		
21	10	39	10	39	10	39	
22	> 20	> 77	n.d.		n.d.		
23	> 20	> 77	n.d.		n.d.		
24	20	76	> 20	> 76	> 20	> 76	

a. IC₁ drug resistance profile: resistant to streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol. b. IC₂ drug resistance profile: resistant to streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide, ethionamide, capreomycin. All assays were repeated three times. Standard deviations ± 0.025 µg/mL.

dine ring plays a crucial and precise role in the interaction with the hemic protein KatG and/or in the stabilization of the radical conferring it a long enough life-time and allowing it to better react with NAD cofactor *via* a covalent bond. To verify this last hypothesis, the stability of the aroyl radicals Ar-CO \cdot was estimated with the energy level of the natural orbital occupied by the unpaired electron, computed with the Natural Bond Orbital (NBO) method.^[17] The results for the compounds **1–4** and **16** are shown in the Table 3. The NBO energies of the pyridoyl rad-

	SOMO energy ^a	Bond dissociation energy ^b		Bond order ^c		ΔG^{d}	
		N–H prox.	N–H dist.	N–H prox.	N–H dist.	Pathway a	Pathway b
		1	-9.09	75.42	80.69	0.798	0.842
2	-8.71	75.52	80.14	0.800	0.845	152.50	305.26
3	-8.93	75.48	80.56	0.799	0.844	153.51	306.27
4	-9.03	82.92 ^e	79.25	0.780	0.844	157.43	310.19
16	-8.06	72.72	79.33	0.780	0.838	152.77	305.53

a. Energy of the Singly Occupied Molecular Orbital (SOMO) of the aroyl radicals: Ar-CO \cdot , computed with the Natural Bond Orbital (NBO) method, eV; b. enthalpy change of the homolytic bond cleavage of the N–H bond, kcal/mol; c. Wiberg bond indices computed with the NBO method; d. Total Free energy variation of the two pathways represented in scheme 1, kcal/mol; e. The unexpected large energy value can be explained by the presence of a hydrogen bond between the *ortho* nitrogen of the pyridine and the proximal N–H.

icals of **1**, **3** and **4** are close to -9 eV and that of the benzoyl radical derived from **2** is slightly higher (-8.71 eV). Although the benzoyl radical derived from **2** has indeed exhibited slightly higher energy than the isonicotinoyl radical arisen from **1**, this difference of energy cannot solely explain the distinct behavior of **1** and **2** since the radical generated from **1**, **3** and **4** have comparable NBO energy and however, **3** and **4** are not as active as **1**.

Carbothiohydrazides are much more easily oxidized than the parent hydrazide **2** and INH. While hydrazide **2** and INH exhibit oxidation wave at potential of 0.84 V/NHE and 1.01 V/NHE, respectively in aqueous buffer, benzocarbothiohydrazide **16** reacts at about 0.53 V/NHE in the same conditions (Table 1). However, compound **16** proved to be poorly active on wild type MTB as well as on mutants. The low oxidation potential was not correlated with a better anti-mycobacterial activity of **16** toward MTB resistant strains when compared to H37Rv.

The mono alkyl substitution of the distal nitrogen of the carbothiohydrazide function leads to derivatives with an oxidation potential lower than the parent compound **16** (see **18** and **19** compounds in the carbothiohydrazide series). This effect is also observed in INH and **2** distal alkyl analogues (compounds **9**, **14** and **15**), with the exception of compound **12**, which has a slightly higher oxidation potential than its parent compound **2**. However, again the decrease of the oxidation potential did not correlate with an improvement of the anti-mycobacterial activity toward MTB resistant strains.

For the hybrid derivatives **20** and **24**, in which the distal nitrogen was substituted by an aroyl group, two oxidation peaks were observed for each compound, corresponding to the pyridyl/thienyl hydrazide and benzocarbothiohydrazide moieties. For compounds **21**, **22** and **23**, the first wave of oxidation was too weak to be measured. Even if theoretically oxidation could occur and aroyl radicals could eventually be formed, no significant anti-MTB activity was measured for these hybrids compounds.

Thereby, altogether, these results clearly indicated that hydrazides and carbothiohydrazides more easily oxidizable than INH do not display better *in vitro* anti-TB activity toward resistant strains.

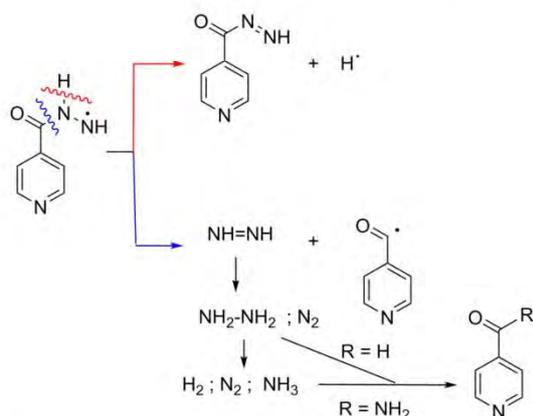
Lastly, the effect of the substitution of the proximal nitrogen of INH has also been evaluated. Derivative **10**, presenting a methyl substituent at the proximal nitrogen of the hydrazine portion, exhibited a high oxidation potential (1.25 V/NHE) when compared to INH **1** (1.01 V/NHE) and to **9** (0.84 V/NHE, alkylated on distal nitrogen). The same observation could be made in the carbothiohydrazide series by comparing compound **17** (1.08 V/NHE, methylated at the proximal nitrogen) to derivatives **16** (0.53 V/NHE, unsubstituted), or **18** and **19** (0.42 V/NHE and 0.37 V/NHE respectively, alkylated on distal nitrogen) (Table 1). In order to elucidate which site (proximal or distal position) would be easier to oxidize, the bond dissociation energies, which reflects the stability of the resulting free radicals, of the proximal and distal N–H bonds of compounds **1–4** and **16** were calculated. The data showed that in general the homolytic cleavage of the proximal hydrogen of the hydrazine moiety resulted in a lower energy cost of about 5 kcal/mol compared with the distal hydrogen (Table 3). This result corroborates the fact that it is more difficult to oxidize distal nitrogen than proximal nitrogen, even though the difference is relatively small. Furthermore, to support this result, we also computed the NBO-Wiberg bond indices of proximal and distal N–H bonds (Table 3). The proximal N–H bond strength was found to be weaker than distal N–H bond (Table 3). This result also provided evidence that initial oxidation likely occurs on proximal position of the hydrazyl moiety.

The essential step for the anti-mycobacterial action of INH is its activation into the reactive species, the isonicotinoyl radical. The mechanism through which isonicotinoyl radical is formed from INH is not yet elucidated.^[18] It was postulated that the isonicotinoyl radical intermediate can be generated from a pathway involving an one-electron oxidation followed by a homolytic cleavage of the C(=O)-N bond along with the release of diazene (mechanism *a*, Scheme 1). An other possibility involves three sequential one-electron oxidations followed by a homolytic cleavage of the C(=O)-N bond, which results in molecular nitrogen and isonicotinoyl radical formation (mechanism *b*, Scheme 1).

To better understand the reaction pathway leading to isonicotinoyl radical, we compared in term of free energy (ΔG) the two proposed pathways *a* and *b* (Scheme 1) that release different compounds, diazene and nitrogen, respectively. The computational calculations showed that the first pathway (mechanism *a*) is much more economical in energy. Globally, process *a*

needs 154.7 kcal/mol to occur whereas for pathway *b* 307.4 kcal/mol is needed (Table 3). This result suggests that the INH oxidation mechanism is, as could be expected in terms of energy, in favor of pathway *a*.

As the initial step of INH activation consists of oxidizing the hydrazide function, we propose, based on our results, that the initial oxidation of INH predominantly occurs at proximal nitrogen of the hydrazyl moiety consistent with the postulated mechanism reported by others.^[11–12] As the pathway *a* is globally much less energy-consuming than pathway *b* (Scheme 1), it is strongly probable that diazene (arisen from β -homolytic scission after the oxidation step) and not acyl diimide (arisen from a second oxidation) is the subsequent product formed after the first oxidation step. Thus, taking into account that: a) oxidation occurs first at the proximal nitrogen, b) diazene might be formed and c) β -scission is in general more favorable than α -scission, we propose that the first radical, initially generated at the proximal position, migrates to the distal nitrogen inducing a β -homolytic scission bond. When the radical is located on the distal position two β -scissions may be possible: cleavage of the proximal N–H bond to give acyl diimide intermediate or cleavage of the C(=O)–N bond to give diazene and isonicotinoyl radical (Scheme 6). The bond dissociation energies for these



Scheme 6. Two possible β -scissions from the hydrazyl radical and propositions for isonicotinamide and isonicotinylaldehyde formation.

two possible β -homolytic scissions (proximal N–H bond and C(=O)–N bond) were also calculated for comparison. It is particularly interesting to note that the β -scission leading to diazene formation (homolytic cleavage of the C(=O)–N bond) is much more energetically favorable than that involving β -scission of the N–H bond and subsequent acyl diimide formation (41.94 kcal/mol and 64.39 kcal/mol respectively). These results are in accordance with the mechanism proposed by J. Bodiguel *et al.*^[5b] Interestingly, the release of diazene can also explain the formation of amide (one of the final non-active compounds) since its decomposition generates later ammonia,^[19] which can react with isonicotinoyl radical to yield isonicotinamide. In addition, pathway *a* can also account for the formation of iso-

nicotinylaldehyde metabolite. The reducing properties of diazene and/or hydrazine (formed from decomposition of diazene) may be responsible of the conversion of isonicotinoyl radical into isonicotinylaldehyde. It is interesting to note that during the activation of the second-line anti-tubercular drug, ethionamide,^[20] in which a similar isonicotinoyl radical is also formed but by another route, the corresponding aldehyde was not detected as final metabolite. Indeed during the ethionamide activation process no hydrazine or other reductive agent is produced.

Another observation in favor of pathway *a* is that compounds alkylated on distal nitrogen position, as **9**, partially still exhibit an inhibitory activity toward MTB growth, suggesting that **9** may be activated inside mycobacteria. The presence of a substituent at the distal nitrogen makes unfeasible the activation via pathway *b* since in this case N_2 cannot be generated.

Conclusion

In this work, a series of 21 INH analogues was synthesized, their oxidation potentials were determined and their anti-mycobacterial activity was evaluated against MTB wild-type and resistant strains.

Altogether, the results showed that INH analogues with lower oxidation potential are not better MTB growth inhibitors toward resistant strains than INH, revealing thus that no correlation exists between the easier oxidation of a molecule and its anti-MTB activity. Moreover, the nature of the pyridine ring of INH, and not the stability of the radical species, plays an essential role in the interaction and activation of the drug by the hemic KatG enzyme. Furthermore based on experimental and theoretical data, this work allowed us to propose a mechanism of activation for INH and analogues, based on one-electron oxidation step. It involves first the oxidation of hydrazyl function at the proximal nitrogen atom followed by a radical transposition toward distal nitrogen that induces a β -homolytic cleavage of the C(=O)–N bond to afford diazene and isonicotinoyl radical species.

Supporting Information summary

The experimental section containing synthetic procedures and characterization data for all compounds synthesized in this work, as well as the practical details of the oxidation potential determination experiment and the anti-mycobacterial assay is provided in Supporting Information.

Keywords: activation mechanism · diazene · isoniazid analogues · oxidation potential · thiohydrazides.

- [1] World Health Organization, Global Tuberculosis Report 2015 www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2015_executive_summary.pdf?ua=1 (consulted January 2016).
- [2] R. Mahajan, *Int. J. App. Basic Med. Res.* **2013**, *3*, 1.
- [3] V. Bernardes-Génisson, C. Deraeve, A. Chollet, J. Bernadou, G. Pratiel, *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 4370.
- [4] D. A. Rozwarski, G. A. Grant, D. H. R. Barton, W. R. Jacobs, J. C. Sacchettini, *Science* **1998**, *279*, 98.

- [5] a) R. S. Magliozzo, J. A. Marcinkeviciene, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11303; b) J. Bodiguel, J. M. Nagy, K. A. Brown, B. Jamart-Grégoire, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3832.
- [6] a) G. S. Timmins, S. Master, F. Rusnak, V. Deretic, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5427; b) G. S. Timmins, V. Deretic, *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 1220; c) P. R. Gangadharam, F. M. Harold, W. B. Schaefer, *Nature* **1963**, *198*, 712.
- [7] R. Rawat, A. Whitty, P. J. Tonge, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13881.
- [8] a) T. Scior, I. Meneses Morales, S. J. Garcés Eisele, D. Domeyer, S. Laufer, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, *335*, 511; b) W. H. Haas, K. Schilke, J. Brand, B. Amthor, K. Weyer, P. B. Fourie, G. Bretzel, V. StichtGroh, H. J. Bremer, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1601.
- [9] N. L. Wengenack, H. Lopes, M. J. Kennedy, P. Tavares, A. S. Pereira, I. Moura, J. J. G. Moura, F. Rusnak, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11508.
- [10] a) F. G. Winder, J. M. Denny, *Biochem. J.* **1959**, *73*, 500; b) S. D. Kulkarni, S. T. Nandibewoor, *Transition Metal Chemistry* **2006**, *31*, 1034.
- [11] K. A. Rickman, K. L. Swancutt, S. P. Mezyk, J. J. Kiddle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3096.
- [12] G. S. Timmins, S. Master, F. Rusnak, V. Deretic, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3006.
- [13] K. A. Jensen, H. R. Baccaro, O. Buchard, G. E. Olsen, C. Pedersen, J. Toft, *Acta Chem. Scand.* **1961**, *15*, 1109.
- [14] J. M. R. Mellado, M. Angulo, R. M. Galvin, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, *352*, 253.
- [15] G. Perdigo, C. Deraeve, G. Mori, M. R. Pasca, G. Pratviel, V. Bernardes-Génisson, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1555.
- [16] a) J. Tong, X.-J. Dang, H.-L. Li, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 165; b) E. B. Hansen Jr, K. L. Dooley, H. C. Thompson Jr, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1995**, *670*, 259; c) E.-K. Wang, W.-H. Zhou, *Chin. J. Chem.* **1996**, *14*, 131; d) N. F. Atta, A. Galal, F. M. Abu-Attia, S. M. Azab, *Electrochimica Acta* **2011**, *56*, 2510; e) E. Hammam, A. M. Beltagi, M. M. Ghoneim, *Microchemical Journal* **2004**, *77*, 53.
- [17] J. NBO 6.0. E. D. Glendening, K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, C. R. Landis, and F. Weinhold, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison **2013**.
- [18] R. B. Silverman, M. W. Holladaw, in *The organic chemistry of drug design and drug action*, 3rd ed., Academic Press, **2014**, p. 224.
- [19] S. Ghanbari Pakdehi, M. Salimi, M. Rasoolzadeh, *Res. Applic. Mech. Engineering* **2014**, *3*, 21.
- [20] F. Wang, R. Langley, G. Gulsten, L. G. Dover, G. S. Besra, W. R. Jacobs, J. C. Sacchettini, *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 73.

Submitted: January 19, 2016

Accepted: January 26, 2016

II.1.3. Supporting information

1. General

All solvents and commercially available reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification, including isonicotinoic acid hydrazide (INH, 1), benzohydrazide (2) and pyridine-3-carbohydrazide (3). Anhydrous solvents were obtained from commercial suppliers (dimethylformamide, methanol) or dried on a MBraun MB-SPS-800 solvent purification system (tetrahydrofuran, toluene, dichloromethane). Acetonitrile was freshly distilled before use. Microwave reactions were performed on a CEM Discover device, using a dynamic mode allowing maximum power to be reached during the reaction. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel-coated aluminium plates with fluorescent indicator 254 nm (Merck or Fluka). Preparative chromatography was performed on silica gel column (Merck 63–200 μm) or using a CombiFlash Companion (Teledyne Isco) with RediSep prepacked cartridges (SiO_2 35–70 μm). The purity of compounds was assessed by microanalysis and/or by thin layer chromatography coupled to ^{13}C NMR.

2. General instrumentation and analysis conditions

The melting points were determined on an Electrothermal 9300 capillary melting point apparatus and are not corrected. Infra-red spectra were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer with ATR functionality. ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 300, 400 and 500 MHz using CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ or $\text{MeOD-}d_4$ as solvent. The residual proton signal of the deuterated solvent was used as an internal reference: CDCl_3 $\delta = 7.29$ ppm, DMSO $\delta = 2.50$ ppm and MeOD $\delta = 3.31$ ppm. ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 75, 100 and 125 MHz. Electrospray mass spectra (ESI) were obtained on a Perkin-Elmer SCIEX API 365 instrument and desorption chemical ionization (DCI) mass spectra were acquired on a Finnigan TQS 7000 spectrometer.

3. Synthesis

3.1. General procedure for the preparation of hydrazides from arylcarboxylic acid (Procedure A):

A solution of respective aromatic acid (2.5 mmol) and a catalytic amount of conc. sulfuric acid in ethanol (2 mL) was heated at 100 °C under microwave irradiation (170 W). After completion of the reaction (typically in 1-2 h, monitored by TLC), ethanol was removed under reduced pressure and the product was extracted with dichloromethane, washed with

diluted NaHCO₃ water and dried over magnesium sulfate. When necessary, the crude was purified by flash chromatography. The resulting arylcarboxylic ethyl ester (2.5 mmol) was then dissolved in ethanol (4 mL) and hydrazine monohydrate (0.13 mL, 2.75 mmol, 1.1 eq) was added. The mixture was heated at 100 °C under microwave irradiation (170 W) until completion of the reaction (30 min to 4 h, monitored by TLC). The reacting mixture was concentrated under vacuum and the crude product was subsequently purified by recrystallization or by flash chromatography, yielding pure hydrazides.

Pyridine-2-carbohydrazide (4): From procedure A with picolinic acid (2.5 mmol). Pure pyridine-2-carbohydrazide was obtained after precipitation in diethylether. Yield 55% for two steps (190 mg). Beige solid, mp 94 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 9.86 (s, 1H), 8.61 (dt, *J* = 8.0 Hz and 1.2 Hz, 1H); 7.98 (m, 2H); 7.57 (m, 1H); 4.57 (br s, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 163.1 (Cq); 150.3 (Cq); 148.9 (CH); 138.1 (CH); 126.7 (CH); 122.2 (CH). HRMS (DCI-CH₄): for C₆H₈N₃O ([M+H]⁺): calcd: 138.0667; found: 138.0668. Anal. calcd. for C₆H₇N₃O•0.05 CH₃CH₂OH: C, 52.54; H, 5.28; N, 30.13. Found: C, 52.40; H, 5.18; N, 29.96. IR √ (cm⁻¹): 3288, 3212, 1670, 1647, 1593, 1568, 1518, 1473, 1434, 1303, 1124, 999, 973.

4-Nitrobenzohydrazide (5 or I-17): From procedure A with 4-nitrobenzoic acid (14 mmol). Pure compound was obtained by flash chromatography (eluent: dichloromethane/methanol: 100/0 to 90/10). Yield 45% for two steps (1.15 g). Yellow solid, mp 210 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 10.12 (br s, 1H); 8.30 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H); 8.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H); 4.63 (br s, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 164.3 (Cq); 149.4 (Cq); 139.5 (Cq); 128.9 (CH); 124.0 (CH). HRMS (ESI): for C₇H₈N₃O₃ ([M+H]⁺): calcd: 182.0566; found: 182.0567. Anal. calcd. for C₇H₇N₃O₃: C, 46.41; H, 3.89; N, 23.20. Found: C, 46.35; H, 3.63; N, 22.91. IR √ (cm⁻¹): 3331, 3258, 3071, 1643, 1593, 1507, 940, 863, 849.

4-Methoxybenzohydrazide (6 or I-18): From procedure A with 4-methoxybenzoic acid (6.4 mmol). Pure compound was obtained by flash chromatography (eluent: dichloromethane/methanol: 100/0 to 95/5). Yield 60% for two steps (640 mg). Yellow solid, mp 136 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 9.60 (br s, 1H); 7.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); 4.41 (br s, 2H); 3.80 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 166.0 (Cq); 161.9 (Cq); 129.2 (CH); 126.0 (Cq); 114.0 (CH); 55.8 (CH₃). HRMS

(ESI): for $C_8H_{11}N_2O_2$ ($[M+H]^+$): calcd: 167.0821; found: 167.0822. Anal. calcd. for $C_8H_{10}N_2O_2$: C, 57.82; H, 6.07; N, 16.86. Found: C, 57.79; H, 6.34; N, 16.67. IR $\sqrt{}$ (cm^{-1}): 3733, 3187, 1648, 1618, 1562, 1500, 1251, 1030, 835.

Thiophen-2-carbohydrazide (7): From procedure A with 2-thiophenecarboxylic acid (1.9 mmol). Yield 79% for two steps (210 mg). Yellow solid, mp 139 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 9.75 (br s, 1H); 7.70-7.75 (m, 2H); 7.12 (dd, $J = 5.0$ and 3.5 Hz, 1H); 4.47 (br s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 161.6 (Cq); 138.8 (Cq); 130.7 (CH); 128.3 (CH); 127.9 (CH). HRMS (ESI): for $C_5H_7N_2OS$ ($[M+H]^+$): calcd: 143.0279; found: 143.0282. Anal. calcd. for $C_5H_6N_2OS$: C, 42.24; H, 4.25; N, 19.70. Found: C, 41.96; H, 3.69; N, 19.49. IR $\sqrt{}$ (cm^{-1}): 3310, 3194, 3111, 1617, 1536, 1328, 1245, 1051, 939, 836, 685.

Pyrazine-2-carbohydrazide (8): From procedure A with 2-pyrazinoic acid (3.81 mmol). Pure compound was obtained by collecting the precipitate formed during the reaction. Yield 38% for two steps (200 mg). Beige solid, mp 166 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 10.12 (br s, 1H); 9.13 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H); 8.84 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H); 8.70 (dd, $J = 2.5$ Hz and 1.5 Hz, 1H); 4.64 (br s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 161.9 (Cq); 147.7 (CH); 145.4 (Cq); 143.9 (CH); 143.7 (CH). HRMS (ESI): for $C_5H_7N_4O$ ($[M+H]^+$): calcd: 139.0620; found: 139.0617. Anal. calcd. for $C_5H_6N_4O \cdot 0.1H_2O$: C, 42.92; H, 4.47; N, 40.04. Found: C, 43.31; H, 4.55; N, 39.89. IR $\sqrt{}$ (cm^{-1}): 3210, 1639, 1513, 1459, 1306, 1019, 960, 859.

N'-Methylpyridine-4-carbohydrazide (9): From procedure A with isonicotinoic acid (485 mg, 3.95 mmol), yielding 500 mg (3.31 mmol) of the corresponding ethyl ester, then methylhydrazine (0.26 mL, 5.0 mmol, 1.5 eq) instead of hydrazine monohydrate. Pure compound was obtained by flash chromatography (eluent: dichloromethane/methanol: 100/0 to 95/5). Yield 53% for two steps (315 mg). Beige solid, mp 80 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 10.34 (br s, 1H); 8.72 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H); 7.73 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H); 5.25 (br s, 1H); 2.55 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 163.7 (Cq); 150.7 (CH); 140.7 (Cq); 121.5 (CH); 38.8 (CH₃). HRMS (ESI): for $C_7H_{10}N_3O$ ($[M+H]^+$): calcd: 152.0824; found: 152.0821. Anal. calcd. for $C_7H_9N_3O \cdot 0.15H_2O$: C, 54.64; H, 6.09; N, 27.31. Found: C, 54.83; H, 5.95; N, 27.08. IR $\sqrt{}$ (cm^{-1}): 3279, 3052, 1633, 1599, 1531, 1318, 892, 851, 810, 619.

***N*-Methylpyridine-4-carbohydrazide (10):** A solution of isonicotinoyl chloride (0.57 g, 4 mmol) in anhydrous DCM (10 mL) was added dropwise, at 0 °C, to a solution of methylhydrazine (0.63 mL, 12 mmol) in anhydrous DCM (10 mL). The solution was then stirred at room temperature during 18 h, before to be evaporated under reduced pressure. The crude was then purified by flash chromatography over silica-gel (eluent: dichloromethane / methanol: 100/0 to 90/10). Yield 65% (390 mg). Yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, DMSO *d*₆) Mixture of two rotamers in a 80 : 20 ratio, δ (ppm): Major: 8.58 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.83 (br s, 2H), 3.18 (s, 3H); Minor: 8.67 (br s, 2H), 7.42 (br s, 2H), 5.20 (br s, 2H), 3.02 (s, 3H). ¹³C NMR (105 MHz, DMSO *d*₆) Mixture of two rotamers, δ (ppm): Major: 169.2 (Cq); 149.4 (CH); 145.2 (Cq); 122.9 (CH); 38.5 (CH₃); Minor: 165.3 (Cq); 150.5 (CH); 143.8 (Cq); 121.9 (CH); 39.8 (CH₃). HRMS (ESI): for C₇H₁₀N₃O ([M+H]⁺): calcd: 152.0824; found: 152.0818. IR √ (cm⁻¹): 3313, 3210, 1625, 1596, 1405, 1262, 991, 832, 640.

***N'*-*N'*-Dimethylpyridine-4-carbohydrazide (11):** A solution of isonicotinoyl chloride (0.57 g, 4 mmol) in anhydrous DCM (10 mL) was added dropwise, at 0 °C, to a solution of *N,N*-dimethylhydrazine (0.91 mL, 12 mmol) in anhydrous DCM (10 mL). The solution was then stirred at room temperature during 18 h, before to be evaporated under reduced pressure. The crude was then purified by flash chromatography over silica-gel (eluent: dichloromethane / methanol: 100/0 to 90/10). Yield 83% (550 mg). Beige solid, mp 121 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.67 (br s, 1H); 8.70 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H); 7.68 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H); 2.60 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163.1 (Cq); 150.6 (CH); 141.6 (Cq); 121.8 (CH); 46.6 (CH₃). HRMS (ESI): for C₈H₁₂N₃O ([M+H]⁺): calcd: 166.0980; found: 166.0977. Anal. calcd. for C₈H₁₁N₃O•0.05H₂O: C, 57.85; H, 6.74; N, 25.30. Found: C, 57.57; H, 6.38; N, 25.65. IR √ (cm⁻¹): 3268, 3191, 3046, 2859, 1648, 1542, 1317, 1302, 914, 851, 670.

***N'*-*tert*-butylbenzohydrazide (12 or I-19):** *Tert*-butyl hydrazine hydrochloride (0.89 g, 7.14 mmol) was added at 0 °C to a solution of triethylamine (3.26 mL, 24 mmol) in dichloromethane (36 mL), followed by the dropwise addition of benzoylchloride (1g, 7.14 mmol). The solution was then stirred at room temperature during 18 h, before to be washed with water (3 x 30 mL). The crude was then purified by flash chromatography over silica-gel (eluent: cyclohexane / ethyl acetate: 100/0 to 50/50). Yield 40% (550 mg). White solid, mp 93 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO *d*₆) δ (ppm): 9.81 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.83-7.85 (m,

2H), 7.45-7.53 (m, 3H), 4.92 (br d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 1.07 (s, 9H). ^{13}C NMR (105 MHz, DMSO d_6) δ (ppm): 166.3 (Cq); 133.6 (Cq); 131.6 (CH); 128.7 (CH); 127.7 (CH); 55.1 (Cq); 27.8 (CH₃). HRMS (ESI): for C₁₁H₁₇N₂O ([M+H]⁺): calcd: 193.1341; found: 193.1345. Anal. calcd. for C₁₁H₁₆N₂O: C, 68.72; H, 8.39; N, 14.57. Found: C, 68.90; H, 8.96; N, 14.16. IR \sqrt (cm⁻¹): 3220, 2971, 1616, 1571, 1437, 1364, 1022, 827, 687.

***N'*-(Propan-2-ylidene)benzohydrazide (13)** Benzohydrazide (250 mg, 1.84 mmol) was stirred at room temperature for 30 min in a mixture of acetone (2 mL) and one drop of acetic acid. Dichloromethane (5 mL) was then added to the suspension and the resulting solution was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The compound was then used directly without purification. Yield 92% (300 mg). White solid, mp 138 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.72 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 7.51 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.97 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.7 (Cq), 155.8 (Cq), 133.8 (Cq), 131.8 (CH), 128.7 (CH), 127.2 (CH), 25.6 (CH₃), 16.6 (CH₃). HRMS (ESI): for C₁₀H₁₃N₂O ([M+H]⁺): calcd: 177.1028; found: 177.1031. Anal. calcd. for C₁₀H₁₂N₂O: C, 68.16; H, 6.86; N, 15.90. Found: C, 68.31; H, 6.81; N, 15.99. IR \sqrt (cm⁻¹): 3214, 1649, 1634, 1528, 1291, 1141, 905, 696.

***N'*-(Propan-2-yl)benzohydrazide (14)** Acetic acid (0.47 mL, 8 mmol) and sodium cyanoborohydride (496 mg, 8 mmol) were successively added to a mixture of *N'*-(propan-2-ylidene)benzohydrazide **13** (470 mg, 2.66 mmol) in methanol (20 mL) at 0 °C. After stirring at 0°C for 1h30, a saturated solution of Na₂CO₃ was added and the mixture was slowly warmed to room temperature. The crude was extracted with dichloromethane (3 x 15 mL), and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (eluent: ethyl acetate) provided compound **14**. Yield 83% (395 mg). White solid, mp 154 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.17 (bs, 1H), 7.78 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.52 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.43 (m, 2H), 4.51 (bs, 1H), 3.24 (sept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 1.11 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167.5 (Cq), 132.9 (Cq), 131.8 (CH), 128.6 (CH), 126.9 (CH), 51.3 (CH), 20.8 (CH₃). HRMS (ESI): for C₁₀H₁₅N₂O ([M+H]⁺): calcd: 179.1184; found: 179.1187. Anal. calcd. for C₁₀H₁₄N₂O: C, 67.39; H, 7.92; N, 15.72. Found: C, 67.36; H, 8.17; N, 15.36. IR \sqrt (cm⁻¹): 3292, 2968, 1638, 1480, 1317, 1132, 880, 690, 652.

***N'*-(Propan-2-yl)pyridine-4-carbohydrazide (15)** A solution of isoniazid **1** (0.82 g, 6.0 mmol) in acetone (2 mL) was heated at 60 °C under microwave irradiation (170 W) for 5 minutes. After evaporation of acetone, methanol (50 mL) was added to the crude and the solution was cooled to 0 °C. Acetic acid (1.0 mL, 18 mmol) and sodium cyanoborohydride (1.13 g, 18 mmol) were then successively added to the mixture, which was stirred at room temperature for 3 hours. After the addition of a saturated solution of Na₂CO₃ (20 mL), the product was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum, to give **15** as a pure product. Yield 64% (0.69 g). White solid, mp 113 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10.25 (bs, 1H), 8.71 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 5.02 (bs, 1H), 3.09 (sept, *J* = 6.3 Hz, 1H), 1.02 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 164.3 (Cq), 150.7 (CH), 140.7 (Cq), 121.6 (CH), 50.8 (CH), 21.4 (CH₃). HRMS (ESI): for C₉H₁₄N₃O ([M+H]⁺): calcd: 180.1137; found: 180.1133. Anal. calcd. for C₉H₁₃N₃O: C, 60.32; H, 7.31; N, 23.45. Found: C, 60.16; H, 7.38; N, 23.13. IR √ (cm⁻¹): 3297, 2976, 1643, 1544, 1484, 1385, 1317, 1135, 885, 843, 687, 644.

3.2 General procedure for the preparation of benzenecarbothiohydrazides and *N'*-(aroyl)benzenecarbothiohydrazides from *S*-(thiobenzoyl)thioglycolic acid (Procedure B):

S-(thiobenzoyl)thioglycolic acid (0.2 g, 0.94 mmol) was dissolved in an aqueous 1M sodium hydroxide solution (1.03 mL, 1.03 mmol) at 0 °C (ice bath). The corresponding hydrazine or hydrazide (0.94 mmol) dissolved in an aqueous 1M sodium hydroxide solution (1.03 mL, 1.03 mmol) was then slowly added. The mixture was stirred at room temperature until completion of the reaction (typically in 1-2 h, monitored by TLC). Dilute acetic acid (20%) was added to neutralize the solution to pH 6-7. The formed precipitate was then collected by filtration, washed with water and dried under vacuum. When necessary, the filtrate was also extracted with dichloromethane (3 x 10 mL) and the combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The resulting product was subsequently purified by recrystallization or by flash chromatography, yielding pure benzenecarbothiohydrazides and *N'*-(aroyl)benzenecarbothiohydrazides.

Benzenecarbothiohydrazide (16 or I-12): From procedure B with hydrazine monohydrate. Pure product is obtained after dissolution of the crude (precipitate and the solid from the extraction of the filtrate) in dichloromethane and precipitation with *n*-hexane. Yield 67% (96 mg). Beige solid, mp 69 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.20 (br s,

1H); 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 7.38-7.47 (m, 3H); 6.55 (br s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 183.0 (Cq); 139.5 (Cq); 130.5 (CH); 128.5 (CH); 127.6 (CH). HRMS (DCI- CH_4): for $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) calcd: 153.0486; found: 153.0483. Anal. calcd. for $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{S}\cdot 0.05\text{H}_2\text{O}$: C, 54.91; H, 5.33; N, 18.30. Found: C, 54.72; H, 5.06; N, 18.04. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3263, 3136, 3081, 3059, 1590, 1561, 1492, 1448, 1386, 1215, 1116, 956, 896, 760, 684.

***N*-(Methyl)benzenecarbothiohydrazide (17 or I-28)**: From procedure B with *S*-(thiobenzoyl)thioglycolic acid (910 mg, 4.35 mmol) and *N*-methylhydrazine (200 mg, 4.35 mmol). Pure product is obtained as the collected precipitate washed with water. Yield 55% (395 mg). Beige solid, mp 90 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.34-7.41 (m, 5H), 5.97 (bs, 2H); 3.38 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 190.7 (Cq), 141.3 (Cq), 129.0 (CH), 128.5 (CH), 126.2 (CH), 42.9 (CH_3). HRMS (ESI): for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): calcd: 167.0643; found: 167.0639. Anal. calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}$: C, 57.80; H, 6.06; N, 16.85. Found: C, 57.65; H, 6.21; N, 16.82. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 2987, 1560, 1404, 1236, 1073, 978, 876, 696.

***N'*-(Propan-2-yl)benzenecarbothiohydrazide (18 or I-29)**: From procedure B with 1-isopropylhydrazine hydrochloride. Pure product is obtained by flash chromatography of the precipitate over silica-gel (eluent: dichloromethane/methanol: 100/0 to 90/10). Yield 48% (85 mg). Yellow solid, mp 109 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 7.48-7.54 (m, 1H); 7.41-7.46 (m, 2H); 3.40 (sept, $J = 6.3$ Hz, 1H); 1.23 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.98 (br s, 1H); 7.74 (br s, 2H); 7.40-7.46 (m, 3H); 6.46 (br s, 1H), 3.37 (sept, $J = 6.3$ Hz, 1H); 1.15 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 186.3 (Cq); 139.5 (Cq); 130.7 (CH); 128.4 (CH); 127.9 (CH); 50.9 (CH); 21.4 (CH_3). HRMS (DCI- CH_4): for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) calcd: 195.0956; found: 195.0948. Anal. calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}$: C, 61.82; H, 7.26; N, 14.42; S, 16.50. Found: C, 62.14; H, 7.19; N, 13.98; S, 16.19. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3148, 3042, 2960, 1530, 1461, 1447, 1384, 1364, 1331, 1243, 1173, 1137, 1101, 1074, 961, 872, 807, 766, 689.

***N'*-(Tert-butyl)benzenecarbothiohydrazide (19 or I-30)**: From procedure B with *tert*-butylhydrazine hydrochloride. Pure product was obtained by collecting the precipitate of the reaction medium. Yield 84% (165 mg). Beige solid, mp 121 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 7.38-7.45 (m, 3H); 1.24 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 189.0 (Cq); 140.3 (Cq); 130.5 (CH); 128.3 (CH); 128.1 (CH); 57.0 (Cq);

27.2 (CH₃). HRMS (DCI-CH₄): for C₁₁H₁₇N₂S ([M+H]⁺) calcd: 209.1112; found: 209.1102. Anal. calcd. for C₁₁H₁₆N₂S•0.1H₂O: C, 62.88; H, 7.77; N, 13.33; S, 15.26. Found: C, 62.72; H, 7.73; N, 13.31; S, 15.41. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3263, 2966, 2750, 2613, 2477, 1578, 1482, 1459, 1449, 1412, 1371, 1227, 1036, 992, 765, 690.

N'-(Phenylcarbothioyl)pyridine-4-carbohydrazide (20 or I-31): From procedure B with pyridine-4-carbohydrazide (INH). Pure product was obtained as the formed precipitate collected, washed with water and dried under *vacuum*. Yield 84% (203 mg). Yellow solid, mp 130-131 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.23 (br s, 1H); 11.42 (s, 1H), 8.82 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.84-7.87 (m, 4H), 7.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 198.1 (Cq), 163.8 (Cq), 151.0 (CH), 139.9 (Cq), 139.3 (Cq), 131.8 (CH), 128.7 (CH), 128.1 (CH), 121.9 (CH). HRMS (DCI-CH₄): for C₁₃H₁₂N₃OS ([M+H]⁺): calcd: 258.0701; found: 258.0693. Anal. calcd. for C₁₃H₁₁N₃OS: C, 60.68; H, 4.31; N, 16.33. Found: C, 60.59; H, 3.87; N, 16.21. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3183, 2987, 1657, 1551, 1447, 1404, 1324, 1222, 1075, 770, 690.

N'-(Phenylcarbothioyl)pyridine-3-carbohydrazide (21 or I-32): From procedure B with pyridine-3-carbohydrazide. Pure product was obtained as the formed precipitate collected, washed with water and dried under *vacuum*. Yield 76% (185 mg). Yellow solid, mp 149 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.17 (br s, 1H); 11.32 (s, 1H); 9.11 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); 8.80 (dd, *J* = 2.0 and 5.2 Hz, 1H); 8.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H); 7.84 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H); 7.60 (dd, *J* = 5.2 and 8.4 Hz, 1H); 7.57 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H); 7.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 198.0 (Cq); 163.9 (Cq); 153.1 (CH); 149.0 (CH); 139.3 (Cq); 135.8 (CH); 131.7 (CH); 128.7 (Cq); 128.7 (CH); 128.1 (CH); 124.2 (CH). HRMS (DCI-CH₄): for C₁₃H₁₂N₃OS ([M+H]⁺): calcd: 258.0701; found: 258.0708. Anal. calcd. for C₁₃H₁₁N₃OS•0.05H₂O: C, 60.47; H, 4.33; N, 16.27; S, 12.42. Found: C, 60.07; H, 3.79; N, 16.27; S, 12.72. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3217, 2597, 1675, 1595, 1455, 1442, 1419, 1377, 1268, 1198, 1030, 818, 771, 726, 695.

N'-(Phenylcarbothioyl)pyridine-2-carbohydrazide (22 or I-33): From procedure B with pyridine-2-carbohydrazide **4**. Pure product is obtained after recrystallization of the crude (precipitate and the solid from the extraction of the filtrate) in hot chloroform / methanol 1:1 (v/v). Yield 61% (146 mg). Yellow needles, mp 171 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.80 (br s, 1H); 11.47 (br s, 1H); 8.74 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H); 8.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H);

8.05-8.10 (m, 1H); 7.84 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H); 7.68-7.72 (m, 1H); 7.50-7.54 (m, 1H); 7.46 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 193.1 (Cq); 161.3 (Cq); 149.4 (CH); 149.0 (Cq); 139.1 (Cq); 138.6 (CH); 131.5 (CH); 128.5 (CH); 128.3 (CH); 127.8 (CH); 122.8 (CH). HRMS (DCI- CH_4): for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): calcd: 258.0701; found: 258.0706. Anal. calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$: C, 60.68; H, 4.31; N, 16.33; S, 12.46. Found: C, 60.24; H, 3.75; N, 16.14; S, 12.58. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3146, 3055, 3001, 1668, 1472, 1456, 1446, 1427, 1340, 1261, 1075, 996, 961, 913, 744, 728, 696.

***N'*-(Phenylcarbothioid)pyrazine-2-carbohydrazide (23 or I-34)**: From procedure B with pyrazine-2-carbohydrazide **8** (0.35 mmol). Pure product is obtained after recrystallization of the precipitate in hot chloroform / methanol 1:1 (v/v). Yield 33% (30 mg). Yellow solid, mp 178 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 12.50 (br s, 1H), 11.50 (s, 1H); 9.26 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.97 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.84 (dd, $J = 2.5$ and 1.5 Hz, 1H), 7.81-7.85 (m, 2H), 7.45-7.60 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 195.4 (Cq); 160.9 (Cq); 148.8 (CH); 144.3 (CH); 144.2 (CH); 144.2 (Cq); 139.0 (Cq); 131.7 (CH); 128.6 (CH); 128.2 (CH). HRMS (ESI): for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): calcd: 259.0654; found: 259.0654. Anal. calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{OS}$: C, 55.80; H, 3.90; N, 21.69. Found: C, 55.37; H, 3.66; N, 21.29. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 2982, 1685, 1458, 1400, 1341, 1051, 1019, 913, 694.

***N'*-(Phenylcarbothioid)thiophene-2-carbohydrazide (24 or I-35)**: From procedure B with thiophen-2-carbohydrazide **7** (0.70 mmol). Pure product is obtained after recrystallization of the precipitate in hot chloroform / methanol 1:1 (v/v). Yield 48% (90 mg). Yellow solid, mp 151 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.07 (br s, 1H); 11.11 (s, 1H); 7.97 (dd, $J = 3.7$ and 1.1 Hz, 1H); 7.89 (dd, $J = 5.0$ and 1.1 Hz, 1H); 7.81-7.83 (m, 2H); 7.55-7.58 (m, 1H); 7.47-7.50 (m, 2H); 7.24 (dd, $J = 5.0$ and 3.7 Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 198.5 (Cq); 160.2 (Cq); 139.3 (Cq); 137.4 (Cq); 132.4 (CH); 131.7 (CH); 129.9 (CH); 128.7 (CH); 128.7 (CH); 128.0 (CH). HRMS (ESI): for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OS}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): calcd: 263.0313; found: 263.0302. Anal. calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}_2$: C, 54.94; H, 3.84; N, 10.68. Found: C, 54.50; H, 3.75; N, 10.42. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 2987, 1638, 1515, 1439, 1251, 1066, 775, 694.

4. Electrochemistry

Voltammetry measurements were carried out with a potentiostat Autolab PGSTATN302. Cyclic and square wave experiments were performed at room temperature in

a homemade airtight three-electrode cell connected to a vacuum/argon line. The reference electrode consisted of a saturated calomel electrode (SCE) separated from the solution by a bridge compartment. The counter electrode was a platinum wire of 1 cm² apparent surface. The working electrode was a glassy carbon microdisk (1 mm diameter) or a platinum microdisk (0.5 mm diameter). 1 to 3 mL of a 10 mM DMSO stock solution of each compound was added to 9 mL of a phosphate buffer solution (100 mM, pH 7.5). Before each measurement, the solutions were degassed by bubbling argon and the working electrode was polished with a polishing machine (Presi P230). Experimental peak potentials have been measured versus SCE and converted to NHE by adding 0.241 V.

5. Growth conditions and minimum inhibitory concentration (MIC) determination in *M. tuberculosis*

H37Rv was used as the reference strain. The strains were grown at 37 °C in Middlebrook 7H9 broth (Becton Dickinson), supplemented with 0.05% Tween 80, or on solid Middlebrook 7H11 medium (Becton Dickinson) supplemented with oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC). MICs for the new compounds were determined by means of the micro-broth dilution method. Dilutions of *M. tuberculosis* wild-type and clinical isolate cultures (about 10⁵–10⁶ cfu/ml) were streaked onto 7H11 solid medium containing a range of drug concentrations (0.25 µg/mL to 40 µg/mL). Plates were incubated at 37 °C for about 21 days and the growth was visually evaluated. The lowest drug dilution at which visible growth failed to occur was taken as the MIC value. Results were expressed as the average of at least three independent determinations.

6. Computational studies

All the calculations were carried out with the GAUSSIAN 09 suite [276]. Geometry optimizations were performed with the B3LYP [277–279] functional and the 6-311+G(d,p) basis set. The standard variation of the Gibb's free energies in aqueous solution was calculated using the thermodynamic cycle shown here. The effect of solvation was described with the self-consistent reaction field (SCRF) method using the integral equation formalism polarizable continuum Model (IEFPCM).[280] The N–H bond strengths were obtained by calculating the bond dissociation energy at 298.15 K, defined as the enthalpy change of the homolytic bond dissociation reaction: RN-H → RN· + H·. Vibrational frequency calculation was used to confirm the convergence to local minima and to calculate the unscaled zero-

point-energy (ZPE) and the entropy corrections at 298 K. The Wiberg bond indices [281] have been computed using the natural bond orbital (NBO) method [282,283].

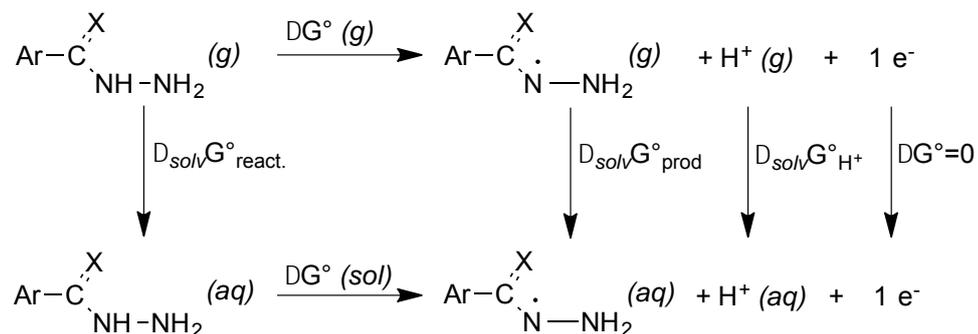


Illustration of a thermodynamic cycle used to determine the Gibb's free energies in aqueous solution, where $\Delta_{\text{solv}}\text{G}^\circ_{\text{react}}$ and $\Delta_{\text{solv}}\text{G}^\circ_{\text{prod}}$ are the solvation free energy changes of the protonated reactant and deprotonated product respectively; $\Delta_{\text{solv}}\text{G}^\circ_{\text{H}^+}$ is the solvation free energy change of the proton (-264.0 kcal/mol in the standard state) [284].

II.1.4. Résultats non publiés associés à l'article

Ce travail a permis, pour la première fois, de déterminer et comparer, dans des conditions identiques, des potentiels d'oxydation et des activités antimycobactériennes d'une série d'hydrazides, analogues de l'INH. Ceci a été réalisé dans le but de mener une étude des relations structure-potentiel d'oxydation-activité antimycobactérienne avec le moins de variations expérimentales possibles.

Concernant l'étude électrochimique, pour un système irréversible tel que l'INH, le potentiel d'oxydation décrit dans la littérature varie entre 0,47 et 1,17 V/ENH [237,272,274,275]. Cette différence s'explique par les différentes méthodes électrochimiques employées (voltammétrie cyclique ou à vague carrée) où les potentiels de pics obtenus renvoient parfois maladroitement au terme de potentiel d'oxydation.

De plus, le potentiel d'oxydo-réduction mesuré dépend de nombreux paramètres expérimentaux: des électrodes (de travail, de référence et contre-électrode), du solvant, du pH, de la température... C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier cette famille d'hydrazide dans les mêmes conditions même si certaines données étaient déjà disponibles dans la littérature. Pour notre système, les voltammogrammes cycliques ont montré un ou deux pics anodiques résultant d'une oxydation non réversible. Nous nous sommes intéressés uniquement à l'oxydation de ces produits et le potentiel de pic d'oxydation E_a de la première vague d'oxydation a été utilisé pour comparer les molécules entre elles. Une augmentation de la vitesse de balayage ne modifie pas la réversibilité du signal. Ce signal est caractéristique d'un système électrochimique irréversible où le (ou les) transfert(s) d'électron(s) est suivi par une transformation chimique rapide, une interaction avec le solvant ou une diffusion du produit à la surface de l'électrode [285].

Pour l'activité biologique, les tests sur MTB ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Maria Rosalia Pasca du Laboratoire de Biologie et Biotechnologie de l'Université de Pavia en Italie. Cette collaboration nous a permis de tester nos molécules sur la souche sensible H37Rv et sur deux souches résistantes IC1 et IC2. IC1 est résistante à la streptomycine, l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et IC2 est résistante à la streptomycine, l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol, le pyrazinamide, l'éthionamide et la capréomycine. Le détail des résistances pour ces deux souches MDR n'est pas connu, cependant nous pouvons supposer que la souche IC1 présente une résistance à l'INH suite à une mutation sur KatG, puisque celle-ci est la cause la plus fréquente de résistance. Par

ailleurs, la souche IC2 pourrait présenter une mutation sur la cible InhA puisqu'elle est résistante à l'INH et à l'ETH mais une mutation sur KatG n'est pas exclue.

En rapport avec cet article, deux autres composés ont été évalués vis-à-vis de leur potentiel d'oxydation et de leur activité antimycobactérienne.

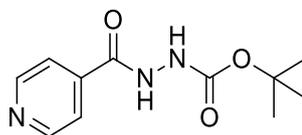


Figure 30: Structure du composé I-5

Le premier composé est un intermédiaire de la synthèse des thiohydrazides (Partie 1. I.), le *N*-((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)isonicotinohydrazide (**I-5**). Ce composé **I-5** présente un potentiel d'oxydation très différent des analogues hydrazides mentionnés dans l'article ci-dessus. Son potentiel d'oxydation étant très élevé, il a été impossible de le déterminer dans le tampon phosphate (100 mM, pH 7,5) car il est au-delà du mur d'oxydation du solvant et il a fallu réaliser l'étude dans l'acétonitrile (ACN) (Tableau 6). Par comparaison, l'INH a un potentiel d'oxydation E_a différent dans le tampon phosphate ($1,01 \pm 0,04$ V/ENH) et dans l'acétonitrile ($1,26 \pm 0,07$ V/ENH). Le composé **I-5** quant à lui un potentiel d'oxydation E_a bien plus élevé, de $2,32 \pm 0,07$ V/ENH, dans l'acétonitrile. Malgré cette différence de potentiel d'oxydation entre l'INH et **I-5**, l'activité biologique est similaire pour les deux composés sur la souche sensible H37Rv (Tableau 6). Ce résultat est en accord avec la conclusion de l'article montrant que la modification du potentiel d'oxydation n'a pas d'influence directe sur l'activité biologique.

Tableau 6 : Potentiel d'oxydation et CMI pour l'INH et I-5

Composé	E_a (V/ENH) ACN	CMI sur <i>M. tuberculosis</i>						Cytotoxicité HepG2 ^c
		H37Rv		IC1 ^a		IC2 ^b		CC ₅₀
		µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µM
I-5	$2,32 \pm 0,07$	0,06	0,25	> 5	> 21	5	21	> 100
INH	$1,26 \pm 0,07$	0,025	0,18	> 5	> 36	> 5	> 36	> 100

a : IC1 : profil de résistance aux médicaments : résistant à streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol [63]. b : IC2 : profil de résistance aux médicaments : résistant à streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide, éthionamide, capréomycine [63]. c : Cytotoxicité sur HepG2 (lignée cellulaire d'hépatocarcinome), test de viabilité cellulaire au MTT selon le protocole [286].

L'activité intéressante du composé **I-5** sur souche H37Rv nous a amené à l'étudier sur les souches résistantes IC1 et IC2. Le composé **I-5** est non actif sur IC1 (CMI supérieure à 21 µM) et présente une CMI de 21 µM sur la souche résistante IC2, soit un écart d'un facteur 83

entre l'activité sur la souche sensible H37Rv et sur la souche résistante IC2. Cet écart est toutefois trop important pour prétendre que le composé **I-5** est actif sur la souche mutée IC2. Pour compléter cette étude d'activité antimycobactérienne, la cytotoxicité de composé **I-5** a été mesurée sur une lignée cellulaire HepG2, montrant que le composé **I-5** est non-cytotoxique ($CC_{50} > 100 \mu\text{M}$) sur cette lignée. D'autre part, l'activité du composé **I-5** pouvant provenir d'une hydrolyse dans MTB de la fonction carbamate qui libèrerait l'INH, nous avons étudié la stabilité de ce composé en fonction du pH par un suivi en RMN ^1H dans D_2O acidifiée au HCl. A pH très acide (pH = 1), nous avons observé une hydrolyse du composé **I-5** libérant l'INH et le 2-méthylpropan-2-ol de l'ordre de 20% en 2 heures et atteignant 80% en 9 heures à température ambiante. A pH 5,5 (pH macrophage), en revanche, l'étude RMN sur 30 heures n'a montré aucune hydrolyse. Le pH du milieu de culture utilisé pour les tests biologiques étant décrit pour être autour de 6,6 et le pH intracellulaire de MTB étant au alentour de 7, l'activité antimycobactérienne mesurée ne semble pas provenir d'une hydrolyse du composé.

Le deuxième composé étudié, pour compléter l'étude d'un lien entre le potentiel d'oxydation et l'activité antimycobactérienne sur souche résistante, est un analogue de l'INH décrit dans la littérature comme actif sur souches résistantes à l'INH [287]. Le composé *N'*-décanylisonicotinohydrazide (**II-25**) (Figure 31), décrit par l'équipe du Dr. Martins, a ainsi été synthétisé et étudié en électrochimie [287].

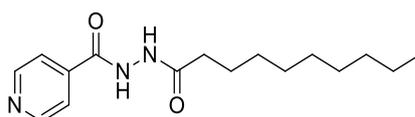


Figure 31 : Structure du *N'*-décanylisonicotinohydrazide **II-25**

Le composé **II-25** est décrit comme actif sur la souche sauvage H37Rv avec une CMI à $0,38 \mu\text{M}$ et sur souche mutée KatG (S315T) avec une CMI à $6,9 \mu\text{M}$ [287]. Comparé à l'INH dans la même étude (CMI à $0,29 \mu\text{M}$ sur la souche sauvage H37Rv et $43,8 \mu\text{M}$ sur la souche KatG (S315T)), ce composé possède une très bonne activité sur souche mutée puisqu'il est six fois plus actif que l'INH. Dans nos conditions d'études électrochimiques citées précédemment, le composé **II-25** a un potentiel d'oxydation E_a de $0,86 \pm 0,05 \text{ V/ENH}$ tandis que l'INH a un potentiel d'oxydation E_a de $1,01 \pm 0,04 \text{ V/ENH}$. Ce composé a un potentiel d'oxydation proche de certains composés décrits dans la publication comme le benzohydrazide (**II-2**) ($0,84 \pm 0,03 \text{ V/ENH}$), le pyridine-3-carbohydrazide (**II-3**) ($0,84 \pm 0,07 \text{ V/ENH}$) ou le *N'*-méthylpyridine-4-carbohydrazide (**II-9**) ($0,84 \pm 0,04 \text{ V/ENH}$). Cependant

ces trois hydrazides ne présentent pas d'activité antimycobactérienne, ce qui confirme une fois encore qu'il n'existe pas de lien entre potentiel d'oxydation et activité biologique.

Ainsi, la comparaison de l'activité antimycobactérienne des composés INH, **I-5** et **II-25** sur souches résistantes à l'INH ($CMI_{IC2-INH} > 36 \mu M$; $CMI_{IC2-I-5} = 21 \mu M$ et $CMI_{KatG(S315T)-II-25} = 6,9 \mu M$) et du potentiel d'oxydation de ces molécules ($E_{a(INH-ACN)} = 1,26 \pm 0,07 V/ENH$; $E_{a(I-5-ACN)} = 2,32 \pm 0,07 V/ENH$; $E_{a(INH-Tp)} = 1,01 \pm 0,04 V/ENH$ et $E_{a(II-25-Tp)} = 0,86 \pm 0,05 V/ENH$) démontre bien qu'il n'y a pas de corrélation entre potentiel d'oxydation et activité antimycobactérienne.

II.1.5. Conclusion

Contrairement à l'hypothèse avancée dans la littérature et étudiée dans cette partie, il n'existe pas de corrélation entre le potentiel d'oxydation et l'activité antimycobactérienne sur des souches résistantes à l'INH. La modification du potentiel d'oxydation de l'hème de KatG mutée ne doit donc pas être la principale cause de résistance à l'INH.

Le composé **II-25**, hydrazide analogue de l'INH, présente une bonne activité contre les souches résistantes à l'INH. La recherche d'analogues de l'INH à longue chaîne reste donc un bon axe de recherche pour lutter contre les résistances. De plus, il serait intéressant d'étudier plus en détail les interactions du composé **II-25** avec l'enzyme KatG(S315T) mutée afin de mieux comprendre comment celle-ci, malgré la mutation, reste toujours capable d'activer la molécule **II-25**.

II.2. Hypothèse d'une modification structurale de l'enzyme KatG : stratégie des hydrazides à chaînes longues

La deuxième hypothèse concernant le manque d'activation de l'INH par KatG mutée est que la mutation induirait une modification du site de fixation de l'INH au sein de KatG mutée rendant ainsi difficile le transfert d'électron impliqué dans le processus d'activation de ce médicament [238].

II.2.1. Introduction

II.2.1.1. Site de fixation de l'INH dans KatG et son mutant KatG(S315T)

Aucune donnée cristallographique n'étant disponible pour le complexe MtKatG-INH puisqu'aucune tentative de cristallisation n'a pu aboutir, le site exact de fixation de l'INH dans l'enzyme KatG n'est à ce jour pas connu. Plusieurs hypothèses sont proposées dans la littérature, plaçant le site de fixation de l'INH dans la poche ou dans le canal d'accès de l'hème [91,99–104,115,238,288,289]. Ces études se basent sur des expériences d'activation de l'INH ou de formation de l'adduit INH-NADH par différentes enzymes KatG mutées ou par analogie à des structures cristallographiques de KatG provenant d'autres bactéries (*Burkholderia pseudomallei* (Bp) ou *Synechococcus elongatus* (Se)). La majorité des études compare les hypothèses avancées pour le site de fixation de l'INH à MtKatG(S315T), la mutation la plus fréquente où le résidu sérine en position 315 est remplacé par une thréonine et conduisant à une résistance à l'INH. Ainsi, il est difficile de discuter du site de fixation de l'INH sans décrire cette mutation.

À la fin des années 1990, Wengenack *et al.* et Todorovic *et al.* démontrent par RMN ¹H que le cycle pyridinique de l'INH se positionne en périphérie de l'hème à 12 Å du fer hémique et la partie hydrazine de l'INH à environ 4 Å du fer de l'hème dans MtKatG sauvage et mutée (S315T) [238,290].

En 2002 et 2003, l'équipe de P. Loewen présente la première structure cristallographique de BpKatG (résolution 1,7 Å), une enzyme KatG identique à 65% à celle de MTB [99,266]. Ils identifient ainsi le canal d'accès de l'hème, présentant une forme d'entonnoir dont la partie la plus étroite se situe au niveau des résidus Ser324 et Asp141 (Ser315 et Asp137 chez MTB) à 14 Å du fer de l'hème. Les études théoriques issues de cette structure cristallographique de BpKatG proposent que l'INH se fixe dans le canal d'accès de l'hème, à proximité du résidu Ser324 (Ser315 chez MTB). L'oxydation de l'INH met en jeu un transfert d'électron, aboutissant au composé I ou II de l'hème, relayé via la liaison hydrogène entre le résidu Ser324 et une chaîne propionate de l'hème. Les auteurs soutiennent leurs hypothèses en proposant que la mutation KatG(S315T) interfère directement dans la fixation de l'INH et dans son activation. En effet, le remplacement de la sérine par la thréonine résulte en des interactions défavorables avec le groupe propionate de l'hème. L'équipe de P. Loewen met également en avant la présence, dans la poche de l'hème, d'un adduit unique formé par liaisons covalentes entre les chaînes latérales de trois acides aminés

Met264, Tyr238 et Trp111 chez BpKatG (MYW) ou Met255, Tyr229 et Trp107 chez MtKatG [99,266]. Cet adduit MYW est également impliqué dans les transferts d'électron et le cycle catalytique de KatG, permettant la stabilisation des différents intermédiaires (composés I et II) de KatG.

Par la suite, en 2004, Bertrand *et al.* publient la première structure cristallographique de MtKatG (résolution de 2,4 Å) (Figure 32 A et B) et proposent alors que l'INH se fixe dans la poche de l'hème (du côté δ de l'hème, Figure 32.C) [91].

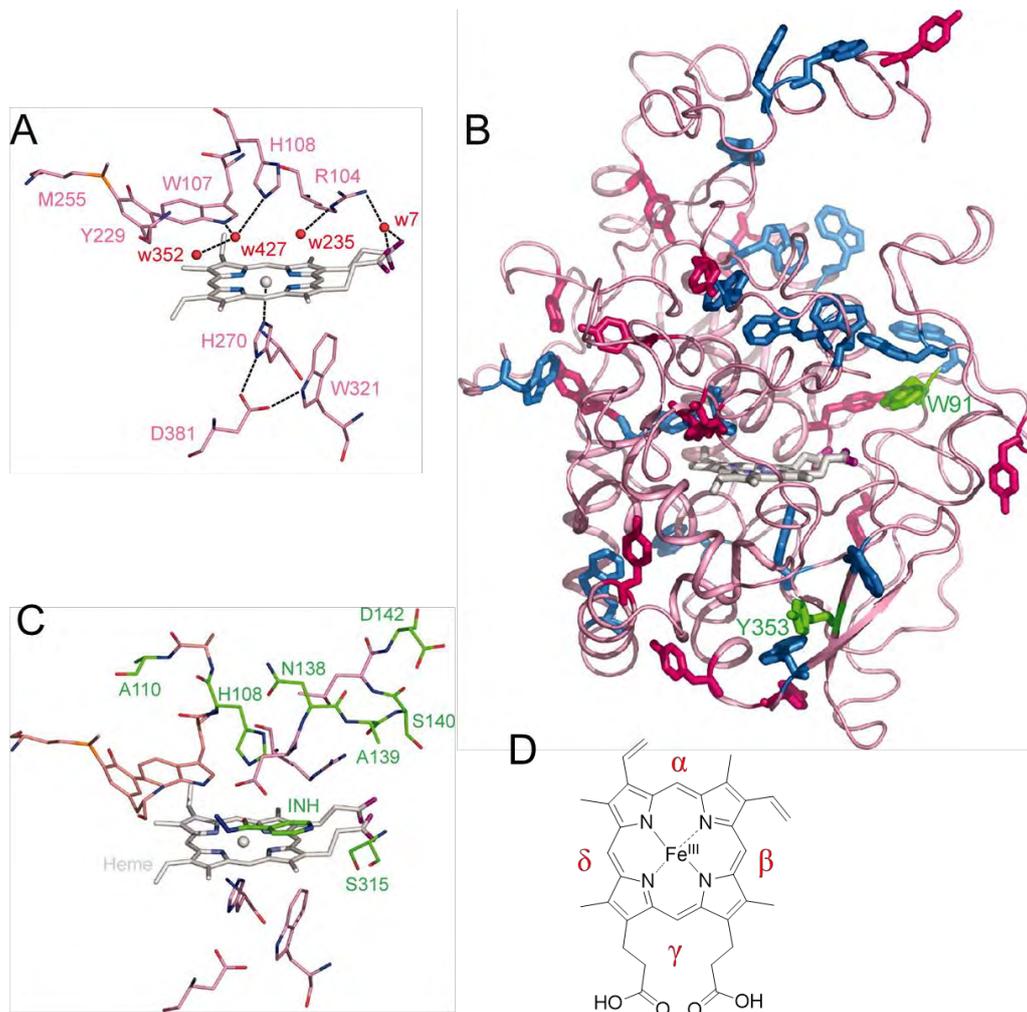


Figure 32 : MtKatG :

A. Environnement de l'hème. L'adduit MYW est représenté (M255-Y229-W107); B. Domaine N-terminal de MtKatG avec représentation des résidus tryptophanes (bleu) et tyrosines (rose) et C. Site de fixation de l'INH proposé et représentation en vert des résidus impliqués dans des mutations issues de souches cliniques d'après la structure cristallographique de MtKatG et les propositions de Bertand *et al.* [91]. D. Structure d'un hème b et nomenclature associée.

En 2006, l'équipe du Pr. Magliozzo étudie la structure cristallographique de l'enzyme MtKatG(S315T) (résolution de 2,1 Å) et observe que la présence du groupe méthyle, introduit par la thréonine, rétrécit cette partie du canal d'accès de l'hème de 6 Å dans l'enzyme sauvage à 4,7 Å dans l'enzyme mutée KatG(S315T) [98]. Les auteurs remarquent également, suite à

leur expérience d'activation de l'INH en présence de H_2O_2 , une différence de réactivité entre les différents intermédiaires (Composés I, II ou III) de KatG sauvage et KatG(S315T). De plus, le taux de formation de l'adduit INH-NADH par KatG sauvage est 20 fois supérieur à celui de KatG(S315T). Ils proposent donc que l'INH se fixe dans la poche de l'hème pour être activé et que le rétrécissement du canal d'accès, induit par la mutation S315T, défavorise son passage. En 2007, l'équipe du Pr. Magliozzo étudie, par titration calorimétrique isotherme, l'influence de mutations dans la poche de l'hème sur l'affinité de liaison de l'INH et notamment les mutations W107F (tryptophane remplacé par une phénylalanine) et Y229F (tyrosine remplacée par une phénylalanine) de l'adduit MYW [100]. Ces deux mutations réduisent l'affinité de fixation de l'INH dans KatG, perturbent la formation du tri-résidu MYW et présentent des taux de formation de l'adduit INH-NADH réduits de 40 à 60% par rapport à l'enzyme KatG sauvage. Ces études tendent donc à supposer que l'INH se fixe dans la poche de l'hème, près de l'adduit MYW.

Par ailleurs, en 2007 et 2009, l'équipe du Dr. Loewen en collaboration avec l'équipe du Dr. Ivancich proposent, suite à des études RPE, que l'INH se fixe loin de l'hème ou dans une cavité en surface de l'enzyme et que l'activation de l'INH se fasse par transfert d'électron, entre l'INH et l'hème, relayé via des tryptophanes ou des tyrosines de l'enzyme KatG ou via l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ produit par KatG [289,291]. Toutefois, en 2010, l'équipe du Dr. Loewen obtient, par co-cristallisation, des structures cristallographiques des complexes BpKatG-INH et BpKatG(S234T)-INH et observe que l'INH se fixe dans le canal d'accès à l'hème près du résidu Glu198 et dans la même position pour les deux enzymes [101]. L'étude du variant BpKatG(E198A) (acide glutamique remplacé par une alanine) montre seulement une faible diminution du taux de formation d'adduit INH-NADH et l'INH semble pouvoir se fixer à un autre endroit du canal d'accès de l'hème. Puisque différents sites de fixation sont possibles pour l'INH, l'hypothèse proposant que la mutation KatG(S315T) induirait une modification structurale du site de fixation de l'INH n'est pas valable. La résistance liée à la mutation KatG(S315T) proviendrait donc plutôt d'un défaut d'activation de l'INH.

En 2013, l'équipe du Pr. Magliozzo obtient une structure cristallographique du mutant MtKatG(D137S) (acide aspartique remplacé par une sérine) présentant donc une mutation sur le résidu Asp137 situé en face du résidu Ser315 au niveau du rétrécissement du canal d'accès de l'hème [102]. Cette mutation entraîne un agrandissement du « goulot » du canal d'accès, avec une valeur de 4,6 Å pour le mutant D137S comparée à 3,6 Å pour MtKatG sauvage et contrairement à 2,7 Å pour le mutant S315T. Cette mutation D137S favorise également la formation des adduits INH-NAD avec des constantes de Michaelis apparentes (K_M) mesurées,

par spectrophotométrie, à 192 μM pour MtKatG sauvage, 8400 μM pour MtKatG(S315T) et 17,5 μM pour MtKatG(D137S). Cette étude démontre donc que la mutation clinique S315T est défavorable pour la formation de l'adduit INH-NADH et qu'il existe un rétrécissement du canal d'accès. A l'opposé, la mutation D137S agrandit le canal d'accès de l'hème et favorise ainsi la formation de l'adduit INH-NADH. Les auteurs concluent donc que, dans MtKatG sauvage, l'INH doit se lier en périphérie de l'hème et ne peut pas rentrer dans la cavité de l'hème à cause du rétrécissement du canal d'accès.

Récemment, en 2014, l'équipe du Dr. Loewen a publié la structure cristallographique du complexe BpKatG(D141A)-INH où le mutant BpKatG(D141A) (acide aspartique remplacé par une alanine) est l'équivalent du mutant MtKatG(D137S) [103]. En combinant de la dynamique moléculaire, la cristallographie aux rayons X et la mutagenèse dirigée, les auteurs proposent différents sites de fixation pour l'INH : plusieurs sites de fixation possibles dans le canal d'accès de l'hème et un site de fixation proche de l'hème (du côté δ de l'hème, peu profond dans la cavité) pour le mutant BpKatG(D141A). Cependant, la superposition de ce site de fixation et de l'enzyme sauvage BpKatG montre des gênes stériques entre l'INH et le résidu Asp141.

Plus récemment, en 2015, Kamachi et *al.* obtiennent, par diffraction des rayons X, la structure cristallographique du complexe SeKatG-INH présentant trois molécules d'INH fixées à l'enzyme SeKatG [104]. Cependant, par analogie avec les structures cristallographiques de MtKatG et BpKatG, un seul site de fixation est en commun, à proximité de l'entrée du canal d'accès de l'hème et du résidu Ser315 (MTB) (Figure 33). Cependant, des analyses enzymatiques et des essais de stabilité thermique suggèrent que la réaction d'activation de l'INH ne se produit pas dans ce site de fixation.

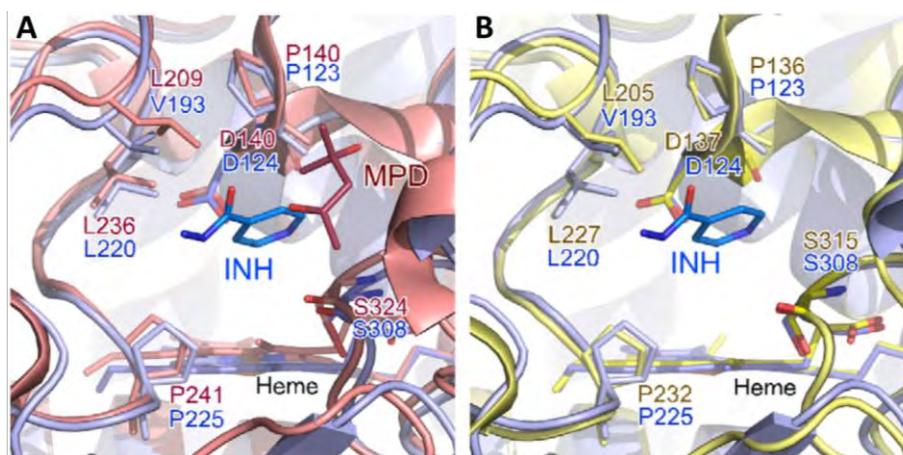


Figure 33 : Comparaison structurale du site de fixation de l'INH entre SeKatG (bleu) et A. BpKatG (rose) et B. MtKatG (jaune) à partir de structures obtenues par diffraction des rayons X [104]

Pour conclure, aujourd'hui, il est admis que l'INH possède plusieurs sites de fixation au sein de l'enzyme KatG et les positions discutées se situent essentiellement dans le canal d'accès, à proximité de l'hème.

II.2.1.2. *Analogie de l'INH actif sur souche mutée KatG(S315T)*

La mutation KatG(S315T), la plus fréquente, entraîne une modification structurale de l'enzyme KatG par un rétrécissement du canal d'accès à l'hème et une alteration des liaisons hydrogènes à proximité de l'hème. La résolution de la structure cristallographique de MtKatG(S315T) a favorisé la recherche de molécules capables de contourner ces changements structuraux.

Ainsi, l'équipe du Dr. Martins a réalisé des études de QSAR, synthétisé et évalué *in vitro* des analogues de l'INH sur la souche sauvage H37Rv et sur deux souches résistantes (KatG(S315T) et H37Rv_{INH}($\Delta katG$)) dans le but de trouver un analogue de l'INH actif sur TB-MDR [287]. Dans cette étude portant sur la synthèse d'analogues de l'INH, les principales modifications apportées à l'INH ont été des substitutions sur le *N*-distal de la fonction hydrazide [287]. Leurs conclusions sont que des distances *N-N'* courtes provoquées par une structure de type hydrazone et des substituants à longues chaînes favorisent l'activité biologique. Malgré la présence de dérivés à longue chaîne actifs, le caractère lipophile (évalué par la grandeur ClogP) n'est cependant pas un paramètre pertinent pour expliquer l'activité biologique de leurs analogues de l'INH. Cette étude a ainsi permis de mettre en avant le composé *N'*-décanoylisonicotinohydrazide (**II-25**) (Figure 31, page 133). Ce composé, décrit pour la première fois en 1992 par Giannola et *al.* [292], a eu un regain d'intérêt très récemment, notamment par les travaux de l'équipe du Dr. Martins [116,239,287] ou d'autres auteurs [293].

Le composé **II-25** est décrit comme actif sur souche sauvage H37Rv avec une CMI à 0,38 μM et sur souche mutée KatG(S315T) avec une CMI à 6,9 μM soit une perte d'activité seulement d'un facteur 18 entre la souche mutée et la souche sauvage [287]. Comparé à l'INH (CMI à 0,29 μM sur la souche sauvage H37Rv et 43,8 μM sur la mutation clinique KatG(S315T)), ce composé possède une très bonne activité sur la souche résistante à l'INH sur laquelle il s'est montré six fois plus actif que l'INH. Le mécanisme d'activation de ce composé semblerait identique à celui de l'INH, c'est-à-dire dépendant de KatG, puisqu'il perd totalement son activité sur la souche H37Rv_{INH}($\Delta katG$), souche modifiée résistante à l'INH par suppression du gène *katG*. De plus, ce composé présente une très faible cytotoxicité

($IC_{50}(\text{Vero cells})$ supérieure à $75 \mu\text{M}$) et un indice de sélectivité supérieur à 530 ($IC_{50}(\text{Vero cells})/\text{CMI}$) [287].

La structure de ce composé **II-25** avec la longue chaîne alkyle à dix atomes de carbone est inattendue au vu des contraintes stériques du canal d'accès à l'hème de KatG. Cependant, les auteurs ont confirmé la nécessité de cette longue chaîne en synthétisant un analogue, le *N'*-acétylisonicotinohydrazide (**II-26**) (Figure 34) qui présente une très faible activité biologique sur les deux souches de MTB [CMI à $44,65 \mu\text{M}$ pour H37Rv et CMI supérieure à $55,8 \mu\text{M}$ pour KatG(S315T)] [287].

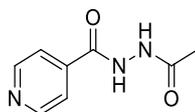


Figure 34 : Structure du *N'*-acétylisonicotinohydrazide II-26

Le composé *N'*-acétylisonicotinohydrazide (**II-26**) est connu pour être un métabolite de l'INH diminuant son activité thérapeutique. La *N*-acétyltransférase est une enzyme humaine capable de transférer un groupe acétyle de l'acétyl-coenzyme A sur l'azote terminal de l'INH [294–296]. Ce métabolite secondaire diminue ainsi la biodisponibilité de l'INH dans l'organisme. Une modification chimique au niveau de l'azote terminal de la fonction hydrazide de l'INH, comme pour **II-25**, est bénéfique pour la biodisponibilité de la molécule puisque la voie de métabolisation par la *N*-acétyltransférase humaine est ainsi bloquée.

De plus, une caractéristique importante du composé **II-25** est qu'il est très peu hydrosoluble. Pour le composé **II-25**, le $\log P_{\text{octanol/eau}}$ a été mesuré expérimentalement à 3,46 [287]. L'INH est un composé principalement hydrophile qui utilise certainement les porines membranaires pour pénétrer dans la mycobactérie [297]. La paroi de la mycobactérie étant très lipophile, il a été suggéré, dans le passé, que l'activité antimycobactérienne de molécules hydrophiles comme l'INH pouvait être améliorée par des chaînes latérales lipophiles ou hydrophobes [298]. Une étude sur la longueur de la chaîne alkyle pour des dérivés *N'*-acylés de l'INH montre que l'effet de la chaîne est bénéfique sur l'activité antimycobactérienne pour des chaînes alkyles de 7 à 18 atomes de carbone [293]. Une chaîne plus courte à 6 atomes de carbone a par contre un effet délétère sur l'activité. Cependant, les calculs théoriques du $\log P$ relatif à la lipophilie des molécules montrent des $\log P$ supérieurs à 5 lorsque la chaîne alkyle comporte plus de 12 atomes de carbone. Selon les cinq règles de Lipinski, il est préférable d'avoir un $\log P$ positif mais inférieur à 5 pour conserver des propriétés de solubilité, de pénétration et de perméabilité convenables [299]. Une substitution du *N*-terminal de l'INH par

une chaîne lipophile de longueur adaptée (7-11 atomes de carbone) est donc un très bon choix pour répondre à ces critères.

Récemment, afin de mieux comprendre l'activité du composé *N'*-décanylisonicotinohydrazide **II-25**, l'équipe du Dr. Martins a complété ces données en réalisant une étude conformationnelle sur KatG sauvage et KatG(S315T) [116]. Ils ont effectué des simulations de dynamique moléculaire avec l'INH et le composé **II-25** afin d'évaluer l'impact des contraintes stériques dans le canal d'accès à l'hème [116]. Leurs résultats montrent que les contraintes stériques, au niveau du canal d'accès de l'hème, sont négligeables et n'expliquent donc pas la perte d'activation de l'INH. Ces résultats sont en désaccord avec des études précédentes présentant un canal d'accès à l'hème trop étroit pour l'INH [98,100,115]. Cependant, de petites modifications structurales de l'enzyme (comme le méthyle apporté par la thréonine) peuvent entraîner la modification du réseau de liaisons hydrogène autour de l'hème (perte de la liaison hydrogène entre la sérine et le groupe propionate de l'hème) et un changement de conformation de certains acides aminés dans la cavité de l'hème. Les études de *docking* de KatG avec l'INH et **II-25** ont permis aux auteurs de proposer une explication pour l'activité sur souche mutée (Figure 35) [116]. Dans le cas de l'INH, deux modes de liaison principaux semblent coexister au niveau de l'hème de KatG, l'un avec le groupement hydrazine positionné au-dessus du fer hémique et l'autre pour lequel l'hydrazine est plus loin de l'hème. La conformation avec le groupement hydrazine à l'opposé de la porphyrine de l'hème, c'est-à-dire la conformation la moins favorable pour la réaction avec l'hème, devient la conformation la plus abondante dans le cas de KatG(S315T) (Figure 35-b). Dans le cas de **II-25**, une seule conformation est possible dans KatG sauvage ou dans KatG(S315T) (Figure 35-c,d). Dans celle-ci, la chaîne aliphatique interagit avec différents résidus à l'entrée du canal de l'hème, plaçant ainsi le groupement hydrazine idéalement au-dessus de la porphyrine.

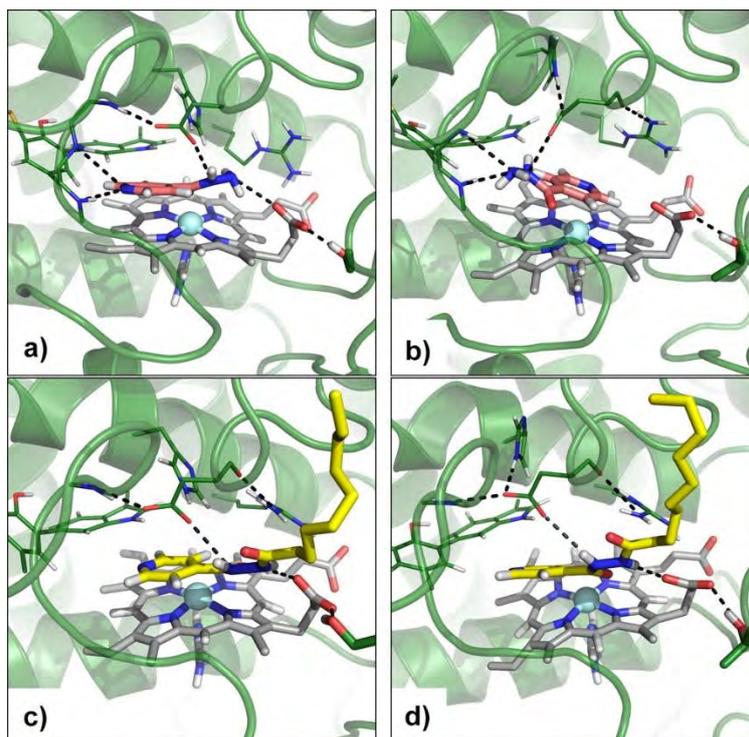


Figure 35: Meilleures conformations représentatives de INH et II-25 d'après une étude de docking avec l'enzyme KatG à l'état de repos.

(a) INH et KatG sauvage; (b) INH et KatG(S315T); (c) II-25 et KatG sauvage et (d) II-25 et KatG(S315T). L'hème est représenté en gris, INH en rose, et II-25 en jaune. D'après [116].

La chaîne aliphatique permet ainsi de positionner la fonction hydrazine de la molécule dans la bonne conformation, proche de l'hème, indépendamment de la forme de KatG étudiée (sauvage ou mutée). Elle permet ainsi de contrebalancer les changements conformationnels induits par la mutation KatG(S315T) qui conduisent à la perte d'activité de l'INH. Cette chaîne aliphatique semble donc être un bon substituant dans la recherche d'analogues de l'INH actifs sur la souche résistante KatG(S315T).

II.2.2. Résultats et discussion

Le composé de référence **II-25** a été synthétisé afin de vérifier la pertinence de la première hypothèse d'une corrélation entre le potentiel d'oxydation et l'activité sur souches résistantes à l'INH comme expliqué précédemment. Nous avons ensuite choisi de synthétiser trois analogues de cette molécule avec une longueur de chaîne équivalente : le composé **II-28** avec une chaîne alkyle en position *N*-distale, son précurseur hydrazone **II-27** et un dérivé de type *O*-alkylcarbamate **II-29** en s'inspirant des bons résultats obtenus avec le composé **I-5** (Figure 36 et Figure 30).

Le but de cette étude est d'analyser l'effet de la fonction chimique au niveau de la substitution du *N*-distal pour une longueur de chaîne considérée optimale. Ainsi les quatre

composés étudiés possèdent un caractère hydrophobe apporté par la chaîne alkyle ($\text{clog } P > 2,5$ contre $-0,64$ pour l'INH) mais présentent des propriétés structurales et chimiques différentes (géométrie, nombre de donneurs/accepteurs de liaison hydrogène...).

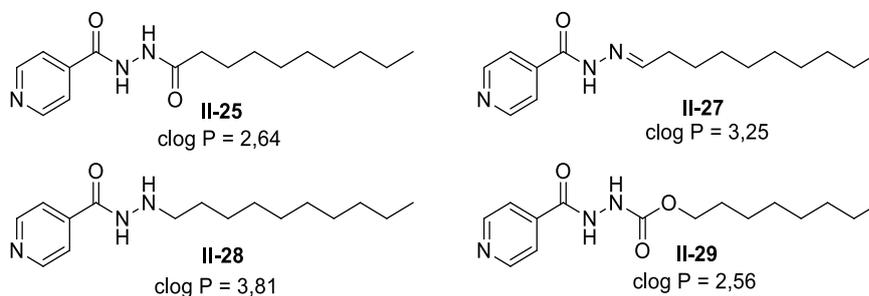


Figure 36 : Structures des analogues de l'INH synthétisés et valeurs de $\log P$ calculées ($\text{clog } P$) d'après ChemDraw v15.0.

Ces quatre composés ont été synthétisés à partir de l'INH. Le composé **II-25** a été préparé comme décrit dans la littérature par réaction entre l'INH et le chlorure de décanoyle dans du dichlorométhane (Schéma 22) [287,292,293].

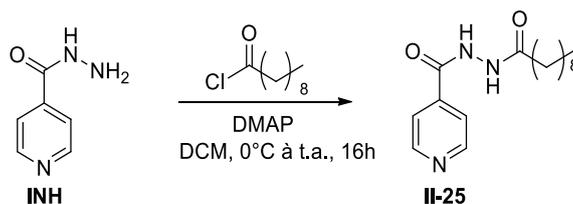


Schéma 22 : Voie de synthèse du *N'*-décanoylisonicotinohydrazide **II-25**

Le composé **II-28** est formé via une réaction d'amination réductrice lors de laquelle l'hydrazone intermédiaire **II-27** a été isolée (Schéma 23). La première étape est une réaction de condensation entre l'azote *N*-distal de l'INH et la fonction aldéhyde du décanal pour former l'hydrazone correspondante **II-27**. Pour l'étape de réduction de l'hydrazone, la méthode retenue est la réaction avec le triéthylsilane. L'emploi d'un réducteur classique tel que le cyanoborohydrure de sodium a également conduit au produit attendu avec des rendements comparables mais un temps de réaction plus long.

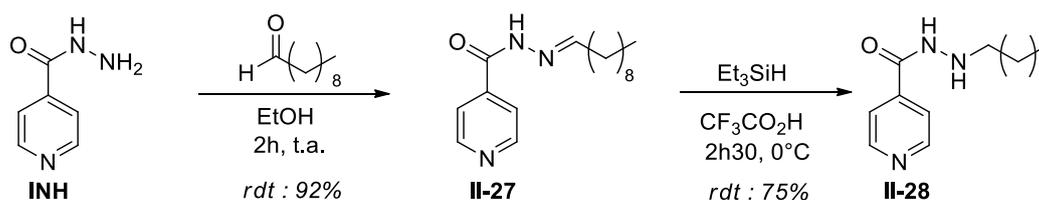


Schéma 23 : Voie de synthèse du déc-1-ène isonicotinoylhydrazone **II-27** et du *N'*-décy-*N*-isonicotinoic acid hydrazide **II-28**

Le composé **II-29** a été préparé via une réaction entre l'INH et le chloroformiate d'octyle dans la pyridine, une méthode classique de formation des carbamates, conduisant au composé **II-29** avec un très bon rendement (97%) (Schéma 24).

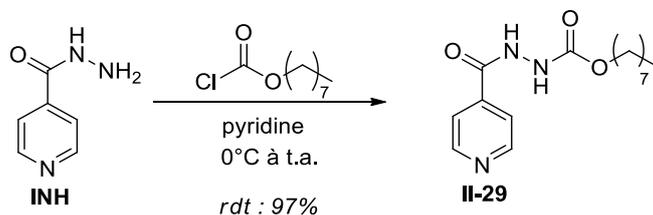


Schéma 24 : Voie de synthèse du *N'*-octyloxycarbonyl-*N*-isonicotinoic hydrazide **II-29**

Ces composés ont ensuite été testés sur la souche sauvage H37Rv et sur les souches IC1 et IC2 résistantes à l'INH comme précédemment décrit. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous, avec l'INH en tant que composé de référence.

Tableau 7 : Activité antimycobactérienne des composés **II-25**, **II-27**, **II-28**, **II-29**

Molécule	CMI sur <i>M. tuberculosis</i> Nos résultats			CMI sur <i>M. tuberculosis</i> Littérature[287]		CMI sur <i>M. tuberculosis</i> Littérature[293]
	H37Rv (μ M)	IC1 (μ M)	IC2 (μ M)	H37Rv (μ M)	KatG (S315T) (μ M)	H37Rv (μ M)
INH	0,18	> 36	> 36	0,29	43,8	0,57
II-25	0,021	8,6	8,6	0,38	6,9	0,27
II-27	0,9	> 18	> 18	/	/	/
II-28	1,8	> 18	> 18	/	/	/
II-29	0,010	8,5	8,5	/	/	/

Tous les composés synthétisés dans le cadre de ce travail présentent une bonne activité antimycobactérienne sur la souche H37Rv et une activité supérieure à celle de l'INH pour les composés **II-25** et **II-29**. Les valeurs obtenues pour le composé **II-25** sont légèrement différentes de celles décrites dans la littérature. Cette différence peut s'expliquer par des souches résistantes à l'INH différentes et par des méthodes de détermination de CMI différentes (milieu solide ou en solution). La méthode en milieu solide utilisée par notre collaboratrice est plus fastidieuse mais conduit à des valeurs généralement plus faibles et plus reproductibles. Ainsi, la CMI du composé **II-25** mesurée sur la souche H37Rv ($CMI_{H37Rv} = 0,021 \mu M$) est ici, de façon surprenante, bien inférieure à celles précédemment décrites ($CMI_{H37Rv} = 0,38 \mu M$ et $0,27 \mu M$) [287,293]. Néanmoins, l'activité sur souches résistantes à

l'INH reste comparable ($CMI_{IC1\&IC2} = 8,6 \mu M$ et $CMI_{KatGS315T} = 6,9 \mu M$) malgré le manque d'information sur les mutations concernant KatG pour les souches IC1 et IC2.

Le composé **II-25** est décrit dans la littérature comme actif sur souche sauvage H37Rv avec une CMI à $0,38 \mu M$ et sur souche mutée KatG(S315T) avec une CMI à $6,9 \mu M$ soit une perte d'activité seulement d'un facteur 18 sur la souche mutée [287]. Les résultats expérimentaux présentés ici montrent une perte d'activité entre la souche sauvage H37Rv et les souches résistantes à l'INH IC1 et IC2 d'un facteur 400. Bien que cette perte d'activité entre souches sauvage et mutées soit importante, montrant que le composé **II-25** n'est pas totalement capable de contrebalancer l'effet de la mutation, le composé **II-25** est cependant actif sur les souches IC1 et IC2 ($CMI_{IC1\&IC2} = 8,6 \mu M$) et présente une activité antimycobactérienne meilleure que celle de l'INH.

Le résultat est identique pour le composé **II-29** qui est très actif sur la souche sauvage H37Rv ($CMI_{H37Rv} = 0,010 \mu M$) et où la perte d'activité entre la souche sauvage H37Rv et les souches résistantes à l'INH (IC1 et IC2) est d'un facteur 850 ($CMI_{IC1\&IC2} = 8,5 \mu M$). Toutefois, la très bonne activité sur souche sauvage démontre que la stratégie d'associer une fonction carbamate et une chaîne longue (chaîne à 10 chaînons) sur la structure de l'INH est une très bonne stratégie pour la recherche de composés antituberculeux.

Pour les composés **II-27** et **II-28**, l'activité antimycobactérienne sur souche sauvage H37Rv est intéressante même si la CMI est supérieure à celle de l'INH (CMI_{H37Rv} **II-27** = $0,9 \mu M$ et CMI_{H37Rv} **II-28** = $1,8 \mu M$). Pour l'activité sur souches résistantes (IC1 et IC2), la CMI est supérieure à $18 \mu M$ et ainsi, les composés **II-27** et **II-28** sont considérés comme non actifs sur les souches résistantes bien que la CMI exacte n'ait pas été déterminée.

Afin d'enlever tout doute concernant la stabilité de ces composés, une étude de leur stabilité a été réalisée par un suivi en RMN 1H , à deux pH dans de l'eau deutérée acidifiée par de l'acide chlorhydrique ou du DCl. Les composés **II-25** et **II-29** sont parfaitement stables à pH 1 ou 5 sur 24 heures. Le composé **II-27** portant une fonction hydrazone est stable sur 24 heures à pH 5 mais présente une forte instabilité à pH 1 puisque la disparition totale du produit de départ est observée au bout de 20 minutes, conduisant essentiellement à la formation d'INH. Les tests *in vitro* étant réalisés dans un milieu de culture à pH 6,5, l'activité antimycobactérienne observée ne proviendrait donc pas d'une dégradation des produits. *In vivo*, le pH des macrophages étant autour de 5 et celui à l'intérieur de la bactérie autour de 7, une dégradation de ces composés par hydrolyse acide semble peu probable.

La cytotoxicité de ces molécules a été évaluée sur macrophage (lignée cellulaire J774) et sur HepG2 (lignée cellulaire d'hépatocarcinome), par des tests de viabilité cellulaire au MTT selon le protocole décrit dans la référence [286] (Tableau 8). Les composés **II-27** et **II-29** ne présentent pas de cytotoxicité (CC_{50} supérieure à 100 μM sur J774 et HepG2). Le composé **II-29** présente ainsi un excellent index de sélectivité ($IS > 10000$, index de sélectivité calculé selon $CC_{50(\text{HepG2})}/\text{CMI}$) pour la souche sauvage H37Rv. Le composé **II-28** est cytotoxique (CC_{50} entre 12 et 15 μM sur J774 et HepG2). Le composé **II-25**, quant à lui, présente une cytotoxicité non négligeable sur HepG2 (30,1 μM) mais l'index de sélectivité ($IS = 1433$) par rapport à la souche sauvage H37Rv est bien supérieur à celui de l'INH, médicament de référence.

Au regard de toutes ces informations, le composé **II-29** est donc le meilleur composé de la série étudiée.

Tableau 8 : Cytotoxicité des composés **II-25**, **II-27**; **II-28**; **II-29**.

^a : index de sélectivité (IS) = $CC_{50(\text{HepG2})}/\text{CMI}$

Molécule	CMI sur <i>M. tuberculosis</i> Nos résultats			Cytotoxicité	
	H37Rv (μM) (IS) ^a	IC1 (μM) (IS) ^a	IC2 (μM) (IS) ^a	J774 CC_{50} (μM)	HepG2 CC_{50} (μM)
INH	0,18 (>555)	> 36	> 36	/	> 100
II-25	0,021 (1433)	8,6 (3,5)	8,6 (3,5)	90,5	30,1
II-27	0,9 (>111)	> 18	> 18	> 100	> 100
II-28	1,8 (8)	> 18	> 18	12,1	15,4
II-29	0,010 (>10000)	8,5 (>11)	8,5 (>11)	> 100	> 100

II.2.3. Conclusion

L'effet bénéfique d'une longue chaîne au niveau l'azote terminal de l'INH dépend de la fonction chimique située au niveau de cet azote terminal. La substitution *N*-terminale de l'hydrazide de l'INH par une longue chaîne alkyle **II-28** ou conduisant à une hydrazone **II-27** entraîne une légère augmentation de la CMI sur souche sauvage, sans nette amélioration sur souches résistantes à l'INH. Cependant, lorsque la fonction chimique utilisée pour la substitution de l'azote terminal de l'INH est une fonction acyle **II-25** ou une fonction

carbamate **II-29**, l'activité antimycobactérienne sur souche sauvage est améliorée d'au moins un facteur 10, le composé **II-29** étant 20 fois plus actif que l'INH de référence. Les molécules **II-25** et **II-29** montrent une perte d'activité importante entre souches sauvage et résistantes et ne sont ainsi pas capables de conserver l'activité antimycobactérienne sur les souches IC1 et IC2. Toutefois, ces molécules présentent une activité non négligeable sur les souches mutées IC1 et IC2 ($CMI_{IC1\&IC2} = 8,5-8,6 \mu M$) et il serait intéressant d'évaluer la CMI du composé **II-29** sur la souche mutée KatG(S315T).

Néanmoins, ces deux molécules **II-25** et **II-29** sont de très bonnes têtes de file dans la recherche de nouvelles molécules analogues de l'INH puisqu'elles présentent une très bonne activité antimycobactérienne sur souche sauvage et une activité, bien que modeste, sur souches résistantes. De plus, la présence d'un groupement sur la azote distal de la fonction hydrazide devrait permettre de réduire la métabolisation par la *N*-acétyltransférase.

II.2.4. Partie expérimentale

General

All solvents and commercially available reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification including isonicotinoic acid hydrazide (INH, 1). *N*'-decanoylisonicotinohydrazide (**II-25**) was prepared according to a reported procedure [293]. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel-coated aluminium plates with fluorescent indicator 254 nm (Merck or Fluka). Preparative chromatography was performed on silica gel column (Merck 63–200 μm) or using a CombiFlash Companion (Teledyne Isco) with RediSep prepacked cartridges (SiO_2 35–70 μm). The purity of compounds was assessed by microanalysis and/or by thin layer chromatography coupled to ^{13}C NMR.

General instrumentation and analysis conditions

1H NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 300, 400 and 500 MHz using $CDCl_3$, DMSO-*d6* or MeOD-*d4* as solvent. The residual proton signal of the deuterated solvent was used as an internal reference: $CDCl_3$ $\delta = 7.29$ ppm, DMSO $\delta = 2.50$ ppm and MeOD $\delta = 3.31$ ppm. ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 75, 100 and 126 MHz. Electrospray mass spectra (ESI) were obtained on a Perkin-Elmer SCIEX API 365 instrument and desorption chemical ionization (DCI) mass spectra were acquired on a Finnigan TQS 7000 spectrometer. The melting points were determined on an Electrothermal

9300 capillary melting point apparatus and are not corrected. Infra-red spectra were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer with ATR functionality.

Synthesis

Dec-1-ene isonicotinoylhydrazone (II-27) To a solution of isonicotinoic acid hydrazide (1.31 g, 9.55 mmol) in EtOH (30 mL) was slowly added decanal (1.80 mL, 9.55 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours and the solvents were then evaporated under vacuum. Purification by column chromatography (eluent: DCM / methanol : 100/0 to 95/5) provided **II-27** as a mixture of 2 regioisomers (ratio syn / anti : 15 / 85). Yield 88% (2.31 g). White solid, mp 88-89 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): Major isomer: 10.73 (s, 1H), 8.64 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.74 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.36 – 2.22 (m, 2H), 1.54 – 1.39 (m, 2H), 1.39 – 1.15 (m, 12H), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); Minor isomer: 9.97 (s, 1H), 8.68 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 2.32 – 2.19 (m, 2H), 1.62 – 1.55 (m, 2H), 1.39 – 1.15 (m, 12H), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): Both isomers: 167.9 (Cq), 162.6 (Cq), 155.1 (CH), 155.1 (CH), 150.2 (CH), 149.5 (CH), 140.4 (Cq), 140.4 (Cq), 123.6 (CH), 121.4 (CH), 32.6 (CH₂), 32.1 (CH₂), 31.8 (CH₂), 31.8 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.2 (CH₂), 26.6 (CH₂), 22.6 (CH₂), 14.1 (CH₃). HRMS (ESI): for C₁₆H₂₆N₃O ([M+H]⁺): calcd: 276.2076; found: 276.2077. Anal. calcd. for C₁₆H₂₅N₃O: C, 69.78; H, 9.15; N, 15.26. Found: C, 69.92; H, 9.80; N, 15.39. IR √ (cm⁻¹): 3468, 3254, 3078, 2955, 2925, 2849 1655, 1625, 1549, 1460, 1411, 1367, 1296, 1037, 965, 935, 847, 754, 673, 658.

N'-decyl-N-isonicotinoic acid hydrazide (II-28) Triethylsilane (0.54 mL, 3.40 mmol) was slowly added at 0 °C to a solution of dec-1-ene isonicotinoylhydrazone **II-27** (467 mg, 1.70 mmol) in trifluoroacetic acid (3.5 mL). After stirring at 0 °C for 2 h 30, a saturated solution of NaHCO₃ was slowly added under stirring, until neutralization. The mixture was then extracted with dichloromethane (3 x 15 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. Purification by flash chromatography (eluent: ethyl acetate) provided compound **II-28**. Yield 75% (350 mg). White solid, mp 72-73 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): δ 8.73 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.34 (bs, 1H), 7.62 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.89 (bs, 1H), 2.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.53 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.45 – 1.11 (m, 14H), 0.87 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.2 (Cq), 150.6 (CH), 140.1 (Cq), 120.8 (CH), 52.3 (CH₂), 31.9 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.3

(CH₂), 28.0 (CH₂), 27.1 (CH₂), 22.7(CH₂), 14.1 (CH₃). HRMS (ESI): for C₁₆H₂₈N₃O ([M+H]⁺): calcd: 278.2232; found: 278.2232. Anal. calcd. for C₁₆H₂₇N₃O: C, 69.27; H, 9.81; N, 15.15. Found: C, 69.36; H, 10.19; N, 15.36. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3459, 3270, 2955, 2921, 2851, 1637, 1596, 1547, 1501, 1484, 1383, 1331, 1221, 1066, 992, 907, 842, 671, 653. Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) E_a = 0,42 V/NHE.

N^o-octyloxycarbonyl-N-isonicotinoic hydrazide (II-29): To a solution of isonicotinoyl hydrazine (0.3 g, 2.19 mmol) in dry pyridine (10 mL) and at 0 °C was added dropwise octyl chloroformate (0.45 mL, 2.30 mmol). The temperature was allowed to return slowly to room temperature and stirred for 90 minutes. Cold water was added to the crude, and the product was then extracted with DCM (3 x 30 mL) and washed successively with a saturated solution of NaHCO₃ (15 mL) and brine (15 mL). The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The product was purified by solubilization in diethyl ether (5 mL) and precipitation with hexane (40 mL), providing compound **II-29**. Yield 97% (0.62 g). White solid, mp 70-71 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.72 (br s, 1H); 8.66 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H); 7.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H); 7.48 (br s, 1H); 4.12 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H); 1.62 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H); 1.28 (m, 10H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.0 (Cq); 157.2 (Cq); 150.5 (CH); 138.5 (Cq); 121.0 (CH); 66.9 (CH₂); 31.7 (CH₂); 29.16 (CH₂); 29.15 (CH₂); 28.7 (CH₂); 25.7 (CH₂); 22.6 (CH₂); 14.1 (CH₃). HRMS (DCI-CH₄): for C₁₅H₂₄N₃O₃ ([M+H]⁺): calcd: 294.1818; found: 294.1812. Anal. calcd. for C₁₅H₂₃N₃O₃: C, 61.41; H, 7.90; N, 14.32. Found: C, 61.11; H, 8.11; N, 14.08. IR $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3415, 3257, 3033, 2949, 2918, 2852, 1718, 1657, 1618, 1552, 1521, 1467, 1409, 1384, 1276, 1085, 1039, 972, 918, 755, 617. Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) E_a = 0,78 V/NHE.

Growth conditions and minimum inhibitory concentration (MIC) determination in *M. tuberculosis*

H37Rv was used as the reference strain. The strains were grown at 37 °C in Middlebrook 7H9 broth (Becton Dickinson), supplemented with 0.05% Tween 80, or on solid Middlebrook 7H11 medium (Becton Dickinson) supplemented with oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC). MICs for the new compounds were determined by means of the micro-broth dilution method. Dilutions of *M. tuberculosis* wild-type and clinical isolate cultures (about 10⁵–10⁶ cfu/ml) were streaked onto 7H11 solid medium containing a range of drug concentrations (0.25 $\mu\text{g/mL}$ to 40 $\mu\text{g/mL}$). Plates were incubated at 37 °C for about 21 days and the growth was visually evaluated. The lowest drug dilution at which visible growth

failed to occur was taken as the MIC value. Results were expressed as the average of at least three independent determinations.

CHAPITRE III. Molécules chimio-activables : complexes de fer de l'isoniazide et d'analogues

III.1. Introduction

La dernière stratégie proposée pour contourner les résistances associées à un défaut d'activation est de synthétiser des molécules ne nécessitant pas une activation enzymatique mais une simple oxydation par un oxydant endogène de la bactérie (par exemple H_2O_2 , O_2 ou $O_2\bullet^-$). Ce travail s'appuie sur la description faite dans la littérature de la molécule IQG-607, le complexe (isoniazide)pentacyanoferrate (II) de sodium, proposé comme un complexe antituberculeux activable par oxydoréduction chimique [242].

Ce composé, développé depuis 2003 par Sousa et Moreira, inhibe la synthèse des acides mycoliques dans des souches H37Rv et inhibe, *in vitro*, l'enzyme InhA sans activation par l'enzyme KatG et, étonnamment, en absence de NADH [241,300–302]. De plus, il présente une CMI entre 0,45 et 0,56 μM sur la souche H37Rv de MTB ($CMI_{H37Rv}(INH) = 0,15 - 0,44 \mu M$) et une cytotoxicité supérieure à 56 μM (IC_{50}) sur cellules HL60 et MCF-7 [301]. Le composé IQG-607 a également montré une activité sur des souches mutées pour InhA avec une CMI $inhA(S94A) = 2,24 \mu M$ et une CMI $inhA [C(-15)T] = 8,97 \mu M$ [302]. Cette molécule est actuellement en études précliniques au Brésil et a montré une activité antituberculeuse bactéricide lors de son administration par voie orale chez des souris, sans présenter de toxicité apparente [240,242].

Les mécanismes d'action proposés pour l'IQG-607 impliquent soit une inhibition directe de l'enzyme InhA, avec l'IQG-607 se positionnant dans la poche du NADH, soit un mécanisme similaire à celui de l'INH, passant par la formation d'un adduit avec le NAD (Schéma 25) [242,301]. Des tests d'inhibition de l'enzyme InhA par $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$ ont montré que la présence du ligand isoniazide dans le complexe IQG-607 était essentielle pour l'inhibition de l'activité enzymatique d'InhA [303].

Le mécanisme proposé pour l'activation de l'IQG-607 passe par l'oxydation du métal fer (II) en fer (III) puis par un transfert d'électron intramoléculaire permettant de revenir à un degré d'oxydation (II) pour le fer en oxydant la partie hydrazide en un radical isonicotinoyle pouvant réagir avec le NAD [242]. La formation d'un intermédiaire radicalaire de type isonicotinoyle, lors de l'oxydation de IQG-607 par H_2O_2 , a été mis en évidence par RPE au

travers du piégeage d'un radical avec le POBN (α -(4-pyridyl *N*-oxyde)-*N*-*tert*-butylnitronne) ou le PBN (*N*-*tert*-butyl- α -phenylnitronne) [242]. Cependant, la formation de l'adduit IQG-NAD ou INH-NADH (issue de la décomplexation de l'adduit IQG-NAD) après l'activation de l'IQG-607 par un agent oxydant et en présence de NAD n'a pas encore été démontrée. L'oxydation d'IQG-607 par H_2O_2 , en absence de cofacteur, a été suivie par HPLC ou par RMN 1H et a révélé, après décomplexation avec le DMSO, la formation de l'acide isonicotinoïque (majoritaire) et de l'isonicotinamide comme métabolites finaux [242]. L'activation de l'IQG-607 est décrite comme une oxydation intramoléculaire mais un mécanisme de type oxydation intermoléculaire ne peut être exclu.

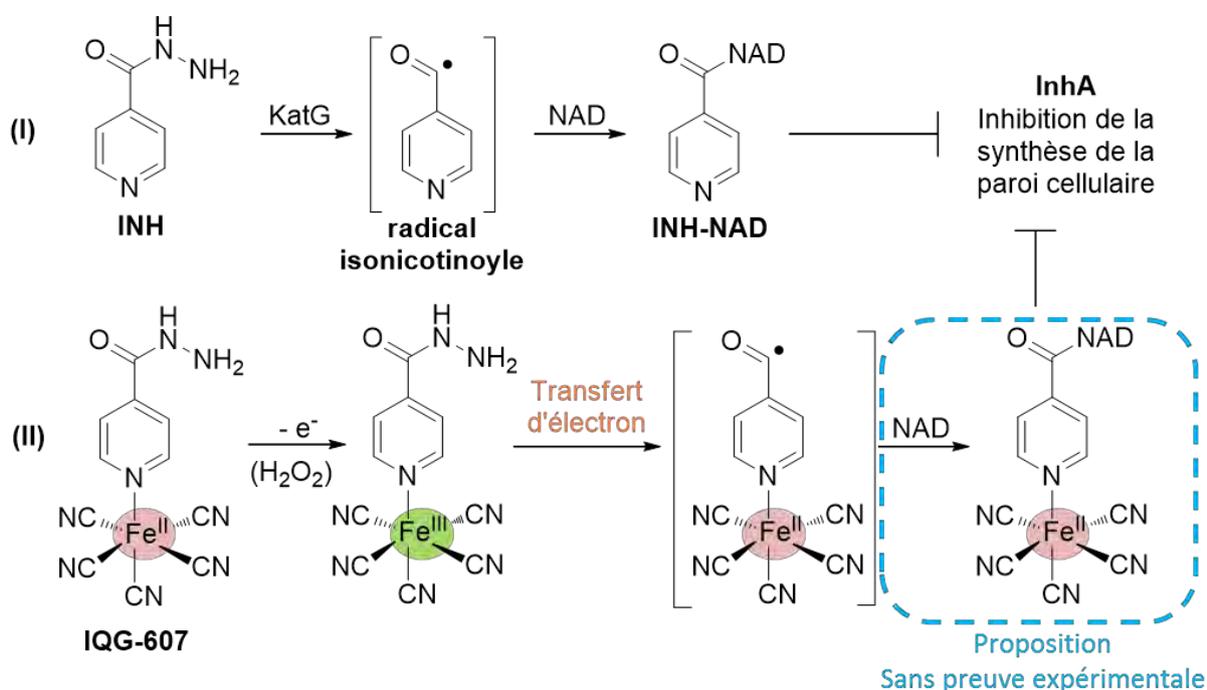


Schéma 25 : Mécanisme d'action de l'INH, activation enzymatique (I) et mécanisme proposé pour IQG-607, activation chimique (II), adapté de Sousa et al. [242]

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'action de l'IQG-607, nous avons initié une collaboration avec l'équipe du Pr. E.H.S. Sousa de l'Université *Federal Do Ceará* à Fortaleza au Brésil. Cet échange scientifique m'a permis de réaliser un stage doctoral de deux mois au sein de cette université.

Notre objectif a été d'utiliser nos connaissances sur le mécanisme d'activation de l'INH pour étudier l'hypothèse mécanistique d'activation de l'IQG-607 via la formation d'un métabolite actif drogue-cofacteur NAD, similaire à celui de l'INH. D'autre part, afin d'étendre cette étude du mécanisme d'activation de l'IQG-607 à d'autres dérivés, nous avons synthétisé des analogues de ce complexe substitués sur la portion hydrazine. La synthèse d'un

complexe analogue, avec le ligand pyrazine carbohydrazide, a également été entreprise afin d'examiner si l'oxydation de ce complexe serait capable de conduire à la formation de l'acide pyrazinoïque, forme active de la pro-drogue PZA.

III.2. Iron(II) complexes of isoniazid and analogues : synthesis, characterization and study of their oxidative properties in the presence of H_2O_2 (*article en préparation*)

Résumé de l'article en français :

Cet article présente la synthèse et la caractérisation de dix complexes de type pentacyanoferrate (II) avec des analogues de l'INH ou de la PZA comme ligand (Figure 37). Ces complexes sont susceptibles, sous l'effet d'un agent oxydant, de générer le radical aroyle et d'agir comme inhibiteurs potentiels de l'enzyme InhA en surmontant les résistances liées aux enzymes d'activation. Dans ce but, l'oxydation de ces complexes par le peroxyde d'hydrogène a été réalisée et suivie par RPE et LC-MS, afin d'étudier le processus de transfert d'électron intramoléculaire conduisant à la génération des métabolites d'oxydation.

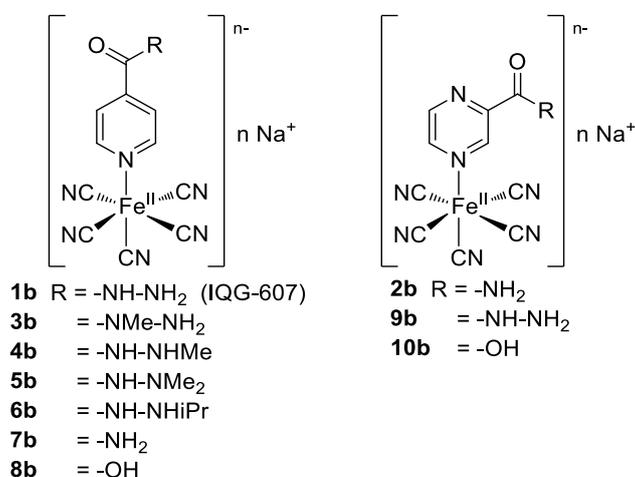


Figure 37: Complexes de type pentacyanoferrate (II) synthétisés

L'oxydation de ces complexes étudiée par RPE a mis en avant la formation d'un radical de type aroyle pour les complexes présentant des ligands de type hydrazide non substitué et de type alkyle pour les complexes avec des ligands de type hydrazide substitué. L'activation de ces complexes par H_2O_2 a également été étudiée par LC-MS montrant, après décomplexation au DMSO, la formation de métabolites de type acide carboxylique et amide. Ces résultats démontrent bien un transfert d'électron intramoléculaire entre le fer et le ligand portant la fonction hydrazide, puisque ce dernier est oxydé alors que non complexé, il est inerte vis-à-

vis de H₂O₂. Nous proposons donc un mécanisme, encore à l'étude, pour expliquer la formation des différents métabolites observés au cours de l'oxydation de ces complexes.

L'étude du complexe (isoniazide)pentacyanoferrate (II) de sodium a également été réalisée en LC-MS en présence de H₂O₂ et de NAD⁺ afin d'étudier la formation de l'adduit INH-NADH, après décomplexation par le DMSO. Bien que ces adduits aient été détectés en faible quantité, ce résultat confirme que le complexe (isoniazide)pentacyanoferrate (II) de sodium peut agir par le même mécanisme d'action que l'INH, à savoir la formation de l'adduit avec le NAD et donc conduire à l'inhibition de l'enzyme InhA via cet adduit.

Article complet en anglais :

Iron(II) complexes of isoniazid and analogues : synthesis, characterization and study of their oxidative properties in the presence of H₂O₂

Julie Laborde,^{a,b} Céline Deraeve,^{a,b} Francisca Gilmara de Mesquita Vieira,^c Alix Sournia-Saquet,^{a,b} Lionel Rechinat,^{a,b} Luis Gonzaga de França Lopes^c, Eduardo Henrique S. Sousa,^{c} Geneviève Pratviel^{a,b} and Vania Bernardes-Génisson^{*a,b}*

^a CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205, route de Narbonne, BP 44099, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

^b Université de Toulouse, UPS, INPT, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

^c Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica et Inorgânica, Campus Pici, Fortaleza, CE 60455-760, Brazil.

Corresponding authors: vania.bernardes-genisson@lcc-toulouse.fr ; eduardohss@dqi.ufc.br

Introduction:

Since 1993, tuberculosis disease has been considered by World Health Organization (WHO) as global emergency. In fact, tuberculosis still kills more than 1 million people per year in the planet and about one third of the world population is infected by *Mycobacterium tuberculosis* bacillus (MTB).¹ This situation mainly occurs because MTB has being developed resistance towards some of the most efficient medicines used in the first-line treatment of this pathology (isoniazid (INH, **1a**), rifampicin, pyrazinamide (PZA, **2a**) and ethambutol). It was estimated that 480000 cases of multidrug-resistant (MDR) tuberculosis (TB) occurred in 2014.² Moreover, the number of totally drug-resistant MTB strains (resistant to all available antibiotics) is also increasing and it can, in the future, lead to tuberculosis out of control, which consist in a real threat for the mankind. The second aspect that makes tuberculosis

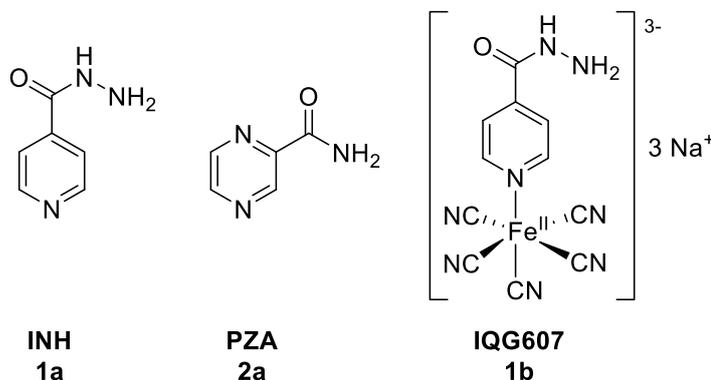
eradication very difficult is the existence of a latent form of MTB that is not sensible to the current treatments, except to pyrazinamide.

Recently, two new medicines (bedaquiline and delamanid) were approved by US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency's (EMA) as anti-tuberculosis drugs.²⁻³ However, they received only a conditional regulatory approval, being reserved for the multi-drug resistant tuberculosis cases and used in third-line treatment. Thus, isoniazid, a molecule known for long time (1952), remains nowadays one of the most relevant anti-tuberculosis drug. This antibiotic is in fact a pro-drug, which needs an activation step to become active and to manifest its antibacterial effect. This activation is mediated by a catalase-peroxidase enzyme of the MTB called KatG (iron heme-protein), which oxidizes INH to generate the isonicotinoyl radical. This radical then covalently reacts with the NAD cofactor (nicotinamide adenine dinucleotide) to form the active metabolite, INH-NADH adduct, which is the inhibitor of an enzyme (InhA) implicated in the biosynthesis of mycolic acids of the mycobacterial cell wall.⁴ It was shown that INH-resistant MTB strains are frequently correlated to a default of KatG that is unable to oxidize INH.⁵⁻⁶ Thus, the understanding of the KatG electron transfer processes in the INH activation mechanism is an essential step for the design and development of new pro-drugs able to overcome resistances. Nowadays, the molecular mechanism of the enzymatic transformation of INH into isonicotinoyl radical by the catalase-peroxidase, including the exact binding site of INH in KatG, is not yet completely elucidated and some disagreeing data are published in the literature. Nevertheless, the identity of products formed from oxidation of INH by KatG was investigated by Schultz P.G. and co-workers. The oxidative products were identified by mass spectrometry and compared to authentic samples. *In vitro*, at pH of 7.5 in 50 mM Na₂HPO₄ at 37 °C and in absence of cofactor (NAD(H)), isonicotinoic acid was found as the major final metabolite, which is believed to be generated from the instable isonicotinoyl radical precursor.⁷ Isonicotinamide and pyridine-4-carboxaldehyde were also detected as final minor metabolites.

Otherwise, organometallic compounds have been currently attracting much interest as potential therapeutic agents.⁸ Recently, the use of INH-Fe(II) complex **1b** as a non-enzymatically activated isoniazid was reported by some of us and proposed as a possible remedy to replace the default enzymatic activation step by KatG.⁹ Indeed, INH-Fe(II) complex displays interesting inhibitory activity toward InhA enzyme and against MTB growth *in vitro* and *in vivo*.⁹⁻¹² The authors pointed out the possibility that *in vivo* this complex is able to be activated by an endogenous oxidant as H₂O₂, yielding first the

isonicotinoyl radical and then, in the presence of NAD(H) cofactor, the similar inhibitor as INH (INH-NADH adduct).^{10,13} The chemical, biological and toxicological properties found for this complex¹⁴ have encouraged us to consider it as a lead compound for the research in the field of INH resistant tuberculosis. Even though the anti-tuberculosis activity of this molecule was well demonstrated, no proof exists to support the hypothesis that this complex acts indeed as a prodrug non KatG-dependent and forms the same inhibitor as INH, the INH-NADH adduct.

In this work, we synthesized the INH-Fe(II) complex and a series of new INH analogues-Fe(II) complexes, as prototypes for chemo-oxidizing compounds able to generate aroyl radical and to act as potential InhA inhibitors, overcoming thus resistance issues. For that purpose, we investigated by ESR and LC-MS the scope and limitations of the intramolecular electron-transfer metal redox processes. We also concentrated our efforts to examine by LC-MS if the INH-Fe(II) complex, in absence of KatG and in the presence of H₂O₂ and NAD⁺, could indeed, as has been proposed, generate the INH-NADH adduct, which is the active metabolite of INH and the veritable InhA inhibitor.



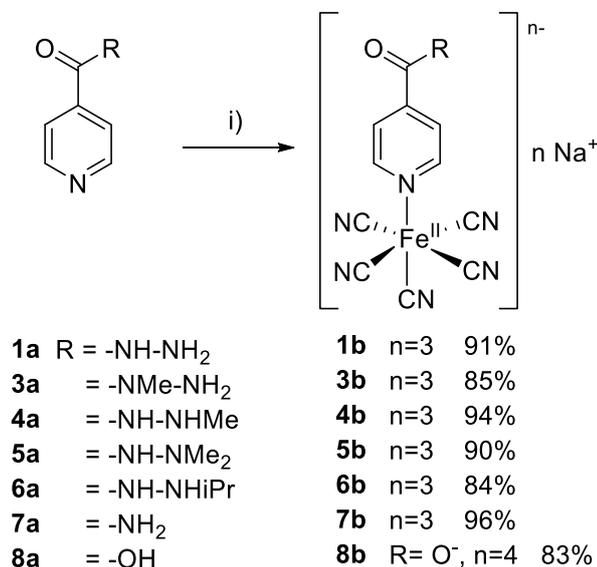
Results and discussion:

Iron(II) complexes syntheses and characterizations:

In order to study the scope and limitations of the oxidative reaction of the $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{ligand})]^{3-}$ complexes by H₂O₂ as an aroyl radical formation method, INH **1a**, various *N*-alkyl INH analogues (substituted either in proximal- or distal-nitrogen) (**3a-6a**) and a compound with different nitrogen heterocycle ring as pyrazine-2-carbohydrazide **9a** reacted with $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)]^{3-}$ in aqueous solution, as previously described for INH by Sousa *et al.*,¹⁰ to provide the corresponding $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{ligand})]^{3-}$ complexes **1b**, **3b-6b** and **9b** (Schemes 1 and 2). We also extended this study to other compounds devoid of hydrazide function with the

aim of verifying if the intramolecular metal redox process was associated to the hydrazide function. Thus, pyrazinamide (**2a**), isonicotinoic acid (**7a**), isonicotinamide (**8a**) and pyrazinoic acid (**10a**), reported metabolites of isoniazid and pyrazinamide, were transformed to the corresponding complexes by a similar procedure, except for the use of 2 M NH_4OH instead of water as solvent in the case of carboxylic acids **8a** and **10a** for solubility issues.

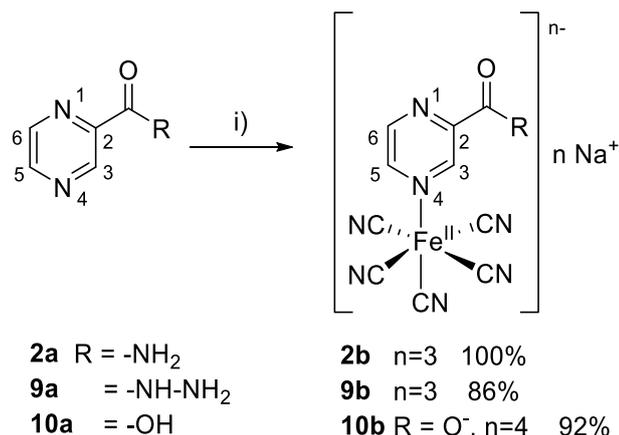
The complexation of the diamagnetic iron(II) metal through the pyridine ring nitrogen is clearly visible in ^1H NMR spectra in D_2O by the deshielding of H-2,2' (typically 0.40 – 0.50 ppm) in *ortho* position of the complexed pyridine nitrogen atom and the shielding of H-3,3' protons (generally about 0.20 – 0.30 ppm) in *meta* position due to the $(\text{INH})\text{p}\pi^* \leftarrow \text{d}\pi(\text{Fe}^{\text{II}})$ back bonding (Table 1, compounds **1b** and **3b-8b**).



Scheme 1. Synthesis of pyridine- $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5$ complexes. Reagents and conditions: i) $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, H_2O or aqueous NH_4OH (2M), rt, 3 h.

Pyrazine-2-carbohydrazide **9a** was selectively converted to **9b**, as observed, in ^1H NMR in D_2O , by the shift of protons H-3 and H-5 from 9.03 and 8.70 ppm to 9.49 and 9.18, respectively and the chemical shielding of H-6 from 8.62 ppm in **9a** to 8.26 ppm in **9b**. This indicates that the complexation of the iron(II) metal is selectively mediated through the pyrazine nitrogen in position 4, causing chemical deshielding of the hydrogens in *ortho* positions (H-3 and H-5) and shielding for that in *meta* position (Scheme 2 and Table 1).¹⁵ The selectivity of the reaction was furthermore confirmed by 2D ^1H - ^{15}N HMQC NMR experiments on **9a** and **9b** in D_2O . The ^{15}N chemical shifts of N-1 and N-4 of ligand **9a** have been measured at -60.8 and -56.9 ppm, respectively, which is consistent with reported values

for monosubstituted pyrazines, displaying slightly larger chemical shifts for N-4 when compared to those of N-1.¹⁶ After complexation (compound **9b**), the involvement of N-4 in the coordination bond lead to a marked decrease of its ¹⁵N chemical shift from -56.9 ppm to -78.0 ppm, whereas N-1 chemical shift was only slightly affected (from -60.8 to -69.5 ppm). This observation is consistent with the described upfield shift of ¹⁵N resonance in pyridines and pyrazines for which the nitrogen lone-pair electrons are engaged into protonation,¹⁷ N-oxidation¹⁷ or complexation.¹⁸



Scheme 2. Synthesis of pyrazine-Fe^{II}(CN)₅ complexes. Reagents and conditions: i) Na₃[Fe^{II}(CN)₅(NH₃)]·3H₂O, H₂O or aqueous NH₄OH (2M), rt, 3 h.

Table 1. ¹H chemical shifts (in ppm) of ligands **1a-10a** and complexes **1b-10b** measured in D₂O.

Compound	Ligand (a)					Complex (b)				
	H _{2,2'} (Py)	H _{3,3'} (Py)	H ₃ (pyraz)	H ₅ (pyraz)	H ₆ (pyraz)	H _{2,2'} (Py)	H _{3,3'} (Py)	H ₃ (pyraz)	H ₅ (pyraz)	H ₆ (pyraz)
1	8.50	7.51	-	-	-	9.03	7.33	-	-	-
2	-	-	9.06	8.71	8.64	-	-	9.55	9.21	8.26
3	8.58 ⁱ 8.52 ⁱⁱ	7.40 ⁱ 7.38 ⁱⁱ	-	-	-	9.03 ⁱ 8.98 ⁱⁱ	7.16 ⁱ 7.18 ⁱⁱ	-	-	-
4	8.58	7.60	-	-	-	9.03	7.33	-	-	-
5	8.58	7.58	-	-	-	9.01	7.31	-	-	-
6	8.59	7.61	-	-	-	9.01	7.33	-	-	-
7	8.54	7.60	-	-	-	9.03	7.38	-	-	-
8	8.76	8.18	-	-	-	8.93	7.37	-	-	-
9	-	-	9.03	8.70	8.62	-	-	9.49	9.18	8.26
10	-	-	9.17	8.75	8.68	-	-	9.45	9.08	8.20

The unambiguous assignment of pyrazine protons signals was performed in accordance with ref ¹⁶, considering the characteristic ¹H,¹H coupling behavior of monosubstituted pyrazines, ie ³J(H₅-H₆) > ⁵J(H₃-H₆) > ⁴J(H₃-H₅) ~ 0 Hz. i) rotamer 1, ii) rotamer 2.

For all synthesized complexes in this work, the ^{13}C NMR spectra confirm the presence of cyano ligands with two peaks around 173-175 ppm (CN_{ax}) and 178-180 ppm (CN_{eq}). This is in accordance with values already described for **1b**¹⁰ and for some other pentacyanoferrate complexes,¹⁵ with chemical shifts appearing upfield in the case of pyrazines compared to pyridine ligands. IR spectroscopy measurements were also consistent with reduced pentacyanoferrate(II) complexes, displaying two $\nu_{\text{C-N}}$ bands, a strong one between 2046 and 2058 cm^{-1} and the second one, as a shoulder, between 2088 and 2096 cm^{-1} and a $\nu_{\text{Fe}^{\text{II}}-\text{C}}$ band between 568 and 574 cm^{-1} . Similarly, the UV-Vis spectra showed for all complexes a band assigned to a metal-to-ligand charge transfer (MLCT) transition with an absorption maximum between 416 and 440 nm for complexes **1b** and **3b-8b** and between 474 and 498 nm for the pyrazine-derived complexes **2b**, **9b** and **10b**. These data indicate a strong interaction between the metal ion and the nitrogen atom of the pyridine/pyrazine ring. The bathochrome shielding in the case of pyrazine derivatives suggests a stronger interaction in this case, due to an increase in metal to ligand π back donation from pyridine ligands to pyrazine ones, as already described with some other pentacyanoferrate(II) complexes.¹⁵

Cyclic voltammograms were recorded for all complexes in a sodium trifluoroacetate buffer (50 mM, pH = 7.1), and disclosed a reversible behavior for the Fe(III)/Fe(II) couples. In the pyridine series, the $E_{1/2}$ values varied from 0.48 to 0.52 V/SHE for compounds **1b** and **3b-8b** (Table 2), which is consistent with reported values for **1b** and with an isonicotinamide-derived ligand bound to a pentacyanoferrate(II) complex.^{9,10} For pyrazine complexes **2b** and **9b-10b**, the $E_{1/2}$ potential values are slightly higher, ranging from 0.58 to 0.62 V/SHE, depicting a more difficult electrochemical oxidation than that for the pyridine complexes. The same study was also performed in a phosphate buffer solution (100 mM, pH 7.4) in order to compare the electrochemical data of the complexes to those already reported for the ligands.¹⁹ Comparable oxidation potential values were measured for the Fe(III)/Fe(II) couple in both aqueous media (Table 2) even if in some cases (compounds **4b**, **6b** and **10b**) the oxidation wave cannot be considered as reversible in phosphate buffer. In general the results show that the oxidation potential to convert iron(II) into iron(III) is much lower than that to oxidize the organic ligand, suggesting thus that it is easier to oxidize the complexes than the ligands alone.

The anodic oxidation peak value for the second oxidation wave, likely related to the non reversible ligand oxidation, was also measured for the hydrazide-derived complexes **1b**, **3b-6b** and **9b** in phosphate buffer and described in the Table 2. This value was either increased or

unchanged for the complexes compared to the corresponding ligands. It seems that iron complexation did not affect the ligand oxidation potential similarly for all compounds.

Table 2. Electrochemical data (GC electrode) in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) and in sodium trifluoroacetate (NaTFA) buffer (50 mM, pH 7.1). E_{a2} : Anodic oxidation peak value for the ligand moiety, second oxidation wave (V/NHE), $E_{1/2}$: iron oxidation potential value (Fe(III)/Fe(II) couple) (V/NHE).

Compound	In phosphate buffer		In NaTFA buffer
	Ligand (a)	Complex (b)	Complex (b)
1	$E_a = 1.01^a$	$E_{1/2} = 0.49$	$E_{1/2} = 0.52$
		$E_{a2} = 1.11$	
2	No oxidation wave ^b	nd	$E_{1/2} = 0.62$
3	$E_a = 1.25^a$	$E_{1/2} = 0.49$	$E_{1/2} = 0.52$
		$E_{a2} = 1.21$	
4	$E_a = 0.84^a$	$E_{1/2}$ non-reversible	$E_{1/2} = 0.48$
		$E_{a2} = 1.27$	
5	$E_a = 1.21^a$	$E_{1/2} = 0.50$	$E_{1/2} = 0.48$
		$E_{a2} = 1.29$	
6	$E_a = 0.93^a$	$E_{1/2}$ non-reversible	$E_{1/2} = 0.53$
		E_{a2} too weak	
7	No oxidation wave ^b	Nd	$E_{1/2} = 0.53$
8	No oxidation wave ^b	Nd	$E_{1/2} = 0.51$
9	$E_a = 0.82^a$	$E_{1/2} = 0.64$	$E_{1/2} = 0.58$
		$E_{a2} = 1.11$	
10	No oxidation wave ^b	Nd	$E_{1/2} = 0.62$

a. From ref ¹⁹. b. No oxidation wave observed for this compound. nd. Not determined. Standard deviations did not exceed 0.07 V/NHE.

Iron(II) complexes oxidation followed by ESR

Firstly, the generation of radicals from iron(II) complexes in the presence of a stoichiometric amount of hydrogen peroxide was monitored by ESR in the presence of the PBN spin trap, a well-known trap for carbon-centered radicals.

The oxidation of **1b** by hydrogen peroxide in the presence of PBN resulted in the formation of a complex ESR signal mainly consisting of a six-line spectrum showing a g-value of 2.006 and apparent hyperfine splitting constants of $a_N = 15.5 - 15.6$ G and $a_H = 4.5 - 4.6$ G (Table 3 and Figure 1b), as well as a second six-line signal of lower intensity. The major signal was already described by Sousa *et al.* in the same conditions, and was assigned to a carbon-based radical trapped by PBN, very likely the acyl radical of the isoniazid-Fe^{II}(CN)₅ complex.¹³

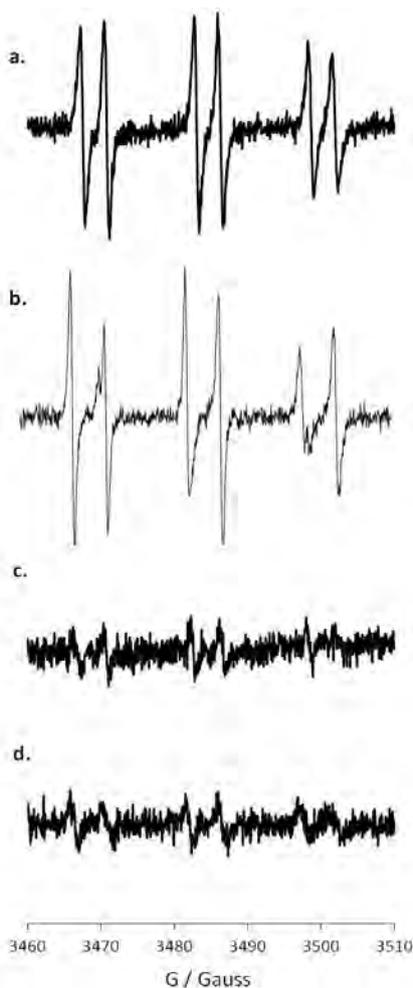


Figure 1. ESR signals for PBN-spin trap experiments. **a)** Mixture of **1a** (5.1 mM), Mn(III) pyrophosphate (4.1 mM) and PBN (20.4 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). **b)** Mixture of **1b** (5 mM), H₂O₂ (5 mM) and PBN (20 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). **c)** Mixture of **9a** (5.1 mM), Mn(III) pyrophosphate (4.1 mM) and PBN (20.4 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). **d)** Mixture of **9b** (5 mM), H₂O₂ (5 mM) and PBN (20 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). The vertical scale was kept identical for all spectra.

A simulation of this experimental spectrum (Figure 2) confirmed the presence of two different trapped radical, displaying calculated hyperfine splitting constants of 15.5 G and 4.5 G for the major one (in a proportion of 80%, g -value = 2.006) and of 15.5 G and 3.6 G for the minor one (20%, g -value = 2.006). Calculated values for the minor signal are in accordance with the ESR signal observed for the oxidation of INH **1a** by manganese(III) pyrophosphate (Figure 1a) or by potassium hexacyanoferrate(III) (data not shown) that both led to a six-line spectrum with hyperfine splitting constants of $a_N = 15.5 - 15.8$ G and $a_H = 3.2 - 3.6$ G for a g -

value of 2.006 that we assigned to the trapping, by PBN, of the isonicotinoyl radical. This assignment could be supported by an alike oxidation process of INH in the presence of NAD^+ with potassium hexacyanoferrate(III), when the same radical was formed, or with manganese(III) pyrophosphate that led to the well characterized isonicotinoyl-NAD adduct. Thus the minor species observed for the oxidation of **1b** by H_2O_2 probably results from the decomplexation of the major one.

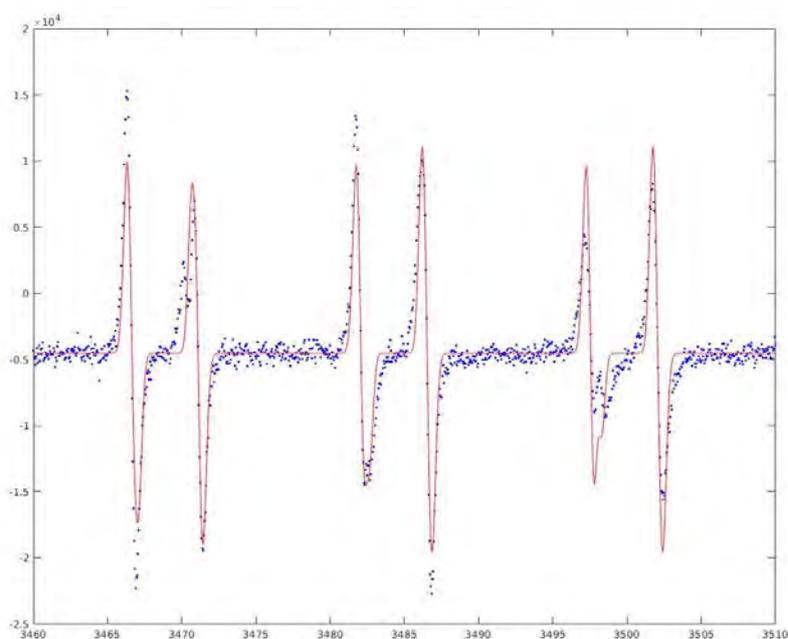


Figure 2. ESR signal for PBN-spin trap experiments for a mixture of **1b** (5 mM), H_2O_2 (5 mM) and PBN (20 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4) (blue dots) and simulation for two trapped species (red line). Rmsd for best fit = 0.073059, component A: $g = 2.006156$ G, $a_{\text{N}} = 15.5$ G and $a_{\text{H}} = 4.5$ G, weight = 1.169176 and component B: $g = 2.006106$, $a_{\text{N}} = 15.5$ G and $a_{\text{H}} = 3.6$ G, weight = 0.2476254).

A similar behavior was also observed in the case of pyrazine-2-carbohydrazides **9a** and **9b**, although the signals were significantly less intense than in the case of **1a/1b** (Figure 1c-d). Thus, the oxidation of **9b** by hydrogen peroxide led to a six-line ESR spectrum ($g = 2.006$, $a_{\text{N}} = 15.5$ G and $a_{\text{H}} = 4.5$ G) whereas the oxidation of **9a** by manganese(III) pyrophosphate provided a comparable spectrum but with different hyperfine splitting constant values ($g = 2.006$, $a_{\text{N}} = 15.9 - 16.0$ G and $a_{\text{H}} = 4.0$ G). By analogy to **1a/1b**, these species are likely assignable to pyrazinoyl radicals either free (**9a**) or complexed to the pentacyanoferrate moiety (**9b**) (Table 3).

In order to verify if the intramolecular metal redox process was dependent of the hydrazide function, the analogues of **1b** and **9b**, respectively **7b** and **2b**, in which the redox active hydrazide group was replaced by an amide (isonicotinamide **7a** and pyrazinamide **2a** as ligands), and also the corresponding iron(II)-isonicotinoic acid and iron(II)-pyrazinoic acid complexes **8b** and **10b** were also investigated in the presence of hydrogen peroxide and PBN. Resulting ESR spectra did not show any detectable signal (Table 3), confirming the essential role of the hydrazide function in the radical generation.

The next step was then to study the oxidation of substituted hydrazide-iron(II) complexes. When hydrazide-iron(II) complexes **3b**, **4b** and **5b**, substituted by one or two methyl groups in either proximal- or distal-nitrogen of the pyridine ring, were oxidized by H_2O_2 , they produced a ESR spectra different from that of **1b** but rigorously the same among them, a six-line signal showing a g -value of 2.006 and apparent hyperfine splitting constants of $a_N = 16.5$ G and $a_H = 3.5 - 3.6$ G (Table 2 and Figure 3a-b). Moreover, the corresponding ligands **3a**, **4a** and **5a** oxidized by manganese(III) pyrophosphate in the presence of PBN led to identical spectra as complexes **3b**, **4b** and **5b**, suggesting that the trapped radical is independent of the metal fragment. Altogether, these results indicated that the radical trapped was due to the formation of a methyl radical-PBN adduct. Furthermore these values are a close match of the signal that we observed for the generation of a methyl radical from methylhydrazine auto-oxidation in presence of copper(II) chloride²⁰⁻²¹ and its trapping by PBN ($g = 2.006$, $a_N = 16.2$ G, $a_H = 3.7$ G), confirming the methyl-PBN adduct detection (Figure 3c).

Similarly, oxidation of **6a** and **6b** led to a single radical species trapped by PBN with a very intense six-line ESR spectrum ($g = 2.006$, $a_N = 16.3 - 16.4$ G and $a_H = 2.4 - 2.5$ G) that was assigned to the isopropyl-PBN adduct (Table 3 and Figure 4a-b). Indeed a control experiment in which isopropylhydrazine was treated with copper(II) ions in the presence of PBN²² resulted in the trapping of two PBN adducts, the first one ($g_1 = 2.006$, $a_{N1} = 16.5$ G and $a_{H1} = 4.6$ G) decreasing over time in favor of the second one ($g_2 = 2.006$, $a_{N2} = 15.8$ G and $a_{H2} = 2.6$ G), that became predominant after 40 minutes, probably resulting from the migration of the radical on the propyl chain (Figure 4c-e). Since the second trapped species had values close to those observed in **6a/6b** oxidation, this experiment confirmed therefore the generation of an alkyl radical during the oxidation of aroylhydrazides substituted by an alkyl group, either as free ligands or as iron(II) complexes.

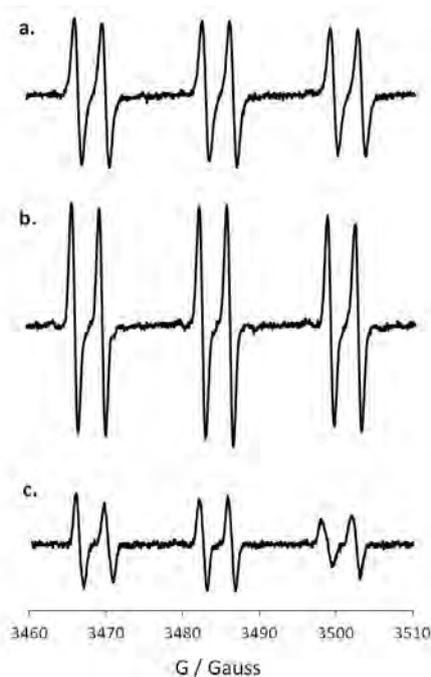


Figure 3. ESR signals for PBN-spin trap experiments. **a)** Mixture of **4a** (5.1 mM), Mn(III) pyrophosphate (4.1 mM) and PBN (20.4 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). **b)** Mixture of **4b** (5 mM), H₂O₂ (5 mM) and PBN (20 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). **c)** Mixture of methylhydrazine (1 mM), CuCl₂ (0.01 mM) and PBN (46.5 mM) in Na₂CO₃ buffer (50 mM, pH 10). The vertical scale was kept identical for all spectra.

Table 3. Hyperfine coupling constants for spin trapped adducts resulting from ligands and complexes oxidation by manganese(III) pyrophosphate (0.8 equivalents) and hydrogen peroxide (1 equivalent), respectively, in the presence of PBN spin trap (4 equivalents).

Compound	Hyperfine coupling constant (G)		Proposition for trapped radical	
	Ligand (a)	Complex (b)	Ligand (a)	Complex (b)
1	a _N = 15.5-15.8 a _H = 3.2-3.6	a _N = 15.5-15.6 a _H = 4.5-4.6	4-pyridyl-C(=O)	[Fe ^{II} (CN) ₅ (4-pyridyl-C(=O))] ³⁻ a
2	-	-	-	-
3	a _N = 16.5 a _H = 3.5	a _N = 16.4 a _H = 3.5	Methyl	methyl
4	a _N = 16.4 a _H = 3.5	a _N = 16.5 a _H = 3.5	Methyl	methyl
5	a _N = 16.5 a _H = 3.6	a _N = 16.5 a _H = 3.6	Methyl	methyl
6	a _N = 16.3 a _H = 2.5	a _N = 16.4 a _H = 2.4	Isopropyl	isopropyl
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	a _N = 15.9-16.0 a _H = 4.0	a _N = 15.5 a _H = 4.5	2-pyrazyl-C(=O)	[Fe ^{II} (CN) ₅ (2-pyrazyl-C(=O))] ³⁻
10	-	-	-	-

a. From ref¹³

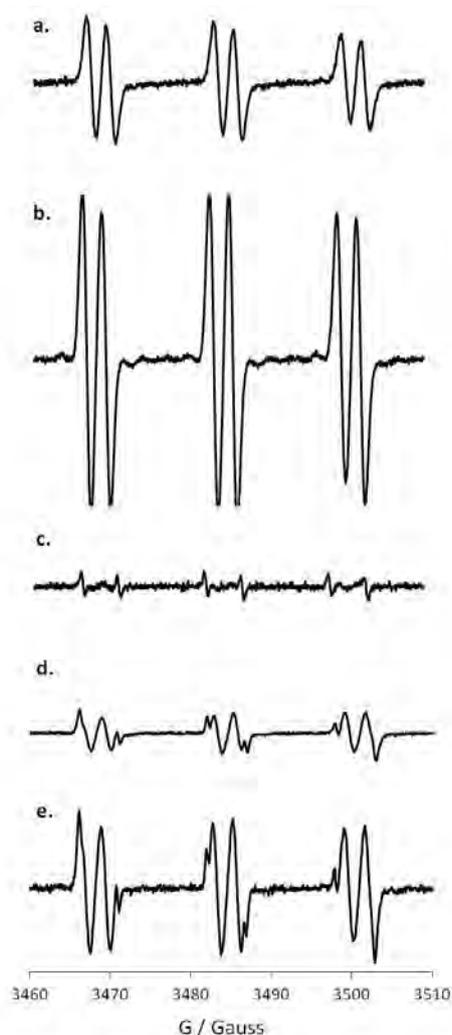


Figure 4. ESR signals for PBN-spin trap experiments. **a)** Mixture of **6a** (5.1 mM), Mn(III) pyrophosphate (4.1 mM) and PBN (20.4 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). **b)** Mixture of **6b** (5 mM), H₂O₂ (5 mM) and PBN (20 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). **c)** Mixture of isopropylhydrazine (1 mM), CuCl₂ (0.01 mM) and PBN (46.5 mM) in Na₂CO₃ buffer (50 mM, pH 10) after 1 min of reaction, **d)** after 20 min of reaction, **e)** after 40 min of reaction. The vertical scale was kept identical for all spectra.

Iron(II) complexes oxidation followed by LC-MS :

Complexes oxidation by hydrogen peroxide was also monitored by HPLC coupled to mass spectrometry in order to study in more details the formation of the resulting metabolites. Due to the high polarity of the pentacyanoferrate complexes,¹⁰ DMSO was added to the system before HPLC injection, inducing the substitution of the *N*-heterocyclic ligand by DMSO and allowing the study of the released organic molecule on a C₁₈ reverse phase column.¹³ The metabolites were identified in HPLC by comparison with authentic standards and mass

spectrometry was used for confirmation. As observed in the case of the pentacyano(isoniazid)ferrate(II) complex **1b**,¹³ the reaction of H₂O₂ (1 equiv.) with other complexes composed of a substituted isonicotinoic hydrazide ligand (**4b-6b**) generated, after DMSO decomplexation, the isonicotinoic acid **8a** (Rt = 4.0 min) as major compound along with, as minor compound, the amide **7a** (Rt = 10.9 min). In the case of **3b** oxidation, beyond isonicotinoic acid (**8a**) formation as main metabolite, the *N*-methylisonicotinamide (Rt = 13.7 min, *m/z* = 137.0 ([M+H]⁺)), was also observed. The existence of this latter metabolite suggests that a N-N bond cleavage is involved. In all cases, the reaction is almost complete in two or three hours, showing only traces of hydrazide ligand in solution. Similarly, the oxidation of the pyrazine-2-carbohydrazide pentacyanoferrate complex **9b** followed by DMSO addition led to the release of the corresponding acid **10a** (Rt = 3.8 min, major compound) and amide **2a** (Rt = 11.3 min, traces) as metabolites.

As expected, non-redox active ligands **2a**, **7a-8a** and **10a** were recovered unchanged after oxidation of the corresponding complexes **2b**, **7b-8b** and **10b** by H₂O₂ (2 hours) followed by DMSO decomplexation. This suggests that these ligands are not able to accept intramolecular electron transfer from the metallic center upon iron(II) oxidation by hydrogen peroxide.

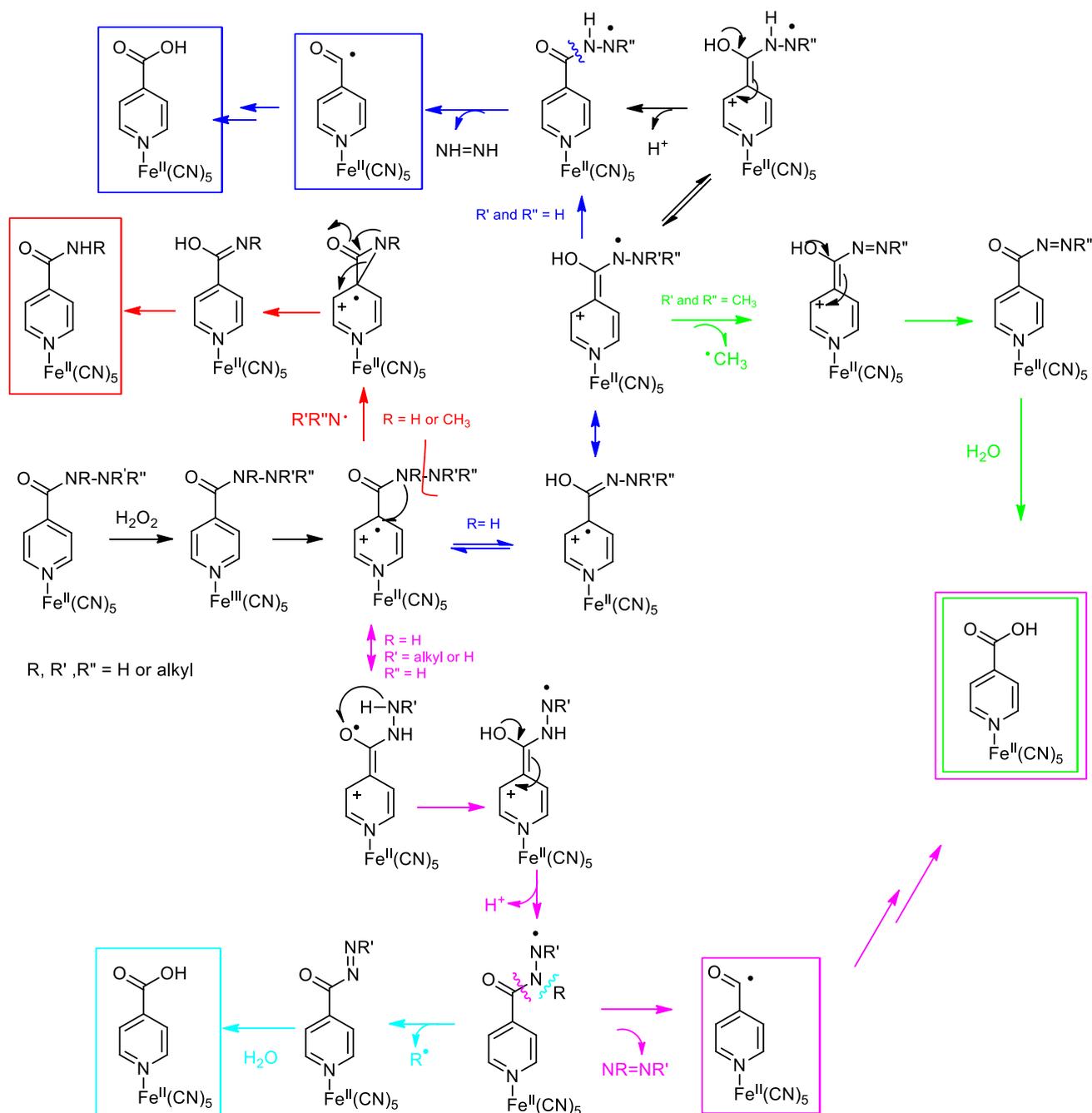
Furthermore, the identification in ESR experiment of the aroyl radical of the isoniazid-pentacyanoferrate(II) complex encouraged us to study the formation of **1b**-NAD (or INH-NAD) adducts. Indeed, the active metabolite of INH is the INH-NAD adduct resulting from the oxidation of INH by KatG enzyme⁴ or by a biomimetic chemical system such as manganese(III) pyrophosphate²³⁻²⁴ leading to an aroyl radical and its reaction with the NAD(H) cofactor. We thus tried to identify similar adducts in the case of the isoniazid-pentacyanoferrate(II) complex **1b**. The reaction of **1b** with 1 equivalent of H₂O₂ in the presence of NAD⁺ (1 to 10 equivalents) was analyzed after DMSO substitution at different reaction times (from 5 minutes to 2 h 30 of reaction). INH-NAD adducts were observed in the reaction mixture, identical to the one generated by the oxidation of INH by manganese(III) pyrophosphate in the presence of NAD⁺. The chromatographic and spectral evidence (LC-MS) that INH-NAD adduct can be formed from **1b**, even though in small amount in these conditions, supports the idea that complex **1b** can act by a similar mechanism as INH, inhibiting InhA through the INH-NAD adduct formation.

Mechanism

The oxidation of the iron(II) complexes by H₂O₂ can be understood by a mechanism involving first an oxidation step of the metal atom followed by oxidation of the organic

moiety via an intramolecular electron transfer redox process, leading to aroyl or alkyl radical formation (Scheme 3). Firstly, in the presence of H_2O_2 , Fe(II) is oxidized to Fe(III) and then the latter is able to oxidize the hydrazide function by a redox process involving an intramolecular electron transfer. Thus, Fe(III) is reduced to Fe(II), abstracting one electron of the aromatic cycle, which becomes electron deficient (cation radical) upon oxidation. Through delocalization of electrons, the single electron can be located in different positions leading to different pathways, which will yield different metabolites. When the radical is located on the ipso position, it can induce a N-N bond cleavage to give an unstable aziridone-type compound that rearranges to yield the *N*-methyl amide metabolite observed in the case of **3b** oxidation (Scheme 3, red pathway). Isonicotinamide complex (**7b**) can also be formed by this pathway from complexes **1b** and **4b-6b**. The single radical can also be positioned upon proximal nitrogen or distal nitrogen, in these cases alkyl (for *N*-substituted hydrazide complex) and isonicotinoyl radicals (for **1b**) could be formed respectively (Scheme 3, green and blue pathways). By analogy with INH, it was proposed that the latter can be transformed into the acid complex **8b**. Finally, the single radical can also be located upon oxygen atom and be implicated in the formation of the isonicotinoyl radical and also that of methyl radical arisen from CH_3 -*N*-proximal bond cleavage (Scheme 3, light blue and pink pathways). These two latter pathways also lead to acid **8b**.

This mechanistic proposition allows explaining all radical species formation and also that of the acid **8b** and amide **7b** as final oxidation products.



Scheme 3. Mechanistic proposition for activation of isoniazid–iron(II) complexes by action of H_2O_2 .

Conclusion:

In this work, we synthesized and characterized a series of new INH analogues-iron(II) complexes. Oxidation experiments followed by EPR and LC-MS techniques prove that hydrazide-iron(II) complexes **1b**, **3b-6b** and **9b** can be activated by intramolecular electron-transfer processes and generate diverse metabolites. Thus, oxidation of these complexes lead to the formation of carboxylic acid (as major metabolite) and amide derivatives, whereas for

carboxylic acid-iron(II) or amide-iron(II) derived complexes **2b**, **7b**, **8b** and **10b**, oxidation did not lead to ligand modification. Concerning hydrazide-iron(II) complexes oxidation, ESR experiments show that only non-substituted hydrazide-iron(II) complexes **1b** and **9b** can generate aroyl or pyrazinoyl radicals, free or complexed to the pentacyanoferrate moiety. Since the aroyl radical plays a crucial role in INH activation that leads to the active metabolite formation (the INH-NADH adduct), the generation of a similar radical through **1b** oxidation is a good evidence that active metabolite could be generated by an oxidative pathway. Thus, the oxidation of complex **1b** in the presence of NAD⁺ cofactor and H₂O₂ was investigated by LC-MS after decomplexation with DMSO. Although only a small amount of INH-NAD adduct was identified by LC-MS, this result proves that INH-NADH adduct can be formed during complex **1b** oxidation. The INH-iron(II) complex IQG-607, known to have an antitubercular activity, could thus act with the same mechanism of action as INH.

Experimental procedures:

General:

All solvents and commercially available reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification, including isoniazid (INH, **1a**), pyrazinamide (PZA, **2a**), pyridine-4-carboxamide (**7a**), pyridine-4-carboxylic acid (**8a**) and pyrazine-2-carboxylic acid (**10a**). Acetonitrile and methanol were of chromatographic grade and water used in the experiments was ultra-purified using a Milli-Q system (Millipore). ¹H spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 400 and 500 MHz using D₂O as solvent. ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 100 and 126 MHz. ¹⁵N NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 50.7 MHz. Electrospray mass spectra (ESI) were obtained on a Perkin-Elmer SCIEX API 365 instrument and desorption chemical ionization (DCI) mass spectra were acquired on a Finnigan TQS 7000 spectrometer. Infra-red spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum One spectrometer. UV-Vis spectra were recorded on a Biochrom Libra S50 spectrophotometer. Non commercial hydrazides **3a-7a** and **9a** were synthesized according to Laborde *at al.*¹⁹ Na₃[Fe^{II}(CN)₅(NH₃)]·3H₂O and IQG607 (**1b**) were prepared as previously described.^{10,25} KHSO₅ (Oxone®) is the triple salt (2 KHSO₅, KHSO₄ and K₂SO₄) purchased from Aldrich. Manganese pyrophosphate (Mn^{III} pyrophosphate) was synthesized as previously described.²³

Synthesis:

General protocol for the synthesis of iron(II) complexes:

To a solution of $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1 eq.) in water (2 mL) was slowly added a solution of the required ligand (1 or 2 eq.) in water (2 mL). The mixture, which became red upon addition of the ligand, was stirred at room temperature, in the dark, for 3 hours. It was then added dropwise to 200 mL of a cold solution of ethanol containing an excess of sodium iodide. The resulting precipitate was stand overnight at 4 °C before to be collected by filtration, washed with cold ethanol and dried in a vacuum desiccator. CAUTION: As the complex is light- and oxygen-sensitive, it must be stored in a vacuum desiccator protected from light.

 $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{pyrazinamide})]$ (2b)

From $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.20 g, 0.61 mmol) and pyrazinamide 2a (0.15 g, 1.23 mmol). Quantitative yield (0.26 g), red solid. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 9.55 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 9.21 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 8.26 (dd, $J = 3.2$ and 1.2 Hz, 1H). ^{13}C NMR (105 MHz, D_2O) δ (ppm): 177.8 (CN_{eq}), 172.6 (CN_{ax}), 167.6 (Cq), 155.1 (CH), 151.1 (CH), 142.5 (Cq), 142.0 (CH). Anal. calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{FeN}_8\text{ONa}_3 \cdot 4.4 \text{H}_2\text{O}$: C, 26.26; H, 3.04; N, 24.50. Found: C, 26.32; H, 2.61; N, 24.10. IR (KBr) $\sqrt{(\text{cm}^{-1})}$: 3551, 2094, 2055, 1674, 1628, 1588, 1515, 1438, 1385, 1172, 1027, 626, 566. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 498 (4015). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2} = 0.62$ V/NHE. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.62$ V/NHE.

 $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(N\text{-methylpyridine-4-carbohydrazide})]$ (3b)

From $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.25 g, 0.77 mmol) and *N*-methylpyridine-4-carbohydrazide 3a (0.23 g, 1.54 mmol). Yield 85% (0.30 g), brown solid. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) Mixture of two rotamers in a 50 : 50 ratio, δ (ppm): Rotamer 1: 9.03 (dd, $J = 1.7$ Hz and 5.1 Hz, 2H), 7.16 (m, 2H), 3.10 (s, 3H); Rotamer 2: 8.98 (dd, $J = 1.7$ Hz and 5.1 Hz, 2H), 7.18 (m, 2H), 3.25 (s, 3H). ^{13}C NMR (105 MHz, D_2O) Mixture of two rotamers, δ (ppm): 180.1 (CN_{eq}), 179.8 (CN_{eq}), 175.4 (CN_{ax}), 175.2 (CN_{ax}), 171.4 (Cq), 167.6 (Cq), 157.1 (CH), 156.6 (CH), 142.3 (Cq), 140.8 (Cq), 120.9 (CH), 120.6 (CH), 39.6 (CH_3), 38.2 (CH_3). Anal. calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{FeN}_8\text{ONa}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O} \cdot 0.5 \text{EtOH}$: C, 32.31; H, 3.75; N, 23.19. Found: C, 32.11; H, 3.22; N, 22.65. IR (KBr) $\sqrt{(\text{cm}^{-1})}$: 3412, 2092, 2050, 1637, 1618, 1601, 1585, 1540, 1482, 1413, 1235, 1083, 917, 849, 703, 653, 571, 470. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 416 (3800). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2} = 0.49$ V/NHE. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.52$ V/NHE.

Na₃[Fe^{II}(CN)₅(*N'*-methylpyridine-4-carbohydrazide)] (4b)

From Na₃[Fe^{II}(CN)₅(NH₃)]·3H₂O (0.20 g, 0.62 mmol) and *N'*-methylpyridine-4-carbohydrazide 4a (0.19 g, 1.24 mmol). Yield 94% (0.26 g), orange solid. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 9.03 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.58 (s, 3H). ¹³C NMR (105 MHz, D₂O) δ (ppm): 179.6 (CN_{eq}), 175.1 (CN_{ax}), 166.5 (Cq); 157.3 (CH); 139.0 (Cq); 121.5 (CH); 37.3 (CH₃). Anal. calcd. for C₁₂H₉FeN₈ONa₃ · 3.05 H₂O · 0.25 EtOH: C, 31.77; H, 3.54; N, 23.71. Found: C, 32.07; H, 3.05; N, 23.24. IR (KBr) $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3549, 3477, 3414, 2088, 2046, 1638, 1617, 1549, 1384, 851, 618, 574, 477. UV-Vis (H₂O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 439 (4060). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2}$ non-reversible. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.57 \text{ V/NHE}$

Na₃[Fe^{II}(CN)₅(*N'*-*N'*-dimethylpyridine-4-carbohydrazide)] (5b)

From Na₃[Fe^{II}(CN)₅(NH₃)]·3H₂O (0.25 g, 0.77 mmol) and *N'*-*N'*-dimethylpyridine-4-carbohydrazide 5a (0.25 g, 1.54 mmol). Yield 90% (0.33 g), red solid. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 9.01 (dd, *J* = 1.7 Hz and 5.1 Hz, 2H), 7.31 (dd, *J* = 1.7 Hz and 5.1 Hz, 2H), 2.59 (s, 6H). ¹³C NMR (105 MHz, D₂O) δ (ppm): 179.8 (CN_{eq}), 175.1 (CN_{ax}), 166.4 (Cq); 157.2 (CH); 139.4 (Cq); 120.4 (CH); 46.0 (CH₃). Anal. calcd. for C₁₃H₁₁FeN₈ONa₃ · 1.8 H₂O: C, 34.50; H, 3.25; N, 24.76. Found: C, 34.79; H, 2.88; N, 24.41. IR (KBr) $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3553, 3478, 3237, 2089, 2047, 1638, 1617, 1548, 1410, 1314, 1175, 1021, 925, 859, 622, 478. UV-Vis (H₂O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 437 (4150). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2} = 0.50 \text{ V/NHE}$. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.48 \text{ V/NHE}$.

Na₃[Fe^{II}(CN)₅(*N'*-(propan-2-yl)pyridine-4-carbohydrazide)] (6b)

From Na₃[Fe^{II}(CN)₅(NH₃)]·3H₂O (0.20 g, 0.61 mmol) and *N'*-(propan-2-yl)pyridine-4-carbohydrazide 6a (0.22 g, 1.22 mmol). Yield 84% (0.25 g), orange solid. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 9.01 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.14 (m, 1H), 1.02 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H). ¹³C NMR (105 MHz, D₂O) δ (ppm): 179.8 (CN_{eq}), 175.1 (CN_{ax}), 167.2 (Cq); 157.2 (CH); 139.0 (Cq); 120.3 (CH); 51.1 (CH); 19.4 (CH₃). IR (KBr) $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3547, 3468, 3416, 2974, 2089, 2048, 1638, 1618, 1551, 1412, 1384, 1304, 1128, 931, 851, 761, 617, 571, 478. UV-Vis (H₂O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 439 (4380). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2}$ non-reversible. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.53 \text{ V/NHE}$.

Na₃[Fe^{II}(CN)₅(pyridine-4-carboxamide)] (7b)

From $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.25 g, 0.77 mmol) and pyridine-4-carboxamide **7a** (0.19 g, 1.54 mmol). Yield 96% (0.32 g), orange solid. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 9.03 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (105 MHz, $\text{DMSO } d_6$) δ (ppm): 179.7 (CN_{eq}), 175.1 (CN_{ax}), 170.7 (Cq); 157.3 (CH); 139.5 (Cq); 120.5 (CH). Anal. calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{FeN}_8\text{ONa}_3 \cdot 3.75 \text{H}_2\text{O}$: C, 29.71; H, 3.06; N, 22.05. Found: C, 29.26; H, 2.60; N, 21.80. IR (KBr) $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3550, 3400, 3237, 2089, 2047, 1670, 1638, 1618, 1548, 1418, 1225, 1119, 857, 766, 622, 477. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 439 (4030). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2} = 0.51$ V/NHE. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.53$ V/NHE.

$\text{Na}_3\text{NH}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{pyridine-4-carboxylate})]$ (8b**)**

From $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.20 g, 0.61 mmol) and pyridine-4-carboxylic acid **8a** (0.07 g, 0.611 mmol) in 1 mL of a 2M NH_4OH solution. Yield 83% (0.22 g), yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (105 MHz, D_2O) δ (ppm): 180.1 (CN_{eq}), 175.8 (CN_{ax}), 173.2 (Cq); 156.9 (CH); 143.3 (Cq); 121.8 (CH). IR (KBr) $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3548, 3476, 3416, 2944, 1638, 1618, 1544, 1385, 1260, 1125, 780, 617, 570, 478. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 420nm (2710). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2} = 0.49$ V/NHE. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.51$ V/NHE.

$\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{pyrazine-2-carbohydrazide})]$ (9b**)**

From $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.20 g, 0.61 mmol) and pyrazine-2-carbohydrazide **9a** (0.17 g, 1.23 mmol). Yield 86% (0.23 g), purple solid. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 9.49 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 9.18 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 8.24 (dd, $J = 3.2$ and 1.1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (105 MHz, D_2O) δ (ppm): 177.8 (CN_{eq}), 172.5 (CN_{ax}), 163.9 (Cq); 155.1 (CH), 150.7 (CH), 142.3 (Cq), 142.0 (CH). Anal. calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{FeN}_9\text{ONa}_3 \cdot 2.55 \text{H}_2\text{O} \cdot 0.15 \text{EtOH}$: C, 27.74; H, 2.71; N, 28.27. Found: C, 28.02; H, 2.19; N, 27.74. IR (KBr) $\sqrt{\text{cm}^{-1}}$: 3451, 2096, 2058, 1686, 1625, 1584, 1531, 1402, 1215, 1101, 1057, 859, 743, 647, 568, 483. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 498 (4260). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2} = 0.63$ V/NHE. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.58$ V/NHE.

$\text{Na}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{pyrazine-2-carboxylate})]$ (10b**)**

From $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.10 g, 0.31 mmol, 1eq.) and pyrazine-2-carboxylic acid **10a** (0.04 g, 0.31 mmol, 1eq.) in 1mL of a 2M NH_4OH solution. Yield 92% (0.12 g), orange solid. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 9.45 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 9.08 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 8.20 (dd, $J = 3.2$ and 1.2 Hz, 1H). ^{13}C NMR (105 MHz, D_2O) δ (ppm): 178.2 (CN_{eq}), 173.3 (CN_{ax}), 170.4 (Cq), 153.4 (CH), 152.5 (CH), 146.5 (Cq), 141.8 (CH). Anal. calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_3\text{FeN}_7\text{O}_2\text{Na}_4 \cdot 3.55 \text{H}_2\text{O}$: C, 25.83; H, 2.19; N, 21.08. Found: C, 25.01; H, 1.96; N, 21.91. IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3552, 3478, 3413, 2048, 1638, 1618, 1518, 1412, 1386, 1267, 1190, 1167, 863, 796, 622, 477. UV-Vis (H_2O) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 474 (3110). Electrochemistry (Phosphate buffer pH 7.4) $E_{1/2}$ non-reversible. Electrochemistry (NaTFA buffer pH 7.1) $E_{1/2} = 0.62$ V/NHE.

HPLC/MS analyses:

HPLC/MS analyses were performed on an Agilent 1200 HPLC system equipped with an Agilent G1314B variable wavelength detector and coupled to an Agilent 6410-QQQ mass system with an electrospray ionization (ESI) source, or on a ACQUITY UPLC (Waters) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Xevo G2-Q Tof from Waters) or on a Alliance 2695 Waters HPLC system coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (MS Q-Tof Premier from Waters). The chromatographic column was an Eclipse XDB-C₁₈ column (5 μm , 4.6 x 150 mm) from Agilent. The eluting conditions consisted in a gradient of 10 mM NH_4OAc buffer pH 7.5 (solvent A) and acetonitrile (solvent B) with a flow rate of 0.5 mL min^{-1} , as follows: 0-20 min: linear gradient from 0 to 20% B; 20-22 min: linear gradient from 20 to 50% B; 22-26 min: isocratic at 50% B. Solvent B was then returned to 0% in 2 min and equilibration in the initial conditions was performed during 7 min before the next injection. UV detection was performed at 260 nm, and mass spectra acquisition was performed in positive mode (ESI (+)).

Electrochemistry:

Voltammetry measurements were carried out with a potentiostat Autolab PGSTATN302. Cyclic and square wave experiments were performed at room temperature in a homemade airtight three-electrode cell connected to a vacuum/argon line. The reference electrode consisted of a saturated calomel electrode (SCE) separated from the solution by a bridge compartment. The counter electrode was a platinum wire of 1 cm^2 apparent surface. The working electrode was a glassy carbon microdisk (1 mm diameter). Ligands **1a-10a** were analyzed as previously described.¹⁹ Complexes **1b-10b** were dissolved in 10 mL of a

phosphate buffer solution (100 mM, pH 7.4) or a sodium trifluoroacetate buffer solution (50 mM, pH 7.1) with a final concentration of 1 mM. Before each measurement, the solutions were degassed by bubbling argon and the working electrode was polished with a polishing machine (Presi P230). Experimental peak potentials have been measured versus SCE and converted to NHE by adding 0.241 V.

Spin trapping ESR analyses:

All ESR spectra were recorded at ambient temperature (ca. 291 K) on a Bruker Elexsys-II E500 (X-Band) spectrometer. The samples were transferred to a precision capillary (Hirschmann, Duran, Ringcaps, 50 μ L). The capillary was then placed inside a larger quartz tube so that the sample could be accurately and reproducibly positioned inside the resonator. All samples were prepared in 40 mM phosphate buffer pH 7.4, at 0 °C, by mixing appropriate amounts of studied compound and PBN dissolved in phosphate buffer. The reactions were initiated by the addition of the oxidant (Mn(III) pyrophosphate or H₂O₂ or K₃Fe(CN)₆). The first spectrum was recorded ca. 2 min after initiating the reactions. The following ESR instrument settings were used: modulation amplitude = 0.5 G, microwave power = 5.15 mW, attenuation of 16 dB with repeated number of 2 scans. Control experiments of auto-oxidation of methyl hydrazine and isopropylhydrazine were performed in a Na₂CO₃ buffer (50 mM, pH 10) at 0 °C by mixing appropriate amounts of alkylhydrazine and PBN and initiating the reactions by the addition copper(II) chloride.

References

- (1) http://www.who.int/gho/tb/epidemic/cases_deaths/en/index.html.
- (2) Mahajan, R. *Int. J. App. Basic Med. Res.* **2013**, *3*, 1.
- (3) Ryan, N. J.; Lo, J. H. *Drugs* **2014**, *74*, 1041.
- (4) Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H. R.; Jacobs, W. R.; Sacchetti, J. C. *Science* **1998**, *279*, 98.
- (5) Scior, T.; Meneses Morales, I.; Garcés Eisele, S. J.; Domeyer, D.; Laufer, S. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, *335*, 511.
- (6) Haas, W. H.; Schilke, K.; Brand, J.; Amthor, B.; Weyer, K.; Fourie, P. B.; Bretzel, G.; StichtGroh, V.; Bremer, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1601.
- (7) Johnsson, K.; Schultz, P. G. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 7425.
- (8) Mjos, K. D.; Orvig, C. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 4540.
- (9) Oliveira, J. S.; Sousa, E. H. S.; Basso, L. A.; Palaci, M.; Dietze, R.; Santos, D. S.; Moreira, I. S. *Chem. Commun.* **2004**, 312.
- (10) Sousa, E. H. S.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Diógenes, I. C. N.; Longhinotti, E.; França Lopes, L. G.; Sousa Moreira, Í. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 275.

- (11) Rodrigues, V. S.; dos Santos, A.; Santos, A. J.; Schneider, C. Z.; Calixto, J. B.; Sousa, E. H. S.; Lopes, L. G. D.; Souto, A. A.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Campos, M. M. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *40*, 182.
- (12) Rodrigues, V. S.; dos Santos, A. A.; Villela, A. D.; Belardinelli, J. M.; Morbidoni, H. R.; Basso, L. A.; Campos, M. M.; Santos, D. S. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, *43*, 82.
- (13) Sousa, E. H. S.; de Mesquita Vieira, F. G.; Butler, J. S.; Basso, L. A.; Santiago, D. S.; Diógenes, I. C. N.; Lopes, L. G. d. F.; Sadler, P. J. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *140*, 236.
- (14) Oliveira, J., S. ; Sousa, E., H. S. ; Souza, O., N. ; Moreira, I., S. ; Santos, D., S. ; Basso, L., A. *Current Pharmaceutical Design* **2006**, *12*, 2409.
- (15) Malin, J. M.; Schmidt, C. F.; Toma, H. E. *Inorg. Chem.* **1975**, *14*, 2924.
- (16) Holzer, W.; Eller, G. A.; Datterl, B.; Habicht, D. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 617.
- (17) Stadel, W.; Philipsborn, W. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 504.
- (18) Pazderski, L.; Pawlak, T.; Sitkowski, J.; Kozerski, L.; Szłyk, E. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 417.
- (19) Laborde, J.; Deraeve, C.; Lecoq, L.; Sournia-Saquet, A.; Stigliani, J.-L.; Orena, B. S.; Mori, G.; Pratviel, G.; Bernardes-Génisson, V. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 172.
- (20) Augusto, O.; de Montellano, P. R. O.; Quintanilha, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *101*, 1324.
- (21) Tomasi, A.; Albano, E.; Botti, B.; Vannini, V. *Toxicol. Pathol.* **1987**, *15*, 178.
- (22) Albano, E.; Tomasi, A.; Vannini, V.; Dianzani, M. U. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 381.
- (23) Nguyen, M.; Claparols, C.; Bernadou, J.; Meunier, B. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 877.
- (24) Nguyen, M.; Quemard, A.; Broussy, S.; Bernadou, J.; Meunier, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2137.
- (25) Basso, L. A.; Schneider, C. Z.; Santos, A. J. A. B. d.; Santos Jr, A. A. d.; Campos, M. M.; Souto, A. A.; Santos, D. S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1384.

Partie 2 : Mécanismes d'activation de l'isoniazide et de l'éthionamide

Partie 2 : Mécanismes d'activation de l'isoniazide et de l'éthionamide

Tout au long de ce travail de thèse, nous avons constaté que des informations concernant les mécanismes d'action des pro-drogues INH et ETH étaient manquantes, incomplètes ou encore mal compilées dans la littérature. Ainsi, la deuxième partie de cette thèse est consacrée à l'étude des mécanismes d'activation des pro-drogues INH et ETH. Même si ces molécules sont utilisées depuis plus de 60 ans dans le traitement de la tuberculose, leurs mécanismes d'activation d'un point de vue moléculaire sont très peu décrits.

Comme présenté dans l'introduction, ces deux pro-drogues ont la même cible, l'enzyme InhA, et des métabolites actifs similaires cependant l'étape d'activation de ces pro-drogues diffère. Au niveau mécanistique, l'hypothèse la plus retenue et discutée dans cette partie est que ces pro-drogues, une fois activées dans la mycobactérie, forment un radical aroyle ou équivalent. Ce radical peut ensuite se lier via une liaison covalente au cofacteur NAD, conduisant ainsi aux adduits INH-NADH et ETH-NADH, inhibiteurs ultimes de l'enzyme InhA.

Le but de ce travail est d'étudier d'un point de vue moléculaire le mécanisme d'activation de ces pro-drogues, en détaillant la formation des radicaux intermédiaires et des métabolites actifs et inactifs.

CHAPITRE I. Mécanisme d'activation de l'isoniazide

I.1. Mécanisme d'activation décrit dans la littérature

D'un point de vue général, le mécanisme d'activation habituellement décrit dans la littérature présente la formation du radical isonicotinoyle (**IV-1**) via l'oxydation de l'INH par l'enzyme KatG. La réaction de ce radical **IV-1** avec le cofacteur NAD conduit à la formation de l'adduit INH-NADH, métabolite actif (Schéma 26) et des métabolites non-actifs (Figure 38). Les métabolites non-actifs issus de cette réaction dans un système *in vitro* utilisant l'enzyme KatG sont l'acide isonicotinoïque (**IV-3**) (majoritaire), l'isonicotinamide (**IV-6**) et le 4-pyridine carboxaldéhyde (**IV-5**) (Figure 38) [243]. Cependant, dans un système *in vitro* utilisant la bactérie MTB, les métabolites non-actifs sont l'acide isonicotinoïque (**IV-3**) et le 4-pyridineméthanol (**IV-4**) (majoritaire) [304–306].

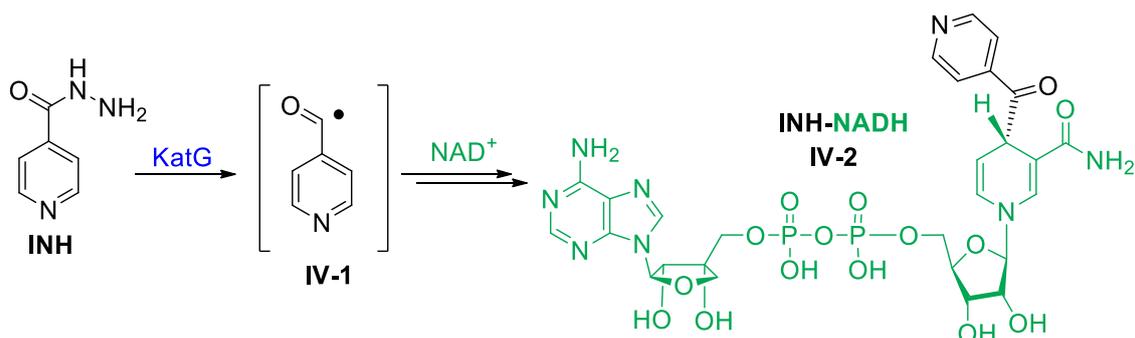


Schéma 26 : Mécanisme général de formation de l'adduit INH-NADH

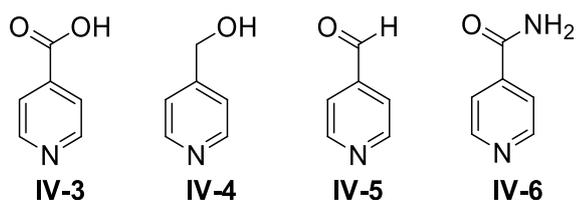


Figure 38 : Métabolites non-actifs possibles de l'INH

1.1.1. Le radical isonicotinoylé

L'hypothèse d'un intermédiaire radicalaire libre a été validée par des études RPE par l'équipe de Wengenack, en 2001, en utilisant l'enzyme KatG pour activer l'INH en présence d'un piègeur de radicaux, le PBN (*N-tert-butyl- α -phénylnitron*) (Figure 40) [62]. Les auteurs proposent alors trois radicaux possibles correspondant aux trois signaux de radicaux obtenus en RPE : les radicaux acyle (**IV-1**), acylperoxy (**IV-7**) et pyridyle (**IV-8**) (Figure 39). Malheureusement, la discrimination des différents adduits formés avec le PBN par les constantes de couplage hyperfines seules est difficile [307,308].

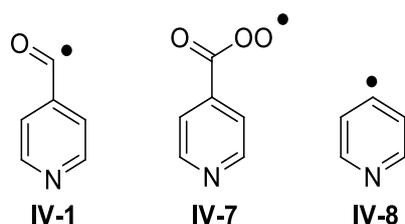


Figure 39 : Structures proposées pour les radicaux carbone-centrés observés en RPE

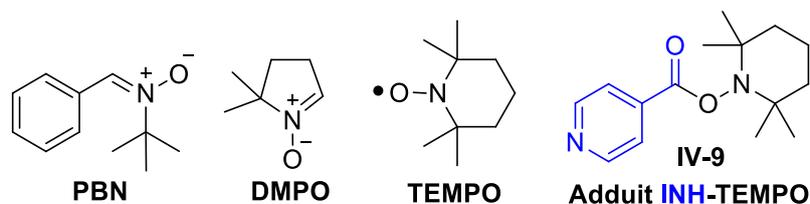


Figure 40 : Structures des piègeurs de radicaux PBN, DMPO et TEMPO et de l'adduit INH-TEMPO

Plusieurs autres études ont été réalisées en utilisant l'INH, l'enzyme KatG et le piègeur de radicaux DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxide), conduisant classiquement à des constantes de couplage hyperfines plus différenciées (Figure 40) [72,309,310]. Les structures détectées sont de types carbone centré (R•), alkoxy (RO•) et peroxy (ROO•), ce dernier résultant de la réaction d'un des deux premiers radicaux avec O₂.

Par ailleurs, la structure du radical isonicotinoyle (**IV-1**) a également été mise en évidence par réaction de l'INH avec différents oxydants chimiques (à base de manganèse ou de fer) et en présence du TEMPO (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl) comme piègeur de radicaux (Figure 40) [71]. Ainsi, le composé **IV-9**, correspondant au piégeage du radical isonicotinoyle (**IV-1**) par le TEMPO a été identifié par RMN, IR et spectrométrie de masse (Figure 40) [71].

Lors de l'activation de l'INH par l'enzyme KatG, la formation d'autres espèces radicalaires libres, de type diazényle, hydrazyle ou oxyde nitrique, a été aussi proposée et observée en RPE après piégeage des radicaux [55,72,308].

La formation du radical isonicotinoyle (**IV-1**) n'est pas très détaillée dans la littérature et trois intermédiaires sont proposés : i) l'hydrazyle **IV-10** avec le radical sur la position *N*-proximale [88,311] ii) l'hydrazyle **IV-11** avec le radical sur la position *N*-distale [62] et iii) le diimide **IV-12** [243] (Schéma 27). Aucune justification n'a été proposée pour la structure de l'intermédiaire entre l'INH et le radical isonicotinoyle (**IV-1**) puisqu'aucun de ces intermédiaires n'a été mis en évidence. D'autre part, aucune proposition mécanistique n'est faite pour expliquer le passage de ces intermédiaires vers le radical isonicotinoyle (**IV-1**).

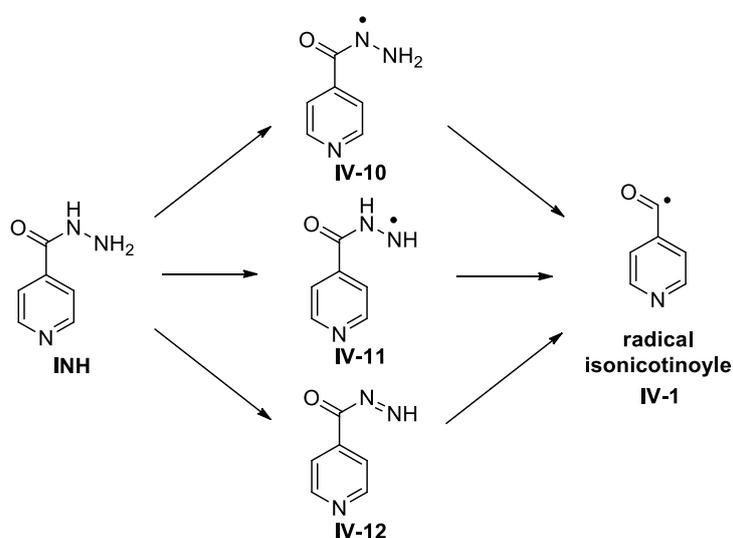


Schéma 27 : Intermédiaires proposés pour la formation du radical isonicotinoyle (**IV-1**).

1.1.2. Formation du métabolite actif

La structure du métabolite actif de l'INH, l'adduit INH-NADH (sous la forme (4*S*)-céto-carboxamide 1,4-dihydropyridine **IV-2**) a été élucidée en 1998 par diffraction des rayons X du complexe InhA-Inhibiteur cristallisé [73].

L'étape de formation de l'adduit INH-NADH via la réaction entre le radical isonicotinoylé (**IV-1**) et le cofacteur NAD⁺ est décrite dans le schéma ci-dessous (Schéma 28). L'utilisation du cofacteur NADH à la place de NAD⁺ génère exactement les mêmes adduits INH-NAD, le NADH étant oxydé en NAD⁺ dans un milieu réactionnel contenant l'enzyme KatG, l'enzyme InhA, du MnCl₂ et de l'INH [312]. La formation de l'intermédiaire INH-NAD⁺• a été confirmée par piégeage avec du TEMPO et par spectrométrie de masse [103]. L'étape finale de réduction de l'intermédiaire INH-NAD⁺• en INH-NADH peut faire intervenir le radical superoxyde O₂•⁻ (oxydé en O₂), composé formé lors du cycle catalytique de KatG ou généré par la réduction de O₂ catalysée par Mn²⁺ [101,103].

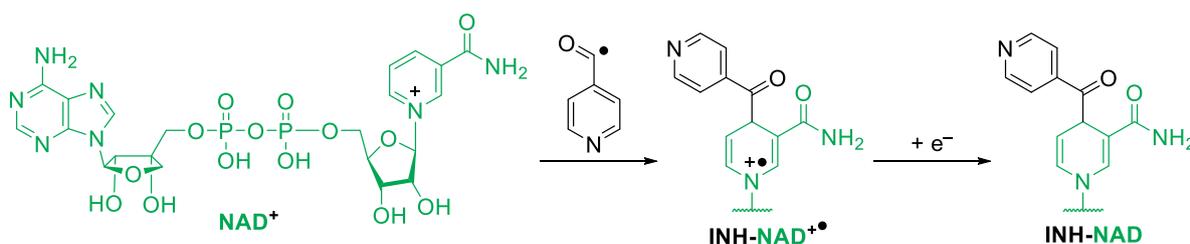


Schéma 28 : Réaction entre le NAD⁺ et le radical isonicotinoylé pour la formation des adduits INH-NAD.

Suite à l'activation de l'INH par l'enzyme KatG, l'adduit INH-NADH cristallisé dans l'enzyme InhA est sous la forme (4*S*)-céto-carboxamide 1,4-dihydropyridine **IV-2**, noté INH-NADH dans la littérature [73]. Cependant, les études *in vitro*, utilisant le manganèse(III) pour la formation des adduits INH-NAD, montrent qu'il existe plusieurs formes en solution (Figure 41) [76,312,313]. Les différents adduits observés sont des 1,4-dihydropyridines (**IV-2** ; **IV-14** - **IV-18**) ainsi que leurs formes oxydées pyridinium (**IV-19** - **IV-21**). Par ailleurs, ces structures 1,4-dihydropyridines coexistent sous deux formes tautomères : une forme ouverte (**IV-2** ; **IV-14** ; **IV-19**) et une forme fermée (**IV-15** - **IV-18** ; **IV-20** ; **IV-21**). Les formes ouvertes et les formes fermées sont en équilibre puisqu'elles résultent d'une cyclisation intramoléculaire avec transfert d'hydrogène. Par ailleurs, les structures pyridinium ont été isolées uniquement sous forme fermée [314].

Les travaux réalisés par notre groupe ont montré que les formes cycliques hémiamidales 1,4-dihydropyridines (4*S*-7*R* **IV-16** et 4*R*-7*S* **IV-17**) étaient majoritaires en solution [313]. Il

est possible de différencier les formes ouvertes (céto-carboxamide) des formes fermées (hémiamidal) par spectrométrie de masse puisque les formes fermées présentent un fragment **IV-22** $[M+H-H_2O]^+$ caractéristique de déshydratation (Figure 42).

Bien que tous les adduits INH-NAD soient présents en solution, seule la forme (4*S*)-céto-carboxamide 1,4-dihydropyridine **IV-2** a été cristallisée dans l'enzyme InhA [73]. D'autre part, une fois isolée, la forme cyclique hémiamidale 1,4-dihydropyridine 4*S*-7*R* **IV-16** semble exercer une activité inhibitrice vis-à-vis l'enzyme InhA comparable à celle du composé **IV-2** [76]. Les formes pyridinium d'adduits INH-NAD sont quant à elles inactives sur l'enzyme InhA [312].

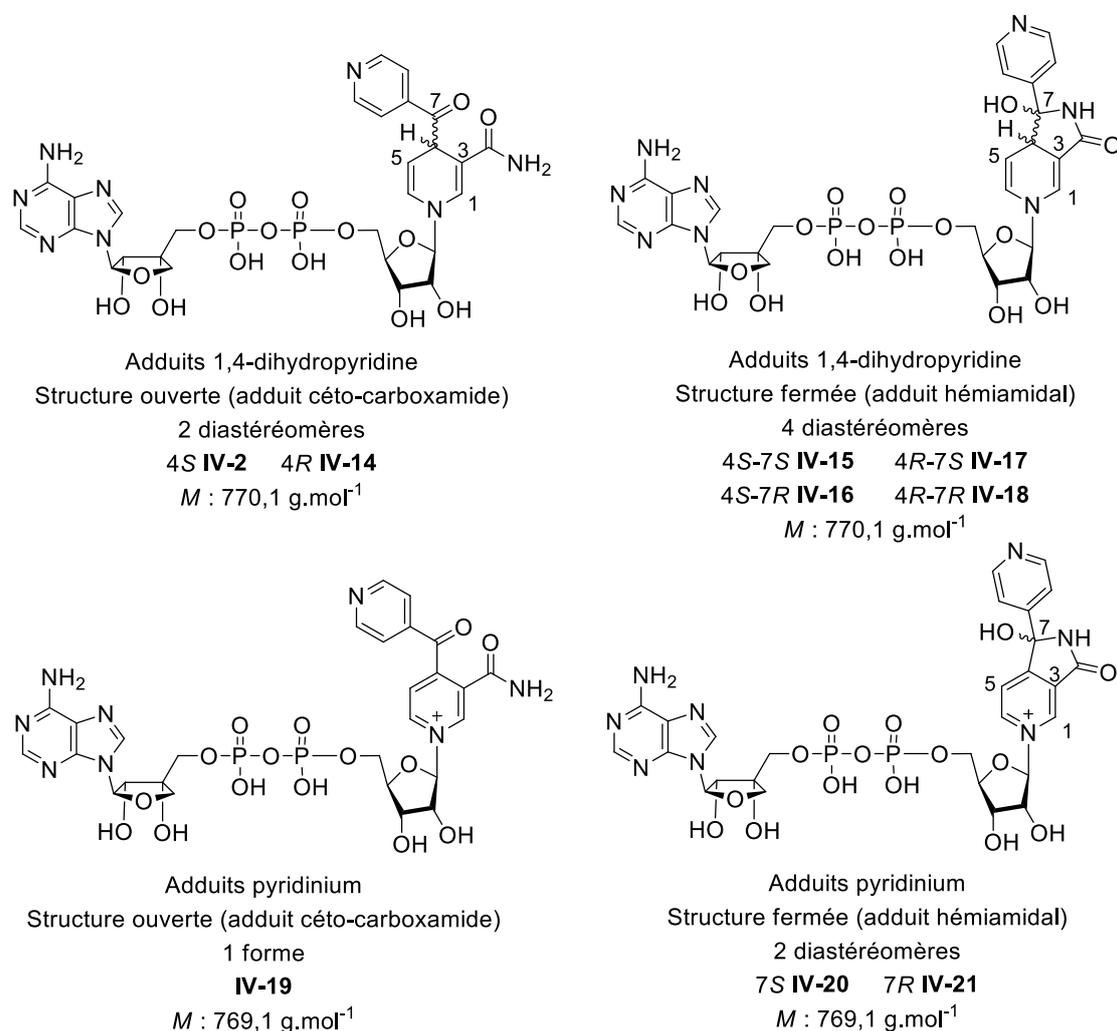


Figure 41 : Structures des adduits INH-NAD.

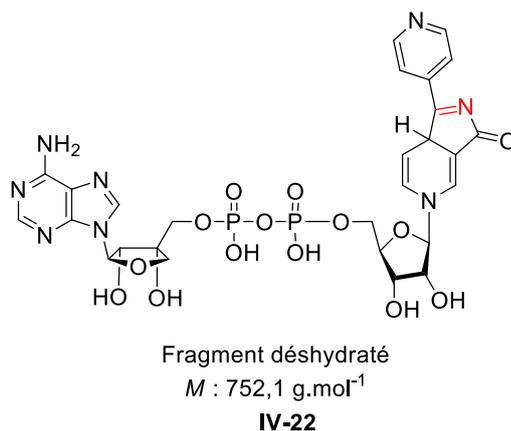


Figure 42 : Fragment déshydraté observé en spectrométrie de masse pour les structures fermées.

1.1.3. Formation des métabolites non-actifs

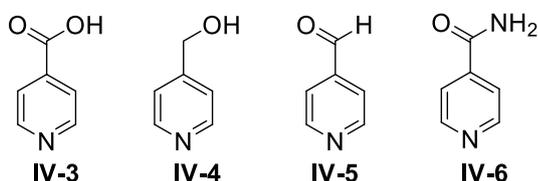


Figure 43 : Métabolites non-actifs de l'oxydation de INH.

Les travaux de J. Youatt, dans les années 1960, ont mis en évidence la formation des métabolites non-actifs de l'INH, *in vitro* dans MTB, comme étant l'acide isonicotinoïque (**IV-3**) et le 4-pyridineméthanol (**IV-4**) (majoritaire), certainement via l'intermédiaire 4-pyridine carboxaldéhyde (**IV-5**) [304–306]. Cependant, il est proposé que le 4-pyridineméthanol (**IV-4**) se forme à l'extérieur de la bactérie par action d'enzymes présentes dans le milieu.

En 1994, K. Johnsson et P. Schultz démontrent par une étude HPLC que l'oxydation de l'INH par l'enzyme KatG, *in vitro*, génère l'acide isonicotinoïque (**IV-3**) (majoritaire), l'isonicotinamide (**IV-6**) et le 4-pyridine carboxaldéhyde (**IV-5**) [243].

Formation de l'acide isonicotinoïque (**IV-3**)

La formation de l'acide isonicotinoïque (**IV-3**) est décrite selon trois voies différentes : l'oxydation du 4-pyridine carboxaldéhyde (**IV-5**) [243,305], la substitution nucléophile de l'intermédiaire diimide **IV-12** en milieu aqueux [246] ou la réaction entre le radical isonicotinoyle (**IV-1**) et le dioxygène O₂ suivie d'une réduction conduisant à la formation de l'acide isonicotinoïque (**IV-3**) [246].

Formation du 4-pyridineméthanol (IV-4)

La formation du métabolite 4-pyridineméthanol (**IV-4**) à l'extérieur de la bactérie s'explique par la réduction enzymatique du 4-pyridine carboxaldéhyde (**IV-5**), par des enzymes présentes dans le milieu, pour former le 4-pyridineméthanol (**IV-4**) [305].

Formation du 4-pyridine carboxaldéhyde (IV-5)

La formation du 4-pyridine carboxaldéhyde (**IV-5**) est possible par réduction du radical isonicotinoyle (**IV-1**) [313].

Formation de l'isonicotinamide (IV-6)

Pour la formation de l'isonicotinamide (**IV-6**), une expérience utilisant l'INH marquée à ^{15}N , au niveau de la portion hydrazine, a révélé que l'isonicotinamide (**IV-6**) formé était également marqué à l'azote ^{15}N . Ce résultat laisse penser que durant l'oxydation de l'INH, une espèce de type NH_3 est formée à partir de la coupure d'une liaison $N-N'$ [243,315]. En effet, le NH_3 peut alors réagir avec le radical isonicotinoyle (**IV-1**) ou avec l'intermédiaire diimide **IV-12** (par substitution nucléophile) pour former l'isonicotinamide (**IV-6**) [246,315,316].

Le schéma suivant résume les différentes possibilités pour l'obtention des métabolites issus de l'oxydation de l'INH (Schéma 29).

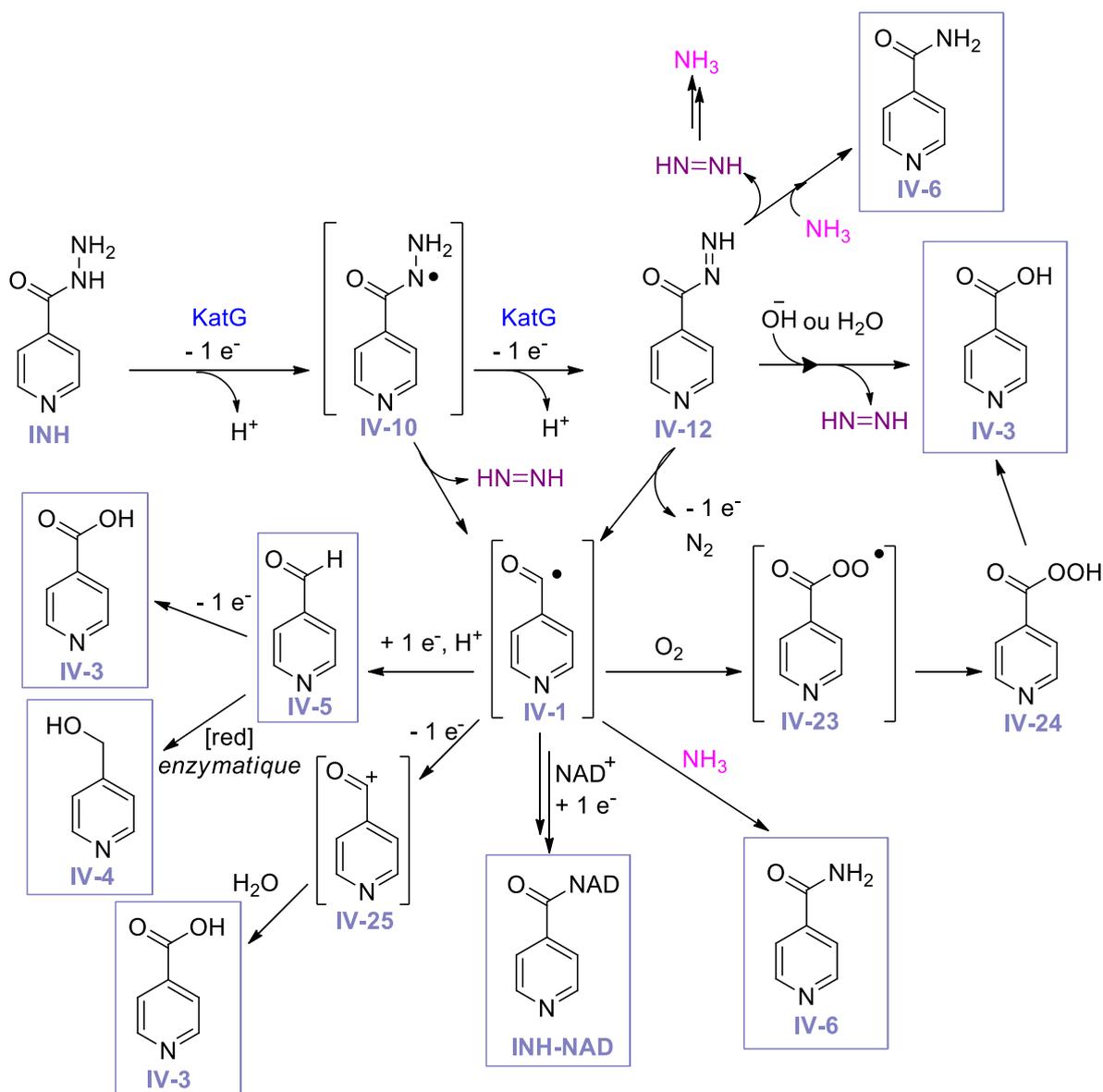


Schéma 29 : Mécanismes proposés pour la formation des différents métabolites de l'INH. Les métabolites encadrés ont été identifiés dans la littérature.

I.2. Mécanisme d'activation de l'INH d'un point de vue moléculaire

Afin de mieux comprendre au niveau moléculaire le mécanisme d'activation de l'INH et la formation du radical isonicotinoyl (IV-1), nous avons synthétisé une série d'analogues de l'INH présentant des substituants sur la partie hydrazide et nous avons étudié leur activation, en utilisant le système biomimétique chimique de la réaction d'oxydation catalysée par l'enzyme KatG.

Ce système biomimétique, développé dans notre équipe au début des années 2000, permet la formation des adduits INH-NAD par activation chimique [76,313,317,318]. Ce système utilise le pyrophosphate de manganèse (III) qui, en présence de INH et de NAD^+ ,

génère les adduits INH-NAD de manière non-enzymatique avec un rendement (estimé par HPLC) de 35 à 45 % pour la formation des adduits [313].

1.2.1. Article 1 : Chemistry Select, 2016, 1(2), 172-179, partie mécanistique

Bien que certaines études visent à comprendre le mécanisme de formation du radical isonicotinoyloxy (**IV-1**), la connaissance détaillée du mécanisme d'oxydation est encore assez limitée et confuse [62,71,310,311,319]. Dans la littérature, certains auteurs proposent que la réaction d'oxydation se produise d'abord sur l'azote proximal, par rapport au groupe carbonyle de l'INH (Composé **IV-10**, Schéma 30) [62]. D'autres postulent que le radical hydrazyle, formé après la première oxydation, peut résider sur l'atome d'azote distal (par rapport au groupe carbonyle) (Composé **IV-11**, Schéma 30) [88,311].

Les résultats concernant cette partie sont présentés dans l'article 1 : Chemistry Select, 2016, 1(2), 172-179, présenté dans la Partie 1.II de cette thèse (Page 110) [63]. Ci-dessous nous présentons un résumé de l'article 1 qui concerne uniquement les études sur la compréhension du mécanisme d'activation de l'INH.

Synthesis, oxidation potential and antimycobacterial activity of isoniazid and analogues: insights into the molecular isoniazid activation mechanism

Julie Laborde, Céline Deraeve, Léa Lecoq, Alix Sournia-Saquet, Jean-Luc Stigliani, Béatrice S. Orena, Giorgia Mori, Geneviève Pratviel and Vania Bernardes-Génisson.

ChemistrySelect, 2016, 1(2), 172-179

Résumé en français de l'article, partie mécanisme d'activation de l'INH :

Les études théoriques de l'énergie de dissociation de la liaison N-H (correspondant au changement d'enthalpie lors du clivage homolytique de la liaison N-H) et de la force de la liaison N-H ont été réalisées. Elles montrent que ces deux grandeurs sont plus faibles au niveau de la position proximale que de la position distale, laissant suggérer qu'il est plus facile d'oxyder la position proximale (radical plus stable) que la position distale. Cependant, la faible différence d'énergie (~5 Kcal) entre les positions proximale et distale ne permet pas d'exclure l'existence d'un équilibre entre les deux formes radicalaires.

Par ailleurs, l'étude théorique de l'énergie nécessaire à la voie A (une oxydation suivie d'une libération de diazène (HN=NH)) et à la voie B (trois oxydations successives et la libération de diazote (N₂)) démontre que la voie A est bien moins coûteuse en énergie.

Nous proposons donc que l'oxydation se fasse initialement sur l'azote proximal, formant le composé **IV-10** en équilibre (par migration d'électron célibataire) avec le composé **IV-11** qui, suite à un clivage homolytique, libère le radical isonicotinoylé (**IV-1**) et du diazène (Schéma 30, route A).

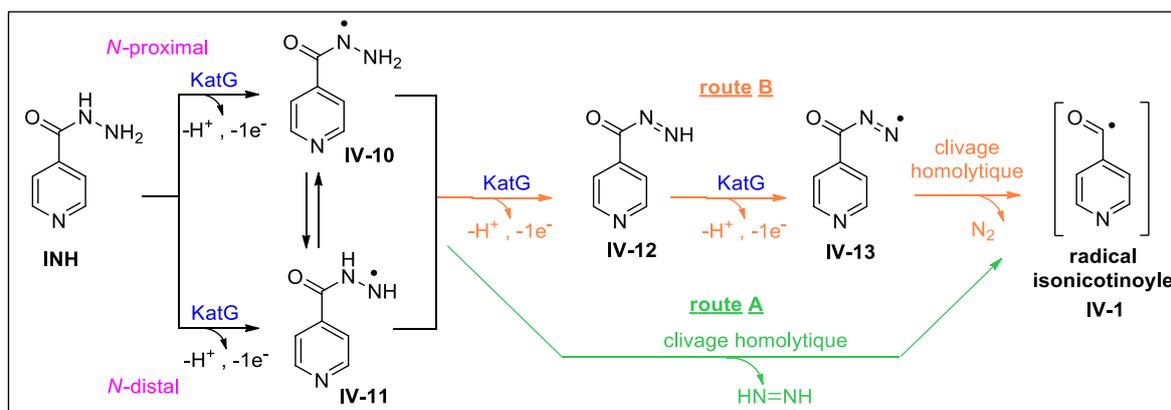


Schéma 30 : Mécanisme d'oxydation proposé de l'INH pour la formation du radical isonicotinoylé **IV-1**

I.3. Résultats non publiés associés à l'article

I.3.1. Hydrazides substitués

Afin de compléter cette étude, nous avons étudié la formation du radical isonicotinoylé (**IV-1**) par RPE en utilisant le piègeur de radicaux PBN et le pyrophosphate de manganèse (III) comme oxydant. Un seul signal, un triplet de doublet, attribué à un radical carbone centré, est observé dans nos conditions : INH (5,1 mM), PBN (10,2 à 40,8 mM) et pyrophosphate de manganèse (III) (1,5 à 10,2 mM) avec comme constantes de couplage hyperfines : $a_N = 15,5 - 15,7$ G, $a_H = 3,2 - 3,6$ G et une valeur de $g = 2,006$ (Figure 44 et Tableau 9). Bien que nous ne puissions pas conclure sur la structure exacte du radical piégé, l'existence du radical isonicotinoylé (**IV-1**) est soutenue par la formation des adduits INH-NAD observés en LC-MS avec le même système oxydant. De plus, le signal RPE observé correspond à celui précédemment décrit dans la littérature en utilisant l'enzyme KatG pour activer l'INH en présence de PBN [62]. Ainsi, l'obtention d'un signal RPE, identique à celui obtenu via l'activation par l'enzyme KatG, prouve la fiabilité de notre système biomimétique utilisant le pyrophosphate de manganèse (III).

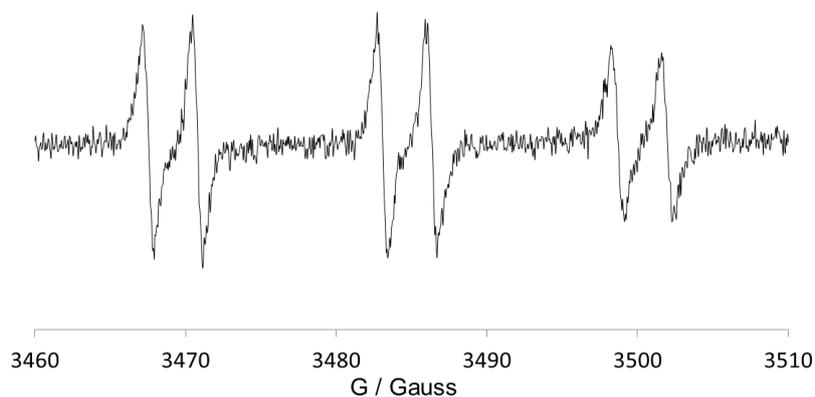


Figure 44 : Signal RPE pour la réaction : INH (5,1 mM), pyrophosphate de Mn(III) (4,1 mM) et PBN (20,4 mM) dans un tampon phosphate (40 mM, pH 7,4). Ligne 2, Tableau 9. Constantes de couplage hyperfines : $a_N = 15,5 - 15,7$ G, $a_H = 3,2 - 3,6$ G et une valeur de $g = 2,006$

Tableau 9 : Conditions de RPE testées pour la réaction entre l'INH et le pyrophosphate de Mn(III) en présence de PBN

N°	Solvant	[INH]	Nombre éq. oxydant	Nombre éq. PBN	Signal
1	Aqueux ^a	5,1 mM	0,3 eq	4 eq	$a_N = 15,6$ G, $a_H = 3,6$ G, $g = 2,006$
2	Aqueux ^a	5,1 mM	0,8 eq	4 eq	$a_N = 15,5-15,7$ G, $a_H = 3,2-3,4$ G, $g = 2,006$
3	Aqueux ^a	5,1 mM	0,8 eq	8 eq	$a_N = 15,7$ G, $a_H = 3,4$ G, $g = 2,006$
4	Aqueux ^a	5,1 mM	0,8 eq	2 eq	$a_N = 15,6$ G, $a_H = 3,3$ G, $g = 2,006$
5	Aqueux ^a	5,1 mM	2 eq	4 eq	$a_N = 15,7$ G, $a_H = 3,4$ G, $g = 2,006$
6	Aqueux ^a	5,1 mM	/	4 eq	Pas de signal
7	Aqueux ^a	5,1 mM	0,3-0,8 eq	/	Pas de signal
8	Aqueux ^a	/	0,3 eq	4 eq	Pas de signal
9	MeOH	5,1 mM	0,8 eq	4 eq	$a_N = 15,7$ G, $a_H = 3,4$ G, $g = 2,006$
10	MeOH	/	0,8 eq	4 eq	Pas de signal

^a : l'utilisation de H₂O ou d'un tampon phosphate (40 mM, pH 7,4) comme solvant ne change pas l'intensité ou la nature du signal observé, les constantes de couplage restent identiques. L'utilisation d'un tampon phosphate plus concentré entraîne des problèmes de solubilité.

Le nombre d'équivalents d'oxydant ou de PBN utilisés dans la réaction n'influe pas sur le signal obtenu (lignes 1 à 5, Tableau 9). Les expériences de contrôle, c'est-à-dire lorsque l'un des trois réactifs est manquant (lignes 6 à 8 et 10, Tableau 9), ne montrent aucun signal RPE, preuve que le signal observé précédemment est issu d'un radical INH-PBN obtenu par oxydation de l'INH par le pyrophosphate de manganèse (III). L'utilisation du solvant méthanol pour réaliser la réaction ne modifie pas les constantes de couplage par rapport à un milieu aqueux (ligne 9, Tableau 9).

Afin d'étudier l'influence de l'oxydant sur le signal RPE observé, nous avons choisi de réaliser les mêmes expériences avec un oxydant différent, l'hexacyanoferrate de potassium K₃Fe(CN)₆ (Figure 45 et Tableau 10). Un signal de type triplet de doublet a également été obtenu avec des constantes de couplage hyperfines similaires mais avec une intensité du

signal bien inférieure, l'hexacyanoferrate de potassium n'étant pas connu pour être un bon oxydant de l'INH. De plus, dans ce cas, le choix du solvant ne semble pas impacter le signal observé puisque pour les trois solvants (eau, méthanol, acétonitrile), le signal obtenu est similaire (lignes 1 à 3, Tableau 10).

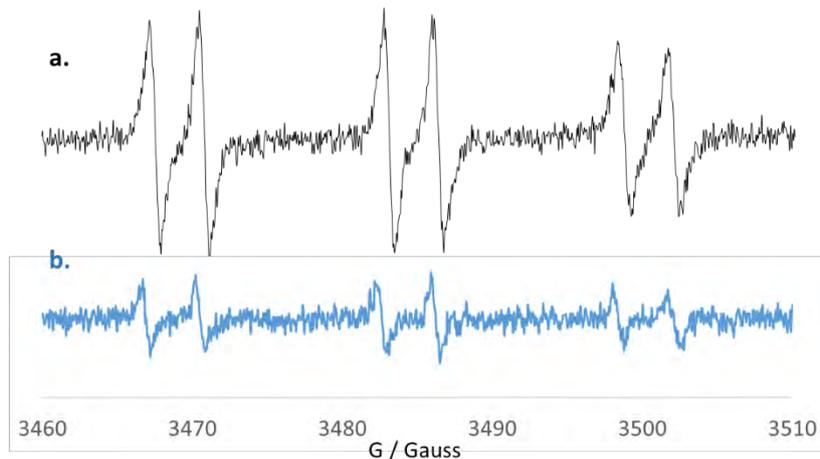


Figure 45 : Signaux RPE pour les réactions : a. INH (5,1 mM), pyrophosphate de Mn(III) (4,1 mM) et PBN (20,4 mM), b. INH (5 mM), $K_3Fe(CN)_6$ (5 mM), PBN (20 mM). L'échelle verticale est maintenue identique pour les deux spectres.

Tableau 10 : Conditions de RPE testées pour la réaction entre l'INH et le $K_3Fe(CN)_6$ en présence de PBN

N°	Solvant	[INH]	Nombre éq. oxydant	Nombre éq. PBN	Signal
1	Aqueux	5 mM	1 eq	4 eq	$a_N = 15,8 \text{ G}$, $a_H = 3,6-3,8 \text{ G}$, $g = 2,006$
2	MeOH	5 mM	1 eq	4 eq	$a_N = 15,7 \text{ G}$, $a_H = 3,5 \text{ G}$, $g = 2,006$
3	ACN	5 mM	1 eq	4 eq	$a_N = 15,7 \text{ G}$, $a_H = 3,5 \text{ G}$, $g = 2,006$
4	Aqueux	/	1 eq	4 eq	Pas de signal
5	Aqueux	5 mM	1 eq	/	Pas de signal

L'utilisation de H_2O ou d'un tampon phosphate (40 mM, pH 7,4) comme solvant ne change pas l'intensité ou la nature du signal observé, les constantes de couplage restent identiques.

Nous avons ensuite suivi, par RPE, l'oxydation, par le pyrophosphate de manganèse (III), des hydrazides substitués synthétisés dans le cadre de l'article 1 Chemistry Select, 2016, 1(2), 172-179 [63]. Le PBN a également été choisi comme piègeur de radicaux afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux de l'INH (Figure 46 et Tableau 11). Ces molécules possédant des modifications structurales sur la partie hydrazine et pas sur le noyau pyridine, le radical isonicotinoyle (**IV-1**), s'il est piégé par le PBN, devrait donner un signal identique à celui observé dans le cadre de l'oxydation de l'INH.

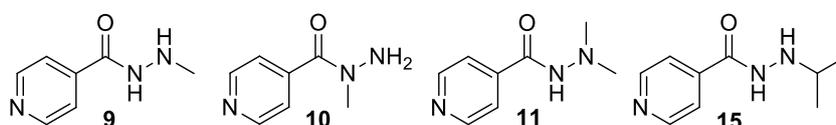


Figure 46 : Hydrazides substitués étudiés en RPE (numérotation reprise de l'article 1 [63])

Tableau 11 : Conditions de RPE testées pour la réaction d'hydrazides substitués, de pyrophosphate de Mn(III) et de PBN

N°	Molécule	[C]	Nombre éq. oxydant	Nombre éq. PBN	Signal
1	9	5,1 mM	0,8 eq	4 eq	$a_N = 16,5 \text{ G}$, $a_H = 3,5 \text{ G}$, $g = 2,006$
2	10	5,1 mM	0,8 eq	4 eq	$a_N = 16,5 \text{ G}$, $a_H = 3,6 \text{ G}$, $g = 2,006$
3	11	5,1 mM	0,8 eq	4 eq	$a_N = 16,5 \text{ G}$, $a_H = 3,6 \text{ G}$, $g = 2,006$
4	15	5,1 mM	0,8 eq	4 eq	$a_N = 16,3 \text{ G}$, $a_H = 2,5 \text{ G}$, $g = 2,006$
5	15	5,1 mM	2 eq	4 eq	$a_N = 16,4 \text{ G}$, $a_H = 2,5 \text{ G}$, $g = 2,006$
6	15	5,1 mM	1,5 eq	4 eq	$a_N = 16,4 \text{ G}$, $a_H = 2,5 \text{ G}$, $g = 2,006$
7	INH	5,1 mM	0,8 eq	4 eq	$a_N = 15,5\text{-}15,7 \text{ G}$, $a_H = 3,2\text{-}3,4 \text{ G}$, $g = 2,006$

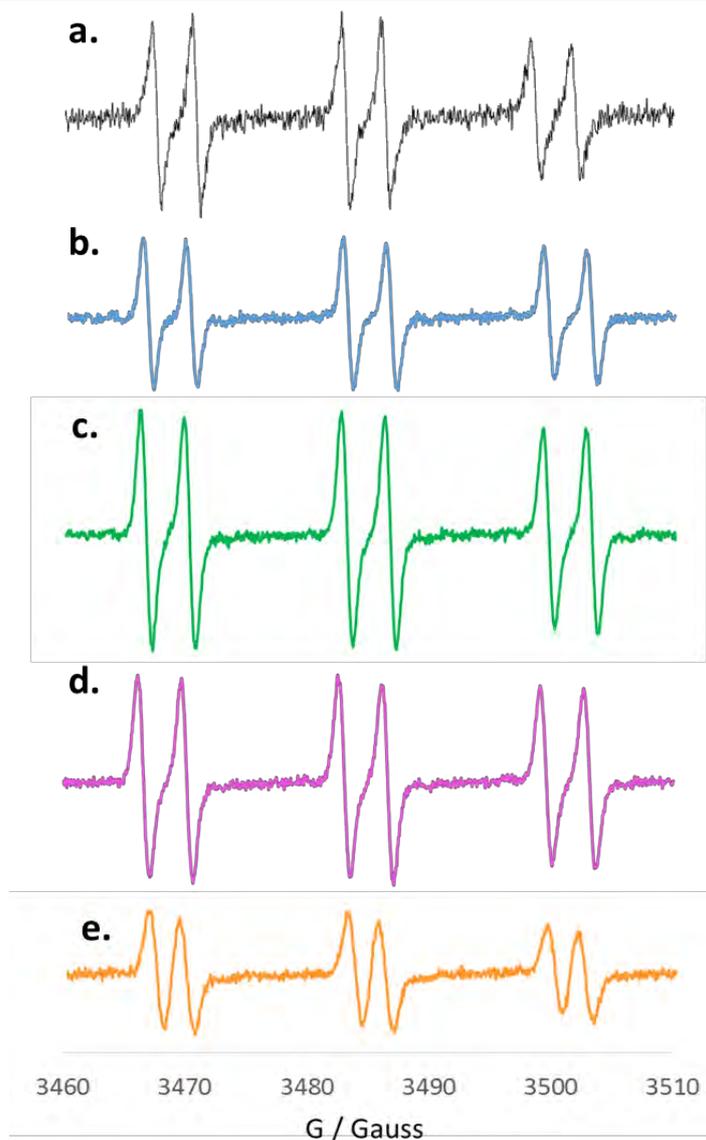


Figure 47 : Signaux RPE pour les réactions : Hydrazides (5,1 mM), pyrophosphate de Mn(III) (4,1 mM) et PBN (20,4 mM) avec a. INH, b. molécule 9, c. molécule 10, d. molécule 11, e. molécule 15.

L'échelle verticale est maintenue identique pour les cinq spectres.

Les constantes de couplage hyperfines des signaux obtenus sont différentes de celles mesurées pour l'INH ($a_N = 15,5 - 15,7 \text{ G}$, $a_H = 3,2 - 3,4 \text{ G}$). Les molécules 9, 10 et 11, substituées par un ou plusieurs groupements méthyles, présentent des constantes de couplage hyperfines identiques entre elles, avec des valeurs de $a_N = 16,5 \text{ G}$ et $a_H = 3,5 - 3,6 \text{ G}$ (lignes 1

à 3, Tableau 11). La molécule **15**, substituée par un groupement isopropyle, montre des constantes de couplage hyperfines égales à $a_N = 16,3 - 16,4$ G et $a_H = 2,5$ G (lignes 4 à 6, Tableau 11), même avec un excès d'oxydant.

L'oxydation d'hydrazide substitué est connue dans la littérature pour libérer des radicaux alkyles, qui peuvent être piégés par le PBN [320]. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons utilisé les conditions décrites dans la littérature pour la formation de radicaux alkyles, à savoir l'auto-oxydation de la méthylhydrazine et de l'isopropylhydrazine (1 mM) en présence de chlorure de cuivre (II) catalytique (0,01 mM) à pH basique (tampon Na_2CO_3 , 50 mM, pH 10) [321]. Le PBN (46 mM) a également été utilisé comme piègeur de radicaux de ces espèces. L'hydrazine a également été oxydée dans ces conditions comme contrôle négatif, puisqu'elle ne présente pas de substitution alkyle. Dans le cas de la méthylhydrazine, le signal observé pour le radical Me-PBN présente des constantes hyperfines de $a_N = 16,1-16,3$ G, $a_H = 3,6-3,9$ G, $g = 2,006$. L'expérience dans laquelle l'isopropylhydrazine est oxydée par des ions cuivre (II), en présence de PBN, a entraîné le piégeage des deux adduits PBN, le premier ($g_1 = 2,006$, $a_{N1} = 16,5$ G et $a_{H1} = 4,6$ G) diminue avec le temps en faveur du second ($g_2 = 2,006$, $a_{N2} = 15,8$ G et $a_{H2} = 2,6$ G), qui devient prédominant après 40 minutes, résultant probablement de la migration du radical sur la chaîne propyle.

Tableau 12 : Conditions de RPE testées pour la réaction d'auto-oxydation des hydrazines en présence de CuCl_2 et de PBN

N°	Molécule	[C]	Nombre éq. oxydant	Nombre éq. PBN	Signal
1	MeNHNH ₂	1 mM	0,01 eq	46 eq	$a_N = 16,1-16,3$ G, $a_H = 3,6-3,9$ G, $g = 2,006$
2	iPrNHNH ₂	1 mM	0,01 eq	46 eq	$a_{N1} = 16,5$ G, $a_{H1} = 4,6$ G, $g_1 = 2,006$ $a_{N2} = 15,8$ G, $a_{H2} = 2,6$ G, $g_2 = 2,006$
3	NH ₂ NH ₂	1 mM	0,01 eq	46 eq	Pas de signal

Les constantes de couplage hyperfines obtenues pour la méthylhydrazine (adduit Me-PBN) sont identiques à celles observées lors de l'oxydation des hydrazides **9**, **10** et **11**. Les constantes de couplage hyperfines obtenues pour l'isopropylhydrazine (adduit iPr-PBN, espèce 2) sont similaires à celle de l'hydrazide **15**. Ainsi, seuls les radicaux alkyles ont été piégés lors de l'oxydation des hydrazides substitués par le pyrophosphate de Mn(III). Par ailleurs, aucune autre espèce radicalaire n'a été détectée en augmentant la quantité d'oxydant dans le milieu (lignes 5 et 6, Tableau 11).

Par rapport au mécanisme proposé dans l'article 1 pour l'activation de l'INH et la formation du radical isonicotinoyl (IV-1), l'observation d'un radical de type R•, pour les

hydrazides substitués, démontre qu'après la première oxydation, la liaison préférentiellement clivée est celle entre un azote de l'hydrazine et le substituant R (Voie B₁ sur le Schéma 31). Cette réaction conduit à la libération du radical R• et à la formation de l'intermédiaire diimide **IV-12**. La réaction en présence d'un excès d'oxydant, afin de convertir l'intermédiaire diimide **IV-12** en radical isonicotinoyl, n'a pas été fructueuse, laissant penser que l'intermédiaire diimide **IV-12** n'est pas le précurseur du radical isonicotinoyl (**IV-1**) (Voie B₃ sur le Schéma 31). Ces résultats supportent ainsi l'idée que la voie A est privilégiée dans le cas de l'INH.

Cependant, la possibilité d'un clivage homolytique entre le carbonyle et l'azote, au sein de KatG, passant ainsi par la voie A pour générer le radical isonicotinoyl (**IV-1**), n'est pas exclue pour des hydrazides substitués en position distale. En effet, la formation du radical isonicotinoyl (**IV-1**), à partir d'hydrazides substitués par des groupements alkyles ou acyles, a été proposée dans la littérature [247].

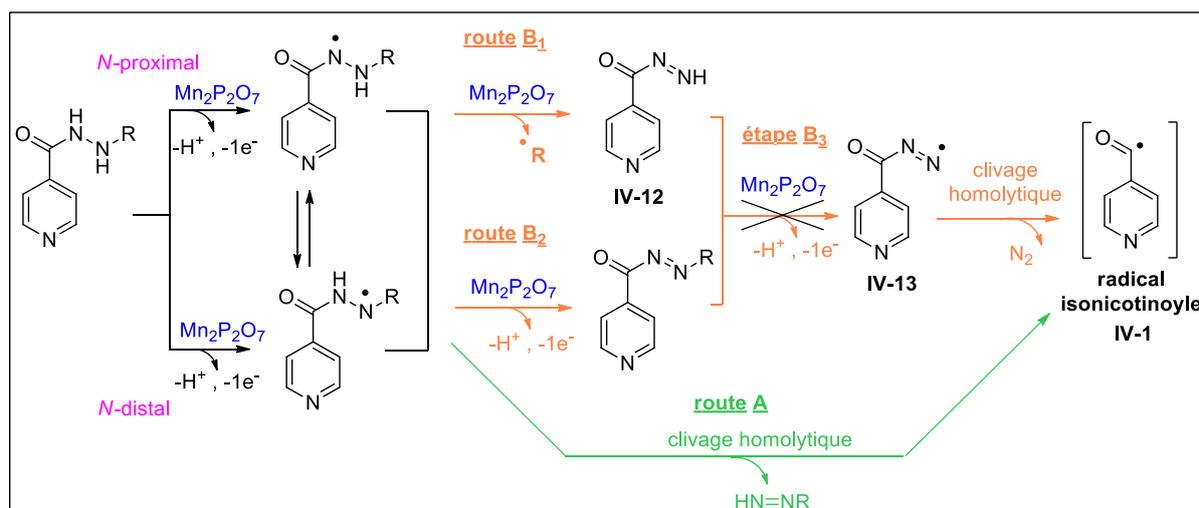


Schéma 31 : Mécanisme d'oxydation proposé dans le cas des hydrazides substitués

1.3.2. Autres hydrazides étudiés

Les hydrazides synthétisés dans le cadre de l'article *Chemistry Select*, **2016**, *1*(2), 172-179 n'ont pas montré d'activité antimycobactérienne intéressante, cependant nous avons choisi d'analyser, pour certains d'entre eux (Figure 48), leur mécanisme d'activation par RPE et par LC-MS, comme réalisé pour l'INH.

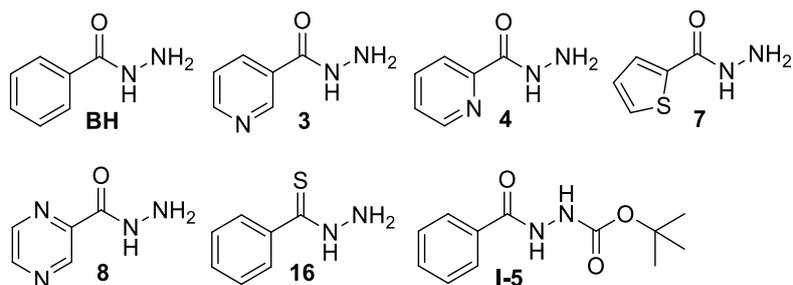


Figure 48 : Hydrazides étudiés en RPE et LC-MS (numérotation reprise de l'article 1 [63])

Les hydrazides comme le benzohydrazide (BH) ou l'hydrazide nicotinique **3** sont déjà décrits dans la littérature vis-à-vis de leur aptitude à imiter le mécanisme d'action de l'INH. Des études RPE de la littérature ont montré qu'en utilisant KatG, il était plus difficile de former le radical R-PBN dans le cas du 3-pyridine carbohydrazide (**3**) que dans le cas de l'INH et ces résultats sont en accord avec la CMI sur MTB du composé **3**, 30 fois supérieure à celle de l'INH [62]. Pour le benzohydrazide (BH), le radical aroyle-TEMPO a également été isolé via une oxydation chimique [322]. L'adduit BH-NAD a été synthétisé, avec le $MnCl_2$ comme oxydant, et présente, *in vitro*, une capacité d'inhibition de l'enzyme InhA similaire à celle de l'adduit INH-NAD mais le BH ne montre cependant pas d'activité antimycobactérienne [61,63]. L'absence d'activité antimycobactérienne du BH (et des autres hydrazides) par rapport à l'INH peut s'expliquer par une pénétration moins efficace dans la mycobactérie ou par une activation moins favorable par l'enzyme KatG pour la formation des adduits avec le cofacteur NAD (radical $R\cdot$ formé moins stable) [100].

Ces hydrazides, présentant une structure chimique similaire à l'INH devraient, *in vitro*, respecter le même mécanisme d'activation que l'INH. Les conditions d'oxydation par BpKatG ou par le pyrophosphate de manganèse (III) précédemment décrites, doivent donc permettre l'activation de ces hydrazides, la formation de radical R-PBN et la formation des adduits correspondants avec le NAD.

1.3.3. Activation enzymatique par BpKatG

Comme précédemment décrit, l'équipe de Peter Loewen a également étudié, dans les mêmes conditions que pour l'INH, l'activation des composés **3** (3-pyridine carbohydrazide) et **4** (2-pyridine carbohydrazide), par la catalase peroxydase BpKatG. Les taux de formation d'adduits ont été mesurés d'après l'absorbance à 326 nm et la valeur $\epsilon_{326nm} = 6900 M^{-1}.cm^{-1}$ donnée pour l'adduits INH-NADH et les valeurs sont reportées dans le tableau suivant (Tableau 13).

Tableau 13 : Taux de formation des adduits X-NAD par BpKatG

Entrée	Molécule	Taux d'adduit nmol de X-NAD / min
1	INH	1,95
2	3	0,10
3	4	1,06

Ces résultats montrent bien que la position de l'azote du cycle pyridine par rapport au substituant carbohydrazide joue un rôle déterminant dans la formation des adduits avec le NAD^+ lors d'une activation enzymatique par KatG. La position de l'azote peut influencer cette formation à différents niveaux, soit par des interactions favorables ou non au sein du site actif de KatG, soit en agissant sur la stabilité du radical formé et sa réactivité vis-à-vis du NAD^+ .

I.3.4. Formation du radical R-PBN en RPE

Ces hydrazides ont également été analysés par RPE vis-à-vis de leur l'oxydation par le pyrophosphate de manganèse (III) ou le $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en présence de PBN comme piègeur de radicaux et les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Tableau 14).

Tableau 14 : Signaux RPE des hydrazides en présence de PBN dans un tampon phosphate (40 mM, pH 7,4) soit dans les conditions A : Hydrazide (5,1 mM), pyrophosphate de manganèse (III) (4,1 mM), PBN (20,4 mM) soit les conditions B : Hydrazide (5 mM), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM), PBN (20 mM).

N°	Molécule	Conditions	Signal
1	BH	A (Mn(III))	$a_N = 15,5 \text{ G}$, $a_H = 4,8 \text{ G}$, $g = 2,006$
2	3	A (Mn(III))	$a_N = 15,7 \text{ G}$, $a_H = 4,6 \text{ G}$, $g = 2,006$
3	4	A (Mn(III))	$a_N = 15,8 \text{ G}$, $a_H = 4,4 \text{ G}$, $g = 2,006$
4	7	A (Mn(III))	$a_N = 15,6 \text{ G}$, $a_H = 4,6 \text{ G}$, $g = 2,006$
5	8	A (Mn(III))	$a_N = 15,9 \text{ G}$, $a_H = 4,0 \text{ G}$, $g = 2,006$
6	I-5	A (Mn(III))	Pas de signal
7	I-5	B ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	$a_N = 15,7 \text{ G}$, $a_H = 3,5 \text{ G}$, $g = 2,006$
8	INH	A (Mn(III))	$a_N = 15,5 - 15,7 \text{ G}$, $a_H = 3,2 - 3,4 \text{ G}$, $g = 2,006$

Les hydrazides **BH**, **3**, **4** et **7** ont tous des constantes de couplage hyperfines très proches ($a_N = 15,5 - 15,8 \text{ G}$, $a_H = 4,4 - 4,8 \text{ G}$) et l'hydrazide **8**, avec un cycle pyrazine, diffère quant à lui avec une constante a_H plus faible ($a_N = 15,9 \text{ G}$, $a_H = 4,0 \text{ G}$). Ces hydrazides ont des constantes de couplage hyperfines différentes de l'INH ($a_N = 15,5 - 15,7 \text{ G}$, $a_H = 3,2 - 3,4 \text{ G}$), présentant une constante de couplage a_H significativement plus faible. Ces signaux sont attribués à des radicaux aroyles avec différents cycles aromatiques.

Le composé **I-5** (*N*'-((*tert*-butoxycarbonyl)oxy)isonicotinohydrazide), présentant une activité antimycobactérienne intéressante (CMI = 0,25 μM), n'a pas permis la détection de radicaux R-PBN lors de son oxydation avec le pyrophosphate de Mn(III) mais montre un

signal identique à l'INH lors d'une activation par $K_3Fe(CN)_6$ (lignes 6 et 7, Tableau 14). Son activité antimycobactérienne pourrait donc s'exercer via un mécanisme d'action similaire à celui de l'INH et passant par la formation d'un radical isonicotinoylé (**IV-1**).

Dans les conditions étudiées, il n'a pas été possible de détecter de signaux en RPE pour les composés thiohydrazides présentés en partie 1.I. (composés **I-12** à **I-35**), lors d'une activation par le pyrophosphate de manganèse (III) ou par $K_3Fe(CN)_6$ dans un milieu méthanol (ces composés étant insolubles dans l'eau) et ce bien que l'activation enzymatique par BpKatG pour la formation des adduits avec le NAD soit possible.

Les composés à longues chaînes carbonées, synthétisés en partie 1.II. (composés **II-25** et **II-27** à **II-29**), n'ont également pas présenté de signaux en RPE mais le manque de solubilité de ces composés dans les conditions de RPE, rend cette analyse non concluante.

I.3.5. Formation des adduits avec le NAD^+

Nous avons choisi d'appliquer le système d'oxydation biomimétique utilisant le pyrophosphate de manganèse (III) à l'activation des hydrazides précédemment synthétisés, en présence de NAD^+ , afin de mettre en évidence la formation d'adduits R-NAD. La détection de tels adduits a été réalisée de manière qualitative par LC-MS, en absence d'étalon interne.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau 15).

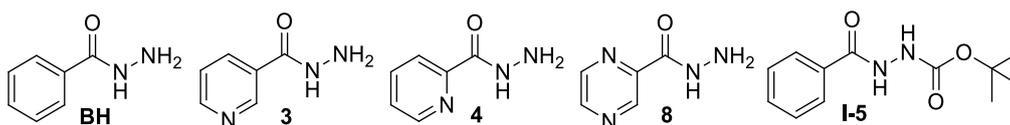


Figure 49 : Hydrazides étudiés en LC-MS

Tableau 15 : Observation des adduits R-NAD par LC-MS.

Conditions : Hydrazide (1,3 mM), NAD^+ (1,3 mM), pyrophosphate de Mn(III) (3,9 mM) dans un tampon phosphate (20 mM, pH 7,4) et DMSO (13%).

N°	Molécule	Adduits R-NAD		Hydrazide de départ après oxydation
		1,4-dihydropyridine	pyridinium	
1	BH	traces	++	traces
2	3	-	traces	N.D. ^a
3	4	+	+++	+
4	8	-	-	-
5	I-5	-	-	100% (pas d'oxydation)

^a. Temps de rétention de l'hydrazide identique à celui du NAD^+

Les adduits R-NAD sont observés par spectroscopie UV et spectrométrie de masse pour les hydrazides **BH** et **4** avec des rendements inférieurs à ceux de l'INH et seulement des traces d'adduit R-NAD sont détectés en spectrométrie de masse pour l'hydrazide **3**. Cela est cohérent avec les structures chimiques des molécules, l'azote du cycle pyridine du composé **4** étant à une position moins favorable que celui de l'INH mais plus favorable que l'hydrazide **3** vis-à-vis de la conjugaison et de la stabilité du radical R• formé. Le composé **8**, avec un cycle pyrazine, n'a pas conduit à la détection des adduits. Enfin, comme observé en RPE, le composé **I-5** n'est pas activé par le pyrophosphate de manganèse (III) et l'utilisation du $K_3Fe(CN)_6$ comme oxydant n'a pas non plus permis la détection d'adduit avec le NAD^+ .

L'étude de formation des adduits R-NAD avec les thiohydrazides n'a pas été concluante puisqu'aucun adduit R-NAD n'a été observé. En outre, des structures résultant de cyclisation intramoléculaire ont été détectées lors de ces expériences d'oxydation, démontrant une nouvelle fois l'instabilité de la fonction thiohydrazide.

Les composés à longues chaînes carbonées, synthétisés en partie 1.II., n'ont pu être étudiés pour des raisons de faible solubilité induisant leur précipitation dans le milieu réactionnel.

I.4. Conclusion

Ces différentes études nous ont permis d'améliorer la compréhension de la formation du radical isonicotinoyle (**IV-1**).

Les études théoriques ont démontré que l'oxydation était plus facile sur la position proximale et que la voie impliquant le clivage homolytique avec libération du diazène et formation du radical isonicotinoyle (**IV-1**) était la plus favorable. De plus, les études de RPE sur des hydrazides substitués ont montré que le radical alkyle est formé préférentiellement.

Nous proposons donc le mécanisme suivant pour la formation du radical isonicotinoyle (**IV-1**) : oxydation sur la position proximale, migration du radical vers la position distale (les deux radicaux hydrazides étant en équilibre), suivie d'un clivage homolytique conduisant à la formation du radical isonicotinoyle (**IV-1**) et à la libération de diazène (Schéma 32).

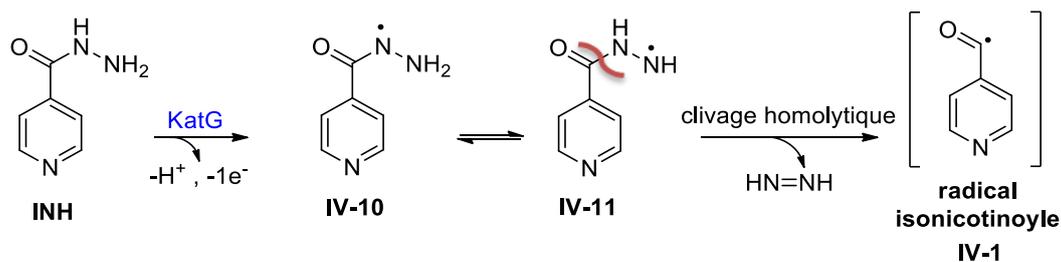


Schéma 32 : Mécanisme de formation du radical isonicotinoyloyle **IV-1** à partir de l'INH

De plus, les hydrazides étudiés (**BH**, **3**, **4**, **7** et **8**) ont un comportement chimique similaire à celui de l'INH pour la formation de radicaux R-PBN mais la formation d'adduit R-NAD est plus difficile. Cela signifie que, dans nos conditions, l'étape limitante est la réaction entre le radical aroyle R• et le cofacteur NAD⁺, pouvant s'expliquer par la faible stabilité du radical aroyle R• formé ou sa réactivité rapide vis-à-vis des autres espèces présentes dans le milieu réactionnel. Ces résultats permettent donc d'expliquer l'absence d'activité antimycobactérienne des hydrazides **BH**, **3**, **4**, **7** et **8**.

CHAPITRE II. Mécanisme d'activation de l'éthionamide

II.1. Article 2: Ethionamide biomimetic activation and an unprecedented mechanism for its conversion into the active and non-active metabolites

Ethionamide biomimetic activation and an unprecedented mechanism for its conversion into the active and non-active metabolites

Julie Laborde, Céline Deraeve, Carine Duhayon, Geneviève Pratviel and Vania Bernardes-Génisson.

Organic & Biomolecular Chemistry, **2016**, *14*, 8848-8858 (*Hot article*)

DOI: 10.1039/C6OB01561A

Résumé de l'article en français [323] :

L'ETH est une pro-drogue activée au sein de *Mycobacterium tuberculosis* par oxydation par l'enzyme EthA, une monooxygénase à flavine et, comme pour l'INH, son métabolite actif inhibe l'enzyme InhA [73,118,134,135]. L'oxydation de l'ETH conduit à la formation de métabolites non-actifs (2-éthylpyridine-4-carboxamide (**3**), 2-éthylpyridine-4-carbonitrile (**4**), acide 2-éthylpyridine-4-carboxylique (**5**)) et de métabolites actifs, les adduits ETH-NAD [131,135,136,324,325]. L'activation de l'ETH passe par la formation d'un intermédiaire éthionamide *S*-oxyde **2**, ayant la même activité biologique que l'ETH [135]. Les mécanismes décrits dans la littérature proposent une oxydation de cet intermédiaire **2** pour former l'acide sulfinique correspondant **6** pouvant générer par un mécanisme non identifié le radical iminoyl **7** [131,135,150,326]. Cependant, aucune preuve expérimentale ne confirme la formation des intermédiaires **6** et **7** et aucun mécanisme n'explique, de façon convaincante, la conversion de l'acide sulfinique **6** en radical iminoyl **7** (scission homolytique de la liaison C-S).

D'autre part, la formation de l'adduit ETH-NADH est compliquée (nécessite le système cellulaire complet) et l'utilisation de l'enzyme EthA isolée (enzyme membranaire) pour la génération de l'adduit ETH-NADH est, à ce jour, infructueuse [131,136,137].

Cet article présente le premier système biomimétique chimique de l'EthA permettant la formation et la détection, par LC-MS, des métabolites non-actifs et actifs issus de l'oxydation de l'ETH par un oxydant donneur d'oxygène (KHSO₅, H₂O₂ ou *m*-CPBA). Ainsi, les adduits

ETH-NAD, sous forme pyridinium, ont été identifiés, pour la première fois, par LC-MS et HRMS.

Les différents intermédiaires réactionnels de l'oxydation de l'ETH ont ensuite été étudiés et décrits pour la première fois, comme la structure RX de l'intermédiaire éthionamide *S*-oxyde **2** et la formation de radicaux PBN-OH et PBN-ETH en RPE via l'utilisation du système biomimétique précédemment mis en place. Aucune preuve n'étant venue confirmer la formation de l'acide sulfinique **6**, nous pensons que celui n'est pas un intermédiaire de l'oxydation de l'ETH et nous proposons un nouveau mécanisme mettant en jeu une réaction de type cycloaddition [2 + 2] formelle. Nous proposons que l'ETH est, dans un premier temps, oxydé en éthionamide *S*-oxyde **2**, qui se comporte alors comme un composé de type cétène via une réaction de type cycloaddition [2 + 2] formelle donnant, en présence de peroxyde, un intermédiaire dioxétane. Cet intermédiaire instable à 4 chaînons, en équilibre avec sa forme tautomère ouverte, se décompose par différentes voies. Ces différentes possibilités expliquent la formation du radical iminoyale **7**, ainsi que celle des différents métabolites observés pour l'oxydation de l'ETH, y compris les métabolites actifs, les adduits ETH-NAD. Cette proposition mécanistique est appuyée par des expériences de marquage isotopique dont les résultats sont en défaveur d'un mécanisme passant par l'acide sulfinique **6** comme précédemment décrit dans la littérature.

Bien qu'il n'ait pas été détecté dans nos conditions, la formation de l'acide sulfinique **6** n'est pas exclue mais il ne serait pas le précurseur du radical aroyle. Ainsi, il peut-être envisagé qu'il y ait une compétition entre une réaction de substitution nucléophile conduisant à l'acide sulfinique et une cycloaddition générant le radical iminoyale **7**. Pour l'ETH, la réaction de cycloaddition semble alors favorable, conduisant à la formation des adduits ETH-NAD.

CrossMark
click for updates

Cite this: DOI: 10.1039/c6ob01561a

Ethionamide biomimetic activation and an unprecedented mechanism for its conversion into active and non-active metabolites†

Julie Laborde,^{a,b} Céline Deraeve,^{a,b} Carine Duhayon,^{a,b} Geneviève Pratiel^{a,b} and Vania Bernardes-Génisson*^{a,b}

Ethionamide (ETH), a second-line anti-tubercular drug that is regaining a lot of interest due to the increasing cases of drug-resistant tuberculosis, is a pro-drug that requires an enzymatic activation step to become active and to exert its therapeutic effect. The enzyme responsible for ETH bioactivation in *Mycobacterium tuberculosis* is a monooxygenase (EthA) that uses flavin adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor and is NADPH- and O₂-dependant to exert its catalytic activity. In this work, we investigated the activation of ETH by various oxygen-donor oxidants and the first biomimetic ETH activation methods were developed (KHSO₅, H₂O₂, and *m*-CPBA). These simple oxidative systems, in the presence of ETH and NAD⁺, allowed the production of short-lived radical species and the first non-enzymatic formation of active and non-active ETH metabolites. The intermediates and the final compounds of the activation pathway were well characterized. Based on these results, we postulated a consistent mechanism for ETH activation, not involving sulfinic acid as a precursor of the iminoyl radical, as proposed so far, but putting forward a novel reactivity for the *S*-oxide ethionamide intermediate. We proposed that ETH is first oxidized into *S*-oxide ethionamide, which then behaves as a "ketene-like" compound via a formal [2 + 2] cycloaddition reaction with peroxide to give a dioxetane intermediate. This unstable 4-membered intermediate in equilibrium with its open tautomeric form decomposes through different pathways, which would explain the formation of the iminoyl radical and also that of different metabolites observed for ETH oxidation, including the ETH–NAD active adduct. The elucidation of this unprecedented ETH activation mechanism was supported by the application of isotopic labelling experiments.

Received 21st July 2016,
Accepted 23rd August 2016
DOI: 10.1039/c6ob01561a

www.rsc.org/obc

Introduction

Ethionamide (ETH, Fig. 1), a second-line anti-tubercular drug that is regaining a lot of interest due to the increasing cases of drug-resistant tuberculosis, is structurally related to the front-line drug isoniazid (INH) and shares the same biological target, the enoyl-acyl carrier protein reductase InhA.¹ InhA is an essential enzyme of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) involved in the synthesis of mycolic acids, which are specific components of the MTB cell wall. Both molecules (ETH and INH) are pro-drugs that require an enzymatic activation step to become active and to exert their therapeutic effect. Although both activation processes concern oxidation reactions, their

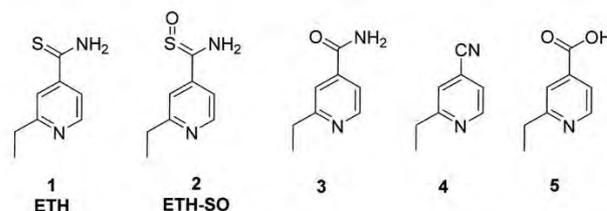


Fig. 1 Structures of ETH 1 and its reported oxidation metabolites: active ETH-SO 2 and inactive metabolites 3–5.

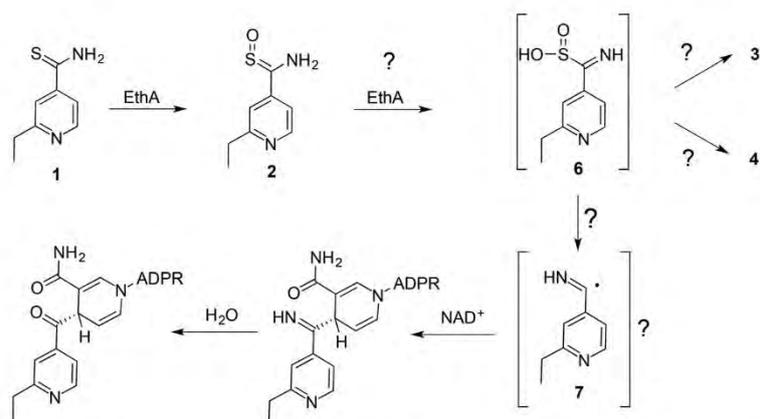
mechanisms differ completely, as well as the involved enzymes. In the case of INH, the activation is mediated by the MTB catalase-peroxidase enzyme (KatG), generating the isonicotinoyl radical. This radical then reacts covalently with the NAD cofactor (nicotinamide adenine dinucleotide) to form the active metabolite, the INH–NADH adduct, which is the ultimate inhibitor of InhA.² The mechanism of action of ETH was only partially elucidated more recently, and some questions still remain open. The enzyme responsible for ETH bioacti-

^aCNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205, route de Narbonne, BP 44099 F-31077 Toulouse, Cedex 4, France.

E-mail: vania.bernardes-genisson@lcc-toulouse.fr

^bUniversité de Toulouse, UPS, INPT, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Additional X-ray crystallographic data. CCDC 1494932. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c6ob01561a



Scheme 1 Postulated mechanism for ETH-NADH adduct formation through bioactivation by the flavin monooxygenase EthA.^{4,8,9}

vation in MTB, EthA, was identified independently by two research teams in 2000.^{3,4} It is a monooxygenase that uses flavin adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor and is NADPH- and O₂-dependent to exert its catalytic activity.⁵ Initially, it was proposed that the activation of ETH catalyzed by EthA *in vitro* consisted of two oxidative steps. The first oxidation yields the ethionamide S-oxide derivative (ETH-SO 2, Fig. 1), which exhibits the same biological activity as the parent drug 1.⁴

Further oxidation of ETH-SO, occurring through a still unknown mechanism, leads to stable and inactive final products 2-ethylpyridine-4-carboxamide (3) and 2-ethylpyridine-4-carbonitrile (4), which are proposed to arise from the unstable sulfinic acid intermediate 6 (Scheme 1).⁵ Another intracellular metabolite, 2-ethylpyridine-4-carboxylic acid (5), was identified in whole bacterial systems, whereas 2-ethyl-4-pyridinylmethanol was only detected outside of the bacteria.^{4,6,7} Another metabolite, different from the previously mentioned compounds and believed to be active by the authors, was also observed by HRMAS NMR inside living bacteria, however without structural identification.^{6,7} Finally in 2007, ETH-NADH adducts (Fig. 2) were isolated *in vitro* by Wang using a cell-based activation method.⁸ These adducts are able to inhibit InhA with $K_i = 7$ nM, which is comparable to the inhibition of InhA by INH-NADH adducts ($K_i = 5$ nM) and a crystal structure of this active metabolite in complex with InhA revealed a molecular structure of the ETH-NADH adduct similar to that of the INH-NADH adduct (4S-1,4-dihydropyridine in its open form) and the positions of both adducts in the InhA target are nearly superimposable.

Although the chemical nature of the final ETH active metabolite was demonstrated for the first time, the mechanism through which the active as well as the non-active metabolites are formed is less clear than in the case of INH. The most consensual hypothesis described in the literature (Scheme 1) involves the formation of an iminoyl radical 7 (or the corresponding anion) from the putative sulfinic acid 6 that subsequently attacks the electron-deficient cofactor NAD⁺ to form an adduct, which is then converted into the observed

ETH-NADH adduct after hydrolysis to release the amine group (Scheme 1).^{4,8,9} Nevertheless, evidence supporting the existence of intermediate 6 and the iminoyl radical 7 as well as molecular mechanistic propositions explaining the formation of the latter (conversion of sulfinic acid 6 into the iminoyl radical 7 through a scission of the C-S bond) are still missing.

Moreover, the method used to generate this adduct, requiring the co-expression of InhA and EthA from MTB in *E. coli* in the presence of ETH, subsequent purification of InhA in complex with the adduct and denaturation of the protein to release the active compound, is not simple. Furthermore, all reported attempts to activate ETH and produce an ETH-NADH adduct *in vitro* using purified EthA failed,⁸ probably because of a functional association of the protein within the mycobacterial cellular membrane, a hypothesis supported by the fact that purified EthA forms large oligomers in solution and displays only a weak catalytic activity.^{5,10} To circumvent these problems, we were interested in developing a simple chemical biomimetic activation system for ETH allowing ETH-NADH adduct generation, as we have previously performed for INH activation using manganese pyrophosphate.^{11,12} In the present work, we first investigated the activation of ETH by various oxygen-donor oxidants, in order to find a chemical mimic of the flavin monooxygenase enzyme (EthA) of the MTB. Then we characterized the intermediates and the final compounds of this oxidative process. Based on our experiments, we postulated a consistent mechanism for ETH oxidation explaining the distinct formation of the described active and non-active metabolites. To support this activation mechanism, isotopic labelling experiments were also performed.

Results and discussion

Various oxidative systems were tested towards ETH. We focused on oxidants able to transfer an oxygen atom, since the intermediates proposed in the literature for ETH enzymatic activation are ETH-SO 2 and a putative sulfinic acid resulting

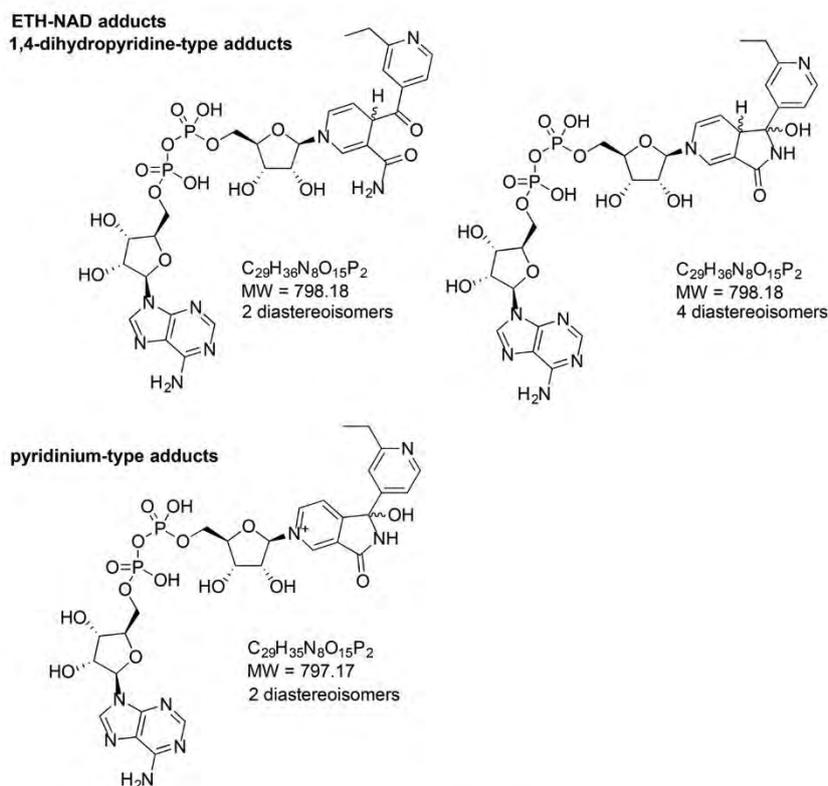


Fig. 2 Structures of ETH-NAD adducts in their 1,4-dihydropyridine and pyridinium forms.

from the incorporation of a second oxygen atom on the precursor **2** (Scheme 1). Since hydroperoxyflavins and other flavin derivatives have been reported as potent organocatalysts mimicking flavoprotein monooxygenases,^{13–15} the 5-ethyl-3-methyl-2',4':3',5'-di-*O*-methyleneriboflavinium perchlorate ([DMRFIEt]⁺[ClO₄]⁻) catalyst¹⁶ was used to evaluate ETH activation and subsequent adduct formation. Other classical oxidants were also employed such as hydrogen peroxide, organic peracids (peracetic acid, *m*-CPBA and the water-soluble magnesium monoperoxophthalate MMPP) and potassium monoperoxysulfate, KHSO₅. A negative control was also run with an electron-transferring oxidant (Mn^{III} pyrophosphate). For all assays, liquid chromatography coupled to electrospray ionisation mass spectrometry (HPLC/ESI-MS) was used to monitor the reaction between ETH and the oxidant (1 to 10 equivalents) in the absence and in the presence of NAD⁺ (1 to 5 equivalents) for three hours (UV detection at 260 nm). Moreover, in line UV-vis spectra confirmed the identification of the formed compounds by comparison with the standards available (2–5).⁵

Firstly, and as a control, the experiments were carried out in the absence of NAD⁺. In all oxidation experiments complete conversion of ETH was obtained (disappearance of the corresponding peak eluted at 49.1 min on the HPLC chromatogram) and the already reported ETH oxidation products: ETH-SO **2** (retention time (*R_t*) of 45.7 min) and the final products **3**, **4**

and **5** (*R_t* = 34.7 min, 53.8 min and 11.1 min, respectively) were formed (Fig. 3). The methyl ester of **5** (methyl 2-ethylpyridine-4-carboxylate **8**, *R_t* = 56.0 min) was also observed when the reaction was carried out in a methanol/aqueous buffer medium for solubility issues. By high resolution mass spectrometry a little peak of ([M + H]⁺) *m/z* = 269.1768 was detected, whose structure might be assigned as being **9** ([M + H]⁺ *m/z*_{calculated} = 269.1766).

Since ethionamide *S*-oxide ETH-SO **2** was an oxidized intermediate under the above conditions, we were interested in synthesizing this compound. ETH-SO was prepared by reacting ETH with 1.1 equivalents of H₂O₂ in ethanol, as previously reported by Vannelli *et al.*³ but with an improved yield of 50% instead of 30% and obtaining single crystals suitable for X-ray analysis. The asymmetric unit contains two molecules, which slightly differ by angles and distance values and are not stackable (Fig. 4). This analysis allowed the unambiguous confirmation of the position of the oxidation (*S*-oxidation rather than pyridine *N*-oxide formation) and the existence of only one tautomeric form (in *Z* configuration) in the solid state. Moreover the lengths of C(7)–S(8) (1.679(2) Å) or C(27)–S(28) (1.671(2) Å), C(7)–N(10) (1.314(2) Å) or C(27)–N(30) (1.319(2) Å) and S(8)–O(9) (1.527(2) Å) or S(28)–O(29) (1.536(2) Å) are in good agreement with values reported for thionicotinamide *S*-oxide (1.682(2) Å, 1.303(2) Å and 1.541(2) Å, respectively).¹⁷ The measured S(8)–O(9) and S(28)–O(29) bond lengths are also

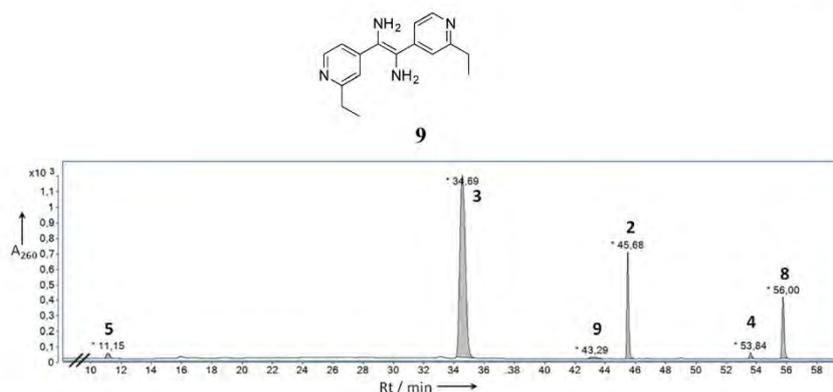


Fig. 3 HPLC chromatogram (at 260 nm) of a reaction mixture containing ETH (200 mM) and KHSO_5 (800 mM) in 400 μL of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (3 : 1 v : v) after 5 minutes of reaction. The reaction mixture was diluted 40 fold in water before injection. Eluted peaks (by increasing retention time (R_t)): **5**: 2-ethylpyridine-4-carboxylic acid ($R_t = 11.1$ min, $m/z = 152$ $[\text{M} + \text{H}]^+$), **3**: 2-ethylpyridine-4-carboxamide ($R_t = 34.7$ min, $m/z = 151$ $[\text{M} + \text{H}]^+$), **9**: 1,2-bis(2-ethylpyridin-4-yl)ethane-1,2-dione ($R_t = 43.3$ min, $m/z = 269$ $[\text{M} + \text{H}]^+$), **2**: ethionamide *S*-oxide ($R_t = 45.7$ min, $m/z = 183$ $[\text{M} + \text{H}]^+$), **4**: 2-ethylpyridine-4-carbonitrile ($R_t = 53.8$ min, $m/z = 133$ $[\text{M} + \text{H}]^+$), **8**: methyl 2-ethylpyridine-4-carboxylate ($R_t = 56.0$ min, $m/z = 166$ $[\text{M} + \text{H}]^+$). ETH **1** ($m/z = 167$ $[\text{M} + \text{H}]^+$) eluted at $R_t = 49.1$ min under the same conditions.

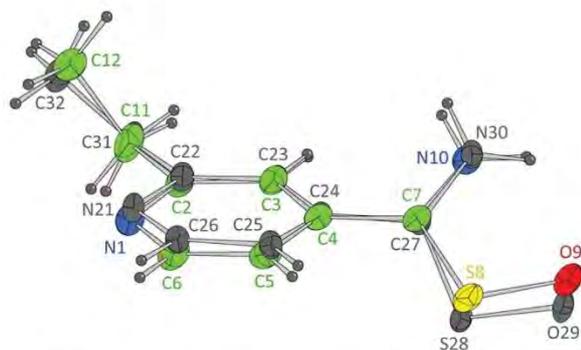


Fig. 4 CAMERON drawing of the 2 superimposed molecules ETH-SO₂ of the asymmetric unit. Selected bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$] for the two molecules: C(4)–C(7) = 1.476(2), C(24)–C(27) = 1.484(2), C(7)–S(8) = 1.679(2), C(27)–S(28) = 1.671(2), C(7)–N(10) = 1.314(2), C(27)–N(30) = 1.319(2), S(8)–O(9) = 1.527(2), S(28)–O(29) = 1.536(2), C(4)–C(7)–S(8) = 118.94(12), C(24)–C(27)–S(28) = 115.53(11), C(4)–C(7)–N(10) = 121.78(14), C(24)–C(27)–N(30) = 121.49(13), C(7)–S(8)–O(9) = 105.67(7), C(27)–S(28)–O(29) = 106.34(7).

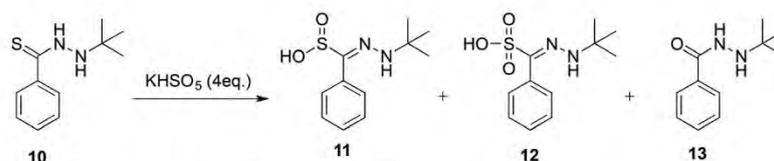
consistent with the average reported S–O distance in sulfoxides (1.497(13) \AA).¹⁸

In the experiment of ETH oxidation by H_2O_2 (or other oxidizing agents with more than 1 equivalent), the proportion of ETH-SO diminished over time, as expected, because it should undergo a second oxidation step and then be converted into the classical ETH final oxidation products. Although the final oxidation products could be identified by mass spectrometry, no element evidenced sulfinic acid **6** formation, which might be formed if the second oxidation occurs through a similar mechanism to that of the first oxidation. This suggests that this intermediate is too unstable to be identified and isolated (as already proposed by other authors)¹⁹ or that it is not the precursor of the stable final oxidative metabolites. Due to our

interest in the oxidative reactions of thiocarbonyl containing compounds, we also extended this study to another closely related substrate, the *N*-*tert*-butyl benzenecarbothiohydrazide **10** (Scheme 2). In this case, the reaction of **10** with an excess of KHSO_5 led to the formation of three compounds **11**, **12** and **13** in a relative yield of 50%, 40% and 3%, respectively, showing that the formation of a sulfinic acid, as an oxidized compound, is plausible and that it is stable enough to be detected. Based on this result one can question whether the sulfinic acid **6** is really the precursor of the ETH metabolites. It is interesting to note that as for the oxidation of ETH by EthA *in vitro*, in this experiment using **10** as the substrate, hydrazide derivative **13**, corresponding to the amide derivative of ETH, was also formed.

When the activation of ETH was performed in the presence of NAD^+ (2 to 5 equivalents), no new peak could be observed in the experiment using $\text{H}_2\text{O}_2/[\text{DMRF1Et}]^+[\text{ClO}_4]^-$ (Table 1, entry 5). However, two new products were detected at $R_t = 28.5$ and 29.2 min (**14** and **15**, respectively, Fig. 5A) using KHSO_5 , H_2O_2 or *m*-CPBA as the oxidant (Table 1, entries 1–4 and 6). The inline mass spectra (ESI (\pm), Fig. 5B and C) clearly show, besides the presence of typical fragments resulting from the rupture of the C–N⁺ bond linking the pyridinium ring to the ribose moiety ($m/z = 542$ and 256 ($[\text{M} + \text{H}]^+$ of both fragments in the positive mode)) (Fig. 6). However, no quantification of the amount of produced adducts was realized since the overall yield estimated for adduct formation (HPLC areas) is about 5%.

Traces of dihydropyridine-type adducts were also detected after five minutes of reaction (retention time of 33.3 and 35.5 min, partially co-eluted with metabolite **3**) when using 2 equivalents of KHSO_5 as the oxidizing agent (for instance, Table 1, entry 1) but were quickly oxidized to provide ETH-

Scheme 2 Oxidation of *N*-tert-butyl benzenecarbothiohydrazide **10** by KHSO_5 .Table 1 Oxidation of ETH (**1**) and ETH-SO (**2**) in the presence of a NAD^+/NADH cofactor

Entry	Substrate	Oxidation system	Cofactor	Reaction time	Adducts detection (14 + 15)
1	ETH	KHSO_5 (2 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	5 min	+(and traces of DHP)
2	ETH	KHSO_5 (2 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	90 min	+
3	ETH	KHSO_5 (4 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	5 min	+++
4	ETH	H_2O_2 (10 eq.)	NAD^+ (1 eq.)	180 min	+
5	ETH	H_2O_2 (10 eq.)/[DMRFIEt] ⁺ [ClO ₄] ⁻ (0.2 eq.)	NAD^+ (1 eq.)	180 min	—
6	ETH	<i>m</i> -CPBA (2 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	+++ ^a
7	ETH	Peracetic acid (4 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	—
8	ETH-SO	KHSO_5 (2 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	5 min	+(and traces of DHP)
9	ETH-SO	KHSO_5 (2 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	90 min	+++ (and traces of DHP)
10	ETH-SO	KHSO_5 (4 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	5 min	++
11	ETH-SO	H_2O_2 (2 to 20 eq.)	NAD^+ (2–4 eq.)	180 min	+
12	ETH-SO	H_2O_2 (3 eq.)	NADH (2 eq.)	90 min	++ (and ++ DHP)
13	ETH-SO	H_2O_2 (6 eq.)/AIBN (cat.)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	—
14	ETH-SO	H_2O_2 (0–20 eq.)/K ₃ FeCN ₆ (1 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	— ^b
15	ETH-SO	H_2O_2 (10 eq.)/[DMRFIEt] ⁺ [ClO ₄] ⁻ (0.2 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	—
16	ETH-SO	<i>m</i> -CPBA (2 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	++ ^a
17	ETH-SO	Peracetic acid (4 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	—
18	ETH-SO	MMPP (3–5 eq.)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	— ^c
19	ETH-SO	Mn ^{III} pyrophosphate (4 eq.)	NAD^+ (5 eq.)	180 min	—
20	ETH-SO	Air (bubbling)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	+
21	ETH-SO	O ₂ (bubbling)	NAD^+ (2 eq.)	180 min	+

DHP = dihydropyridine. ^a Filtration of the oxidation media before LC-MS injection. ^b No adduct. Pyridine *N*-oxide formation observed for all oxidation end-products. ^c MMPP oxidation by-products observed in the same region as ETH-NAD adducts.

NAD^+ adducts in the oxidized (pyridinium) forms (**14** and **15**). The oxidative system is obviously too strong to maintain these adducts in their reduced form. This is coherent with the observation that the pyridinium adduct is an oxidation by-product of the dihydropyridine scaffold in the INH-NAD adduct series¹¹ and indicates that the 1,4-dihydropyridine type adducts are formed in our oxidizing system prior to further oxidation. We did not succeed in isolating these different compounds due to a poor yield of formation, partial degradation and/or oxidation during HPLC collection and lyophilisation work up. However, the presence of the ETH-NAD adducts was also confirmed by high resolution mass spectrometry (HR-MS) in a system coupled to UPLC and eluted under the same conditions. In the positive mode (ESI (+)), two oxidized adducts (two diastereoisomers) have been detected in the UPLC chromatogram monitored at 260 nm with retention times of 23.8 and 24.4 min. The HR-MS spectra extracted from these peaks displayed *m/z* at 797.1698 amu and 797.1685 amu (*z* = 1), respectively, that matched the theoretical mass of 797.1697 amu for the pyridinium-type ETH-NAD adduct with a molecular formula of $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_{15}\text{P}_2$ ($[\text{M}^+]$). In the negative mode (ESI (-)), these two peaks also exhibited mass spectra that match the ETH-NAD molecular formula with the

measured mass values of 795.1523 amu and 795.1527 amu, respectively, for a theoretical mass of 795.1541 amu for the pyridinium-type ETH-NAD adduct with a molecular formula of $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_8\text{O}_{15}\text{P}_2$ ($[\text{M}^+ - 2\text{H}]^-$). The mass of a dihydropyridine-type ETH-NAD adduct was also detected in the negative mode for a small peak eluted at 22.7 min (observed mass: 797.1683 amu, theoretical mass for $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_{15}\text{P}_2$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$): 797.1697 amu). Finally, when synthetic ETH-SO **2** is used in our oxidation assays in the presence of NAD^+ (Table 1, entries 8–11 and 16) or NADH (entry 12) similar chromatographic profiles, displaying the presence of adducts **14** and **15**, were obtained to that when starting from ETH.

By analogy to INH, these results suggest that the iminoyl or aroyl radicals are probably formed during the oxidative pathway of ETH. This assumption is supported by the mass spectrometry detection of compound **9** (obtained in the experiment carried out in the absence of NAD^+), which probably arose from dimerization of the short-lived iminoyl radical followed by a reduction step in SM. In order to obtain more pieces of evidence for iminoyl or aroyl radical formation as intermediates (**7** and **16**, respectively), we also tried to identify these radicals through some experiments of the ESR spin trapping technique using PBN (phenylbutyl nitron), which is

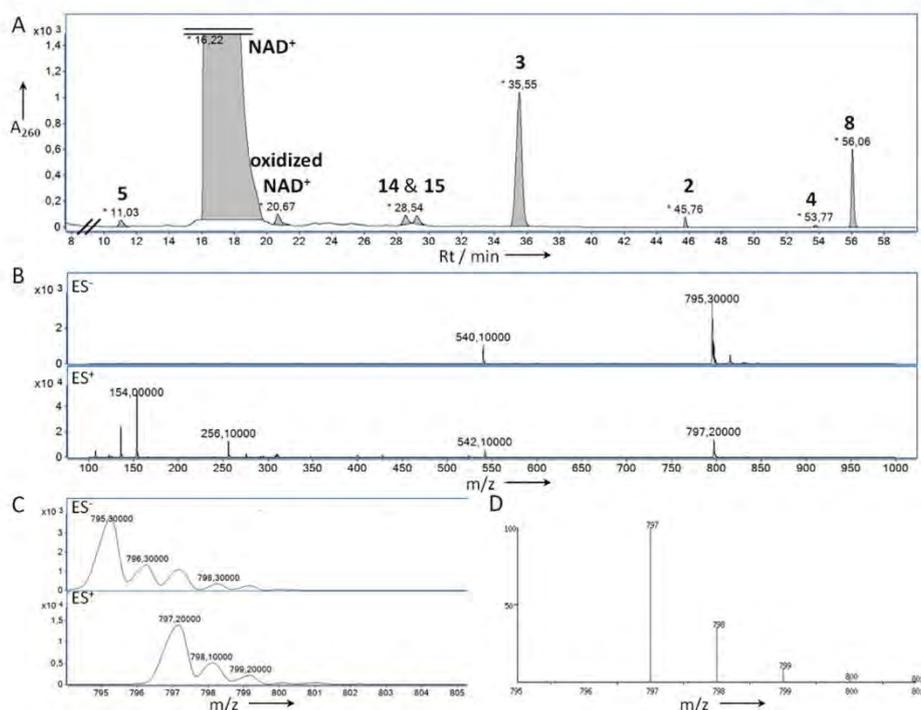


Fig. 5 HPLC-MS profile of the reaction mixture containing ETH (200 mM), NAD⁺ (400 mM) and KHSO₅ (800 mM) in 400 μ L of H₂O/MeOH (3 : 1 v : v). The mixture was diluted 40 fold in water before injection. (A) Chromatogram at 260 nm. Eluted peaks (by increasing retention time (R_t)): **5**: 2-ethylpyridine-4-carboxylic acid ($R_t = 11.0$ min, $m/z = 152$ [M + H]⁺), NAD⁺ ($R_t = 16.2$ min, $m/z = 664$ [M⁺]), oxidized NAD⁺ ($R_t = 20.7$ min, $m/z = 694$ [M⁺]), **14** and **15**: ETH-NAD⁺ adducts ($R_t = 28.5$ and 29.2 min, $m/z = 797$ [M⁺]), **3**: 2-ethylpyridine-4-carboxamide ($R_t = 35.5$ min, $m/z = 151$ [M + H]⁺), **2**: ethionamide *S*-oxide ($R_t = 45.8$ min, $m/z = 183$ [M + H]⁺), **4**: 2-ethylpyridine-4-carbonitrile ($R_t = 53.8$ min, $m/z = 133$ [M + H]⁺), **8**: methyl 2-ethylpyridine-4-carboxylate ($R_t = 56.1$ min, $m/z = 166$ [M + H]⁺). (B) ESI (-) (upper) and ESI (+) (lower) mass spectra for ETH-NAD adducts **14** and **15**. (C) Observed isotopic profile for ETH-NAD adducts **14** and **15** in negative (upper) and positive (lower) modes. (D) Theoretical isotopic profile for C₂₉H₃₅N₈O₁₅P₂ [M⁺] (positive mode).

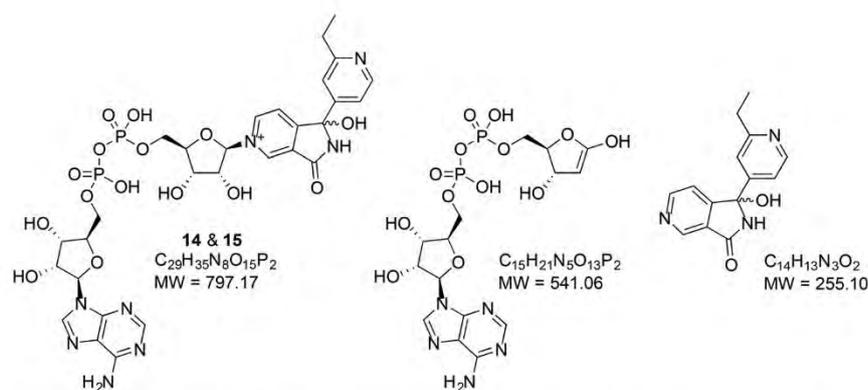


Fig. 6 Structure of the parent molecules and their fragments observed in mass spectra for ETH-NAD pyridinium-type adducts **14** and **15**.

known to be a potent trapper of carbon-centered radicals. These experiments were performed with ETH-SO/KHSO₅ (ETH is not soluble enough under the ESR conditions) and with INH/manganese pyrophosphate for comparison. As already described for the enzymatic oxidation of INH by the KatG enzyme in the presence of PBN,²⁰ the chemical reaction of

INH, Mn^{III} pyrophosphate and PBN showed a six-line ESR signal (g -value of 2.0060 and apparent hyperfine splitting constants of $a_N = 15.7$ G and $a_H = 3.4$ G, Fig. 7A). Several propositions have been reported in the literature considering the nature of the INH-derived radical (acyl, pyridyl or acyl peroxy) trapped by PBN or structurally related POBN,^{20,21} however,

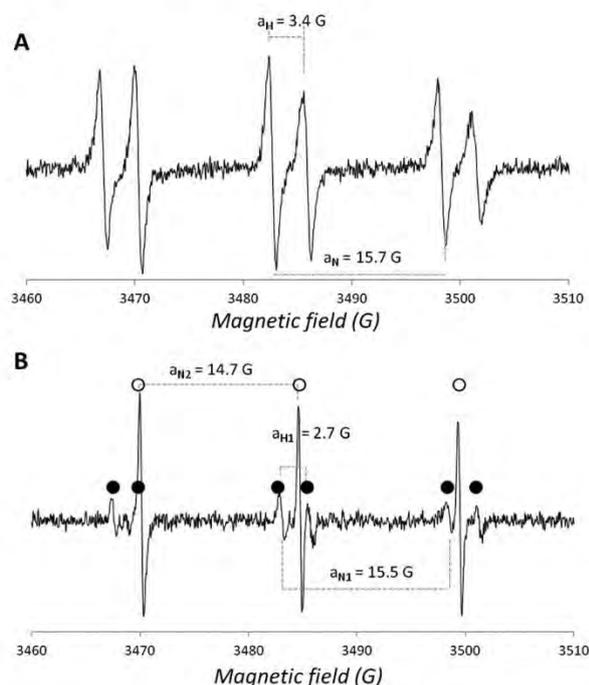


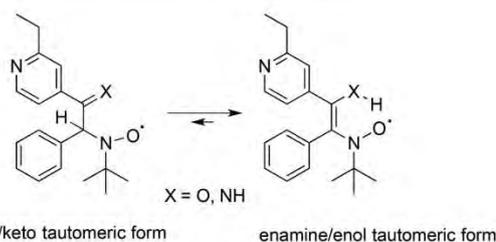
Fig. 7 ESR signals for PBN-spin trap experiments. (A) Mixture of INH (5.1 mM), Mn^{III} pyrophosphate (4.1 mM) and PBN (20.4 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). (B) Mixture of ETH-SO (5 mM), KHSO_5 (20 mM) and PBN (20 mM) in phosphate buffer (40 mM, pH 7.4). Two different signals (signals 1 and 2, black and open circles, respectively) are observed under these conditions.

under our conditions, the existence of the aroyl radical has also been supported by the formation of INH-NAD adducts. In the case of ETH-SO (the same concentration as INH), the oxidation by four equivalents of KHSO_5 in the presence of PBN showed two distinct signals of different intensities. The less intense one appears as a triplet of doublet ($g = 2.0060$, $a_{\text{N}} = 15.4$ G and $a_{\text{H}} = 2.7$ G, Fig. 7B, black circles), whose hyperfine splitting constants are in accordance with that of the control experiment (KHSO_5/PBN alone). Indeed, a hydroxyl radical can occasionally be formed from KHSO_5 and trapped by PBN. However, in the presence of ETH-SO the relative signal was significantly more intense than in the control experiment and could thus be assigned to the trapping, by PBN, of a hydroxyl radical resulting from the oxidation of ETH-SO by KHSO_5 . Moreover, the observed hyperfine splitting constants are in accordance with the ESR literature data for a PBN-OH adduct.²² This proposal was also checked by performing an experiment of photolysis of H_2O_2 in the presence of PBN at pH = 6.4, which provides the same ESR signal. Altogether, these results suggested that one of the species trapped in ETH oxidative activation was a hydroxyl radical. The second signal, very intense, is as a triplet very likely attributed to a carbon-centered radical as the ETH-PBN adduct ($g = 2.0057$, $a_{\text{N}} = 14.7$ G, Fig. 7B).

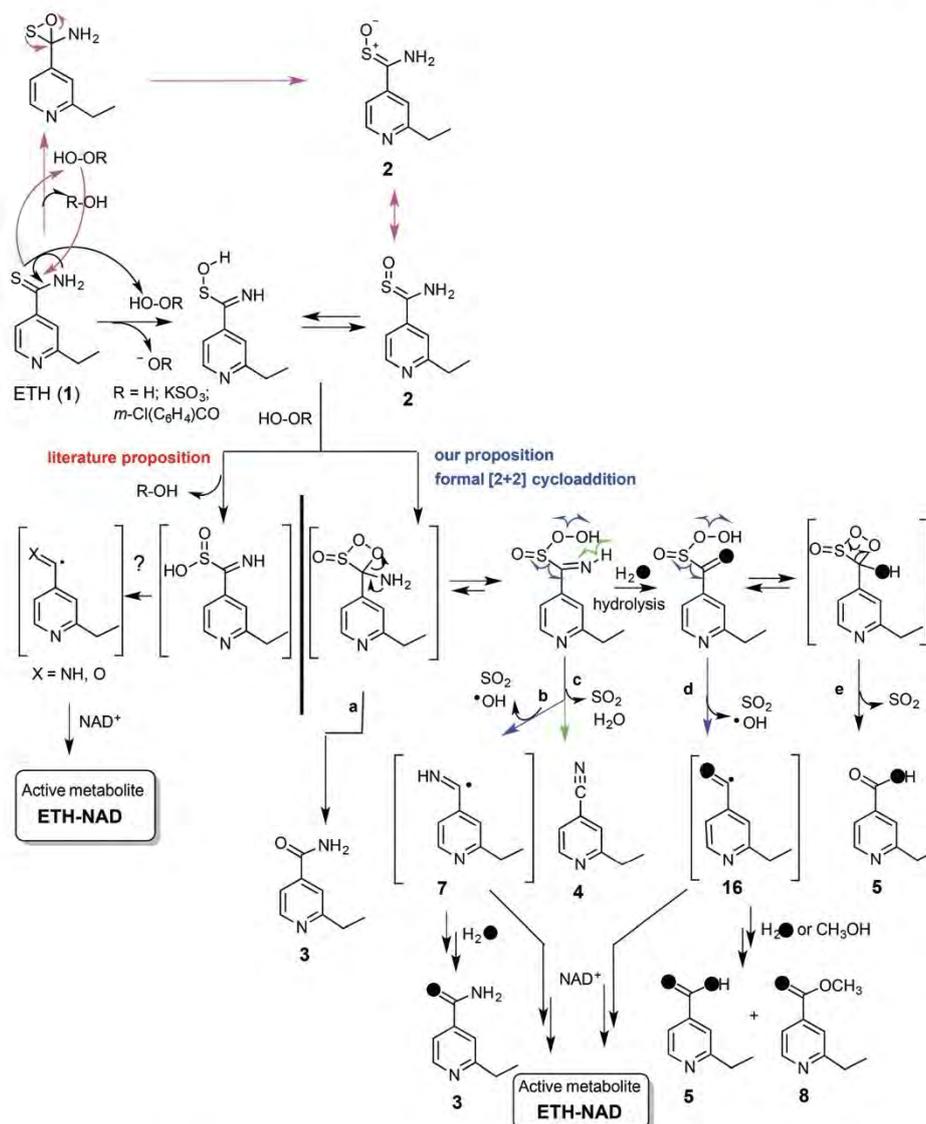
The hyperfine splitting constant a_{N} of the putative ETH-PBN adduct formed in these reactions is smaller than that of the INH-PBN adduct. Furthermore, the simplicity of this latter signal, with respect to regular carbon-centered radicals trapped by PBN, due to the disappearance of a hyperfine splitting constant ($a_{\text{H}} = 2.7$ G), is also intriguing. To explain this signal, we propose the existence of an enamine/enol-PBN radical (instead of the tautomeric imine/keto-PBN radical form), which involves the disappearance of α -hydrogen in the α position relative to the nitrogen and subsequently the lack of the small hyperfine splitting constant (Scheme 3). Interestingly, this observation also strongly supports iminoyl/aroyl radical formation compared with pyridyl or acyl peroxy forms for which the presence of a three-line ESR signal is not possible.

Altogether, these observations suggest that the most challenging in the activation of ETH into its active metabolites is the second oxidation reaction.⁴ The differences in these two steps suggest that the mechanism of the two oxidations should be quite different. Based on the results of this work, we propose a mechanism for ETH activation involving indeed two different oxidative steps with several competitive pathways at the second oxidation and able to explain the formation of the iminoyl/aroyl and hydroxyl radical species and also that of all ETH described metabolites (Scheme 4).

In this proposition sulfinic acid **6** is neither the precursor of the iminoyl/aroyl radical nor the amide **3** and nitrile **4** compounds, as has been proposed in the literature for oxidation of thioamides.^{4,9,19} The first oxidation of the thioamide group occurs with sulfur acting as a nucleophile²³ upon peroxide (or peracetic acid) and then leads to the already identified *S*-oxide ethionamide (**2**) (via an epoxide like intermediate or via an $\text{S}_{\text{N}}2$ -like reaction). Differently from the mechanism that has been previously proposed by Hanzlik²⁴ and others^{9,19} for thioamide oxidation, in which the sulfur of the *S*-oxide thionamide behaves as an electrophile to form sulfinic acid and then the latter decomposes through a not well documented C-S homolytic bond scission,²⁴ we propose that **2** behaves as a “ketene-like” compound acting via a formal [2 + 2] cycloaddition reaction with peroxide to give a dioxetane intermediate (Scheme 4). This unstable 4-membered intermediate in equilibrium with its open tautomeric form can undergo hydrolysis and decomposition through different pathways, which would lead to the iminoyl and hydroxyl radical formation and also



Scheme 3 Tautomeric equilibrium of the ETH-PBN radical adduct.



Scheme 4 Proposed mechanism for ETH metabolic activation leading to the formation of active and non-active metabolites, illustrated by H₂¹⁸O (H₂●) labelled experiments.

that of different metabolites observed for ETH oxidation. The dioxetane intermediate can directly decompose to give amide 3 (pathway a). In this pathway the oxygen atom of the amide comes from the oxidizing agent and nitrile metabolite 4 is not an intermediate in the amide formation.²⁴ When the dioxetane intermediate tautomerises into the open peroxide, it subsequently decomposes, *via* a homolytic scission of the O–O bond, inducing a homolytic cleavage of the C–S bond and then yielding the [•]OH radical, SO₂ and the iminoyl (7)/aroyl (16) radical (that can react with NAD⁺ if present to yield the final active metabolites) (pathways b and d). It is interesting to note that the mechanism postulated herein is in accordance with the ESR spin trapping studies for the reaction of ETH-SO with KHSO₅, in which it was demonstrated that hydroxyl and

carbon-centered radicals are formed during the second oxidative step. The iminoyl/aroyl radicals in the presence of H₂O and methanol, when used as co-solvents in *in vitro* experiments, can also be converted into the non-active metabolites amide 3, acid 5 and ester 8. By this route, at least one oxygen atom of 3, 5 and 8 comes from the solvent (H₂O or methanol when employed). Finally, it is also possible that the open peroxide intermediate undergoes, *via* a 6-membered intermediate, a concerted reaction involving three homolytic bond cleavages (N–H, O–O and C–S) and affording nitrile 4, SO₂ and H₂O (pathway c). This formal [2 + 2] cycloaddition mechanism is also consistent with the fact that ETH–NAD adducts were also detected in the experiment of ETH oxidation by air or oxygen and in the presence of NAD⁺. Indeed, the molecular oxygen, as

Table 2 Incorporation of ^{18}O during oxidation of ETH by H_2^{18}O (97% isotopic enrichment)

Metabolite	R_t (min)	Molecular peak	%	Implied pathway ^a (origin of oxygen atom incorporation)
2 ^b	43.1	183 $[\text{M} + \text{H}]^+$	100%	From an oxidizing agent
3 ^b	32.8	151 $[\text{M} + \text{H}]^+$	40%	From an oxidizing agent (pathway a)
		153 $[\text{M} + \text{H}]^+$	60%	From H_2^{18}O (pathway b)
5	11.0	152 $[\text{M} + \text{H}]^+$	1%	From residual H_2O in H_2^{18}O
		154 $[\text{M} + \text{H}]^+$	29%	From an oxidizing agent + hydrolysis by H_2^{18}O (pathway e)
		156 $[\text{M} + \text{H}]^+$	70%	Hydrolysis by H_2^{18}O + from H_2^{18}O (pathway d)
8	53.3	166 $[\text{M} + \text{H}]^+$	6%	Hydrolysis by residual H_2O + from MeOH (pathway d)
		168 $[\text{M} + \text{H}]^+$	93%	Hydrolysis by H_2^{18}O and from MeOH (pathway d)

^a Implied pathway according to Scheme 4. ^b ETH-SO 2 and 2-ethylpyridine-4-carboxamide 3 do not exchange their oxygen in water.

a bi-radical, can cyclize with the double bond of the ETH-SO intermediate 2 *via* a cycloaddition reaction. Besides, we can find in the literature other examples of sulfenic acid being involved in [4 + 2] cycloaddition reactions.²⁵

In order to provide further evidence for this mechanism, isotopic labelling experiments were carried out using H_2^{18}O (97% isotopic enrichment) and analysed by HPLC-HRMS analyses (in positive mode) focusing on oxygen-containing metabolites 2, 3, 5 and 8. When ETH was oxidized with H_2O_2 in H_2^{18}O , the in-line mass spectrum of the peak corresponding to ethionamide *S*-oxide 2 displayed an ion at m/z 183 amu, assigned to $[\text{M} + \text{H}]^+$ of ETH-SO 2, for which, as expected, no labelled oxygen atom was incorporated (Table 2). In-line mass analysis of the peak eluting at 11.0 min showed a $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion at m/z 152, 154 and 156 amu indicating that in the case of acid 5, no incorporation, mono and double incorporations of ^{18}O from H_2^{18}O occurred. The percentage of non-labelled oxygen incorporation in 5 is very low (Table 2) and it can be explained by the non-total label of the reagent (H_2^{18}O 97%). It is interesting to note that for methyl ester 8 (non-labelled organic co-solvent) only unlabelled and mono-labelled esters were detected. Finally, for amide 3, which can arise from the iminoyl radical 7 (pathway b) or from the decomposition of dioxetane, (pathway a, Scheme 4), two $[\text{M} + \text{H}]^+$ ions at m/z 151 and 153 amu were identified. The identification of these non-labelled and labelled molecular ions and the percentage of ^{18}O incorporation strongly support the ETH activation mechanism proposed in this paper.

Conclusions

The first biomimetic ETH activation methods were developed in this work (using KHSO_5 , H_2O_2 , or *m*-CPBA). These simple oxidation systems are interesting because, in contrast to other oxidizing agents that only lead to stable non-active compounds (3, 4 and 5), they allow the production of short-lived reactive species such as iminoyl or aroyl radicals and mainly the first non-enzymatic (cell based) formation of the ETH-NAD adducts lethal for mycobacteria.

Moreover, this work discloses a new and more convincing oxidative mechanism of ETH activation. It does not involve sul-

finic acid as an intermediate as was proposed in the literature but puts forward an original and unprecedented chemical reactivity for the *S*-oxide ethionamide that acts *via* a formal [2 + 2] cycloaddition reaction. Furthermore, the proposed ETH activation mechanism is also consistent for the first time with the formation of all non-active (3, 4 and 5) and active (ETH-NADH adduct) metabolites. As the ETH activation enzyme, EthA, is a flavin-containing monooxygenase involving also a peroxide group, this work also contributes to gain insights into how ETH can be metabolically activated inside MTB. In addition, the proposed mechanism involving oxygenated radical species formation (hydroxyl radical) may also explain, in part, the toxic side effects of the thioamide functional group present in many drugs,^{26,27} which are generally more associated with their oxidative metabolites than to the parent drug.

Experimental section

General

All solvents and commercially available reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Acetonitrile and methanol were of chromatographic grade and water used in the experiments was ultra-purified using a Milli-Q system (Millipore). The melting points were determined on an Electrothermal 9300 capillary melting point apparatus and are not corrected. Infra-red spectra were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR spectrum 100 spectrometer with ATR functionality. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer at 400 and 500 MHz using $\text{DMSO}-d_6$ as the solvent. Desorption chemical ionization (DCI) mass spectra were acquired on a Finnigan TQS 7000 spectrometer. Fresh peracetic acid was prepared for each new experiment according to Xie *et al.*²⁸ KHSO_5 (Oxone®) is the triple salt (2 KHSO_5 , KHSO_4 and K_2SO_4) purchased from Aldrich. Manganese pyrophosphate (Mn^{III} pyrophosphate)¹¹ and 5-ethyl-3-methyl-2',4':3',5'-di-*O*-methyleneriboflavinium perchlorate ($[\text{DMRF1Et}]^+[\text{ClO}_4]^-$) catalyst¹⁶ were synthesized as previously described. H_2^{18}O (97.0% isotopic enrichment) was supplied by Eurisotop. ETH-SO 2 and *N*-*tert*-butylbenzenecarbothiohydrazide 10 were prepared according to a previously reported procedure.^{5,29}

Selected conditions for ETH and ETH-SO oxidation in the presence of NAD⁺ (see Table 1)

ETH (1)/KHSO₅ (2 eq.): the reaction medium (400 μL of a water/methanol solution (3/1: v/v)) containing ETH (130 mM), βNAD⁺ (250 mM) and KHSO₅ (260 mM) was stirred at room temperature (1400 rpm) and injected (after a 40-fold dilution in water) for HPLC-MS (or UPLC/HR-MS) studies after 5 minutes and 90 minutes of reaction.

ETH-SO (2)/H₂O₂ (8 eq.): the reaction medium (500 μL of a water/methanol solution (4/1: v/v)) containing ETH-SO (30 mM), βNAD⁺ (120 mM) and H₂O₂ (240 mM) was stirred at room temperature (1400 rpm) and injected (after a 40-fold dilution in water) for HPLC-MS studies after 5 minutes, 90 minutes and 180 minutes of reaction.

Isotopic enrichment experiments with H₂¹⁸O

H₂O₂ (88.2 mmol) in H₂¹⁸O (88.2 mmol) was added to a solution of ETH (1, 2.1 mg, 12.6 mmol) or ETH-SO (2, 2.3 mg, 12.6 mmol) in 400 μL of a H₂¹⁸O/methanol solution (3/1: v/v). The mixture was then stirred at room temperature (1400 rpm) for 3 hours and injected for UPLC/HR-MS studies.

Conditions for oxidation of compound 10

The reaction medium (500 μL of water) containing phosphate buffer (50 mM; pH 7.4), compound 10 (0.5 mM in DMSO) and KHSO₅ (2.0 mM) was stirred at room temperature for 5 min before adding HEPES buffer (5.0 mM) and HPLC-MS analysis was performed immediately.

HPLC/MS analyses

HPLC/MS analyses were performed on an Agilent 1200 HPLC system equipped with an Agilent G1314B variable wavelength detector and coupled to an Agilent 6410-QQQ mass system with an electrospray ionization (ESI) source. The chromatographic column was an Eclipse XDB-C₁₈ column (5 μm, 4.6 × 150 mm) from Agilent. The eluting conditions consisted of a gradient of 10 mM NH₄OAc buffer pH 7.5 (solvent A) and acetonitrile (solvent B) with a flow rate of 0.5 mL min⁻¹, as follows: 0–5 min: 0% B; 5–36 min: linear gradient from 0 to 9% B; 36–55 min: linear gradient from 9% to 50% B; 55–65 min: isocratic at 50% B. Solvent B was then returned to 0% in 1 min and equilibration under the initial conditions was performed for 20 min before the next injection. UV detection was performed at 260 nm, and mass spectra acquisition was performed simultaneously in positive (ESI (+)) and negative (ESI (-)) modes.

UPLC/HR-MS analyses

UPLC/HR-MS analyses were performed with an UPLC chromatograph (ACQUITY UPLC from Waters) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Xevo G2-Q Tof from Waters). The column and the chromatographic system used were similar to those described for the HPLC-MS analyses. The mass spectrometer was operated in both positive and negative ion modes, using cone voltages of 30 V and 50 V.

HPLC analyses

HPLC analyses were performed on an Agilent 1200 HPLC system coupled to an Agilent 1260 Infinity photodiode array detector to confirm the identity of the products by collecting the UV-Vis spectra from 200 to 400 nm. The column and the chromatographic system used were similar to those described for the HPLC-MS analyses.

Spin trapping ESR analyses

All ESR spectra were recorded at ambient temperature (*ca.* 291 K) on a Bruker Elexsys-II E500 (X-Band) spectrometer. The samples were transferred to a precision capillary (Hirschmann, Duran, Ringcaps, 50 μL). The capillary was then placed inside a larger quartz tube so that the sample could be accurately and reproducibly positioned inside the resonator. All samples were prepared in 40 mM phosphate buffer pH 7.4, at 0 °C, by mixing appropriate amounts of ETH-SO (or INH) and PBN dissolved in phosphate buffer. The reactions were initiated by the addition of the oxidant (KHSO₅ or Mn^{III} pyrophosphate) in phosphate buffer. The first spectrum was recorded *ca.* 2 min after initiating the reactions. The following ESR instrument settings were used: modulation amplitude = 0.5 G, microwave power = 5.15 mW, attenuation of 16 dB with a repeated number of 2 scans. As a control, the photolysis of H₂O₂ (600 mM) in the presence of PBN (20 mM) was also performed in 40 mM phosphate buffer pH 7.4 by irradiating the ESR cell with a mercury lamp for 10 min, according to a procedure adapted from Janzen *et al.*³⁰

X-ray crystallographic study

Single crystals suitable for X-ray diffraction were coated with Paratone oil and mounted onto a goniometer. The X-ray crystallographic data were obtained from a Gemini Oxford

Table 3 Selected crystallographic data and refinement parameters of compound 2

	2
Formula	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₁ S ₁
<i>M</i> (g mol ⁻¹)	182.25
Crystal system, space group	Triclinic, <i>P</i> 1
<i>T</i> (K)	180
<i>a</i> (Å)	8.2425(11)
<i>b</i> (Å)	8.4394(10)
<i>c</i> (Å)	13.236(2)
<i>α</i> (°)	90.149(11)
<i>β</i> (°)	100.435(12)
<i>γ</i> (°)	104.134(11)
<i>V</i> (Å ³)	877.0(2)
<i>Z</i>	4
<i>ρ</i> _{calcd} (g cm ⁻³)	1.38
<i>μ</i> (mm ⁻¹)	2.894
Collected reflections	12 822
Unique reflections, <i>R</i> _{int}	3331, 0.040
Nb reflections (<i>I</i> ≥ 3σ(<i>I</i>))	2741
Nb parameters	217
Final <i>R</i> ₁ , <i>wR</i> ₂ (<i>I</i> ≥ 3σ(<i>I</i>)) ^{a,b}	0.0340, 0.0425

^a $R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$. ^b $wR_2 = [\sum (w(F_o^2 - F_c^2))^2] / \sum [(w(F_o^2))^2]^{1/2}$ where $w = 1/(\sigma^2(F_o^2) + (aP)^2 + bP)$ with $P = (2F_c^2 + \max(F_o^2, 0))/3$.

Diffraction diffractometer using a CuK α radiation source and equipped with an Oxford Cryosystem. The structure has been solved using SHELXS 86 and refined by means of least-squares procedures on F using the program CRYSTALS.³¹ The scattering factors for all the atoms were used as listed in the International Tables for X-ray Crystallography.³² Absorption correction was performed using a multi-scan procedure. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. The hydrogen atoms were all located in a difference map, and repositioned geometrically. The crystal data for the determined structure are given in Table 3.

Acknowledgements

The authors thank the Service Commun de Spectrométrie de Masse de l'ICT (Institut de Chimie de Toulouse) for UPLC-HRMS analyses and Lionel Rechignat (Laboratoire de Chimie de Coordination, Toulouse) for ESR measurements.

References

- 1 A. Banerjee, E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K. S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. Delisle and W. R. Jacobs, *Science*, 1994, **263**, 227.
- 2 D. A. Rozwarski, G. A. Grant, D. H. R. Barton, W. R. Jacobs and J. C. Sacchettini, *Science*, 1998, **279**, 98.
- 3 A. R. Baulard, J. C. Betts, J. Engohang-Ndong, S. Quan, R. A. McAdam, P. J. Brennan, C. Lochter and G. S. Besra, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 28326.
- 4 A. E. DeBarber, K. Mdluli, M. Bosman, L. G. Bekker and C. E. Barry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 9677.
- 5 T. A. Vannelli, A. Dykman and P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 12824.
- 6 X. Hanouille, J. M. Wieruszkeski, P. Rousselot-Pailley, I. Landrieu, A. R. Baulard and G. Lippens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **331**, 452.
- 7 X. Hanouille, J.-M. Wieruszkeski, P. Rousselot-Pailley, I. Landrieu, C. Lochter, G. Lippens and A. R. Baulard, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, **58**, 768.
- 8 F. Wang, R. Langley, G. Gulten, L. G. Dover, G. S. Besra, W. R. Jacobs and J. C. Sacchettini, *J. Exp. Med.*, 2007, **204**, 73.
- 9 C. R. Nishida and P. R. Ortiz de Montellano, *Chem.-Biol. Interact.*, 2011, **192**, 21.
- 10 M. W. Fraaije, N. M. Kamerbeek, A. J. Heidekamp, R. Fortin and D. B. Janssen, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 3354.
- 11 M. Nguyen, C. Claparols, J. Bernadou and B. Meunier, *ChemBioChem*, 2001, **2**, 877.
- 12 M. Nguyen, A. Quemard, S. Broussy, J. Bernadou and B. Meunier, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, **46**, 2137.
- 13 J. W. Frost and W. H. Rastetter, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 5242.
- 14 D. R. Doerge and M. D. Corbett, *Mol. Pharmacol.*, 1984, **26**, 348.
- 15 Y. Imada and T. Naota, *Chem. Rec.*, 2007, **7**, 354.
- 16 Y. Imada, H. Iida, S.-I. Murahashi and T. Naota, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 1704.
- 17 A. Bonamartini Corradi, C. Boga, L. Forlani and P. Sgarabotto, *J. Chem. Crystallogr.*, 1999, **29**, 115.
- 18 F. H. Allen, O. Kennard, D. G. Watson, L. Brammer, A. G. Orpen and R. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1987, S1.
- 19 N. Vale, P. Gomes and H. A. Santos, *Curr. Drug Metab.*, 2013, **14**, 151.
- 20 N. L. Wengenack and F. Rusnak, *Biochemistry*, 2001, **40**, 8990.
- 21 K. Ito, K. Yamamoto and S. Kawanishi, *Biochemistry*, 1992, **31**, 11606.
- 22 G. R. Buettner, *Free Radicals Biol. Med.*, 1987, **3**, 259.
- 23 R. Olojo and R. H. Simoyi, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 1018.
- 24 J. R. Cashman and R. P. Hanzlik, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 4645.
- 25 B. Zwanenburg, in *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 2004, vol. 27, p 135.
- 26 T. Ji, K. Ikehata, Y. M. Koen, S. W. Esch, T. D. Williams and R. P. Hanzlik, *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**, 701.
- 27 A. See, P. Hervio and M. Bouvry, *Ann. Gastroenterol. Hepatol.*, 1986, **22**, 129.
- 28 X. Xie, J. Liang, T. Pu, F. Xu, F. Yao, Y. Yang, Y.-L. Zhao, D. You, X. Zhou, Z. Deng and Z. Wang, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 9115.
- 29 J. Laborde, C. Deraeve, L. Lecoq, A. Sournia-Saquet, J.-L. Stigliani, B. S. Orena, G. Mori, G. Pratiel and V. Bernardes-Génisson, *ChemistrySelect*, 2016, **1**, 172.
- 30 E. G. Janzen, Y. Kotake and R. D. Hinton, *Free Radicals Biol. Med.*, 1992, **12**, 169.
- 31 P. W. Betteridge, J. R. Carruthers, R. I. Cooper, K. Prout and D. J. Watkin, *J. Appl. Crystallogr.*, 2003, **36**, 1487.
- 32 *International Tables for X-ray Crystallography*, ed. J. A. Ibers and W. C. Hamilton, Kynoch Press, Birmingham, England, 1974, vol. IV.

II.2. Résultats non publiés associés à l'article

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'activation de l'ETH, des études supplémentaires ont été réalisées comme l'utilisation du cofacteur NADP⁺ et l'étude de l'oxydation d'analogues structuraux de l'ETH et du thiacétazone, pro-drogue également activée par l'enzyme EthA.

II.2.1. Adduits avec le cofacteur NADP⁺

L'enzyme EthA est une monooxygénase à flavine fonctionnant avec le cofacteur NADPH et O₂ dépendante [131,136,137]. Cependant, le métabolite actif cristallisé dans la cible InhA montre une structure de type ETH-NADH et non ETH-NADPH comme cela pourrait être imaginé [131]. Par ailleurs, la formation d'adduits INH-NADP a été mise en évidence par activation chimique au manganèse (III) et ces adduits synthétiques se sont révélés être, *in vitro*, des inhibiteurs de l'enzyme MabA, impliquée dans le système d'élongation FAS-II des acides mycoliques mais leur formation *in vivo* n'a pas encore été démontrée [78]. Nous avons alors souhaité étudier la formation d'adduits ETH-NADP avec notre système biomimétique. Ainsi, un milieu réactionnel contenant l'éthionamide (66 mM), l'oxydant KHSO₅ (270 mM, 4 éq.) et le NADP⁺ (97 mM, 1,5 éq.) a été étudié en LC-MS, après 20 minutes d'agitation à température ambiante. Dans ces conditions, un adduit ETH-NADP de type pyridinium (MS (ESI+) $m/z = 877,1 [M]^+$) a pu être détecté en spectrométrie de masse mais uniquement à l'état de traces sur le chromatogramme HPLC, bien que ces conditions de réaction soient identiques à celles utilisées pour la formation des adduits ETH-NAD. Nous ne pouvons expliquer ce faible rendement et l'étude de cette réaction n'a pas été poursuivie. Le NADP⁺ possédant un groupement phosphate supplémentaire pouvant être chargé négativement en fonction des conditions, le temps de rétention entre le NAD⁺ et le NADP⁺ est significativement différent dans nos conditions. L'étude LC-MS de la réaction avec le NADP⁺ nécessite donc encore des optimisations pour les conditions d'élutions et de spectrométrie de masse. Cependant, ce travail démontre que la réaction entre la forme active de l'ETH et le cofacteur NADP est tout à fait faisable.

II.2.2. Oxydation d'analogues de l'ETH : pyridine-4-carbothioamide et benzothioamide

Afin de compléter notre étude mécanistique, nous avons analysé l'oxydation de deux analogues de l'ETH : la pyridine-4-carbothioamide (V-1) et le benzothioamide (V-7) (Figure

51 & Figure 53). Ces deux molécules sont activées par l'enzyme EthA, conduisant à la formation des dérivés *S*-oxyde et amide mais ne sont pas des antituberculeux du fait de leur toxicité [136,150]. La réaction étudiée est l'oxydation du thioamide **V-1** ou **V-7** (40 mM) par le KHSO_5 (80 mM) dans un milieu $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (2/1). Après 5 minutes d'agitation, la solution est injectée en LC-HRMS suivant les mêmes conditions que celles décrites dans l'article 3 précédemment présenté. Les chromatogrammes de ces réactions sont représentés ci-dessous (Figure 50 & Figure 52).

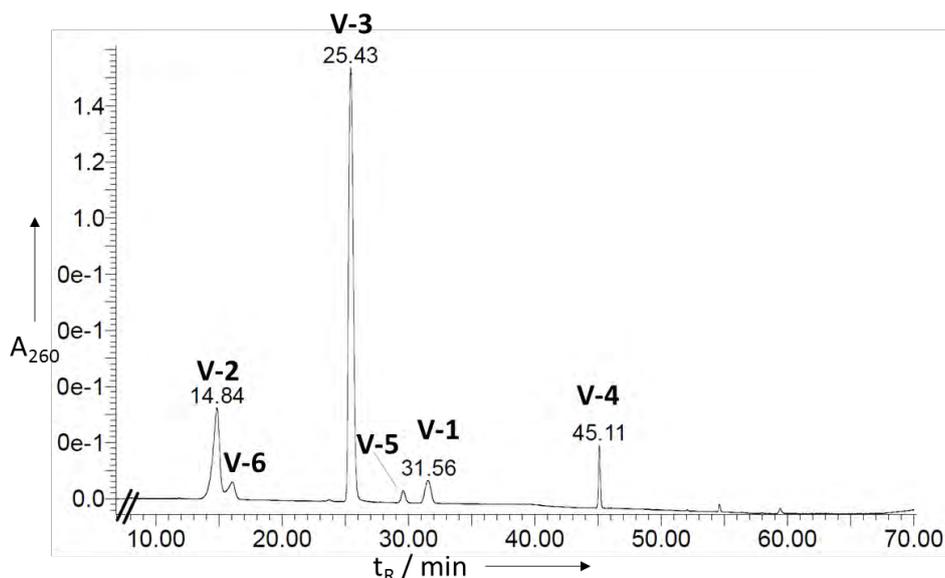


Figure 50 : Chromatogramme de la réaction d'oxydation de la pyridine-4-carbothioamide par KHSO_5

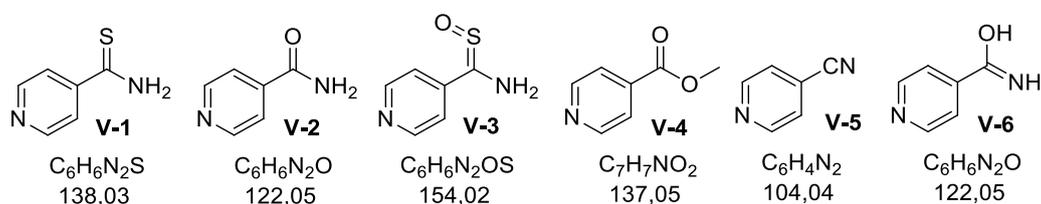


Figure 51 : Produits observés lors de l'oxydation de la pyridine-4-carbothioamide (formules brutes et poids moléculaire)

La réaction d'oxydation de la pyridine-4-carbothioamide (**V-1**) par KHSO_5 (2 éq) a généré comme produit principal l'intermédiaire *S*-oxyde **V-3** ($t_R = 25,43$ min ; $m/z = 155,02$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) et comme produits minoritaires le dérivé amide **V-2** ($t_R = 14,84$ min ; $m/z = 123,05$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) et le dérivé ester méthylique **V-4** ($t_R = 45,11$ min ; $m/z = 138,05$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). La réaction n'est pas totale puisqu'il reste du réactif de départ, la pyridine-4-carbothioamide (**V-1**) ($t_R = 31,56$ min ; $m/z = 139,03$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Deux pics minoritaires ont enfin été attribués au composé **V-6** à $t_R = 16,03$ min ($m/z = 123,05$) et au dérivé nitrile **V-5** à $t_R = 29,60$ min, dont la détection en masse est difficile. Avec un temps de réaction de seulement 5 minutes, le dérivé acide carboxylique n'est ici pas présent mais il est observé au bout de 3h de réaction ($t_R =$

4,08 min ; $m/z = 124,04 [M+H]^+$). La recherche d'un dérivé de type acide sulfinique n'a également pas révélé la formation de ce composé dans nos conditions, comme dans le cas de l'ETH. L'oxydation de la pyridine-4-carbothioamide (**V-1**) génère donc les mêmes métabolites que l'ETH, avec une cinétique de réaction comparable.

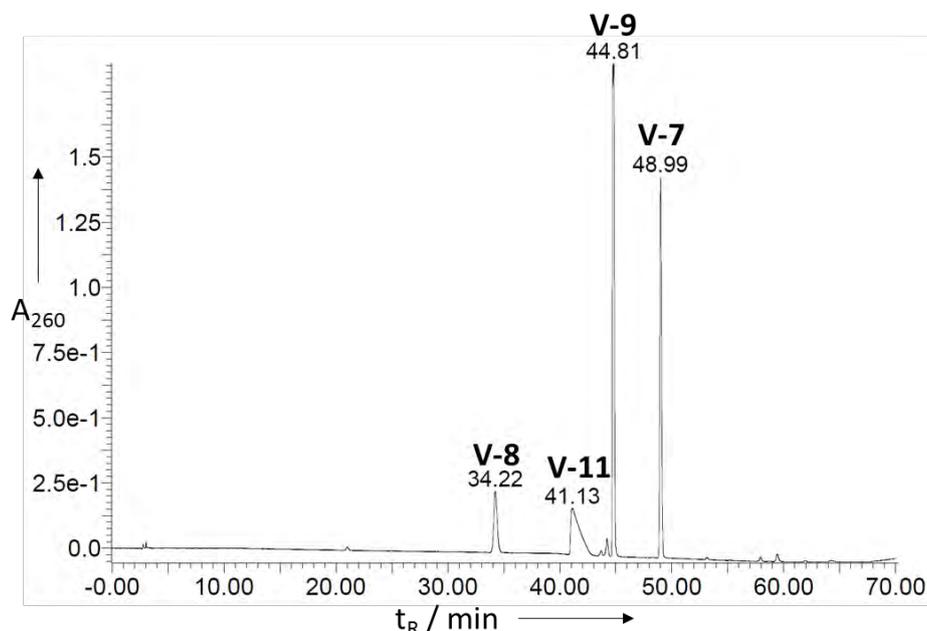


Figure 52 : Chromatogramme de la réaction d'oxydation du benzothioamide par $KHSO_5$

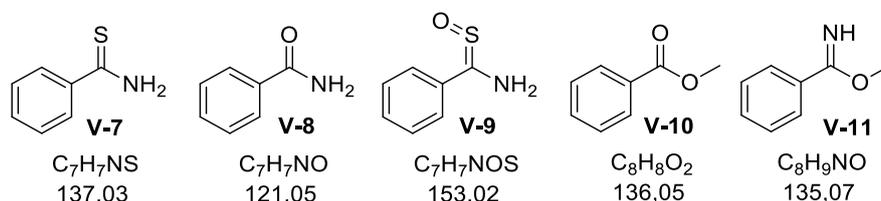


Figure 53 : Produits supposés de l'oxydation du benzothioamide (formules brutes et poids moléculaire)

La réaction d'oxydation du benzothioamide (**V-7**) par $KHSO_5$ (2 éq) semble quant à elle plus lente puisque la quantité de réactif de départ **V-7** ($t_R = 48,99$ min ; $m/z = 138,04 [M+H]^+$) restant à 5 minutes de réaction est bien plus importante que pour ETH ou la pyridine-4-carbothioamide (**V-1**). Le métabolite majoritaire correspond au dérivé *S*-oxyde **V-9** ($t_R = 44,81$ min ; $m/z = 154,03 [M+H]^+$) et le dérivé amide **V-8** ($t_R = 34,22$ min ; $m/z = 122,06 [M+H]^+$) est également présent. Ce chromatogramme montre également à la formation d'un nouveau dérivé à $t_R = 41,13$ min attribué au dérivé imidate **V-11** avec l'analyse HRMS montrant une masse $m/z = 136,0764 [M+H]^+$ et proposant une masse théorique calculée pour $C_8H_{10}NO$ à 136,0762. La formation de cet intermédiaire est en accord avec le mécanisme proposé de formation du radical iminoyle **V-12**. Contrairement au cas de l'ETH ou de la

pyridine-4-carbothioamide (**V-1**), nous constatons que l'hydrolyse des intermédiaires de type imine semble moins favorable (ou plus lente) dans le cas du benzothioamide (**V-7**) (Figure 54).

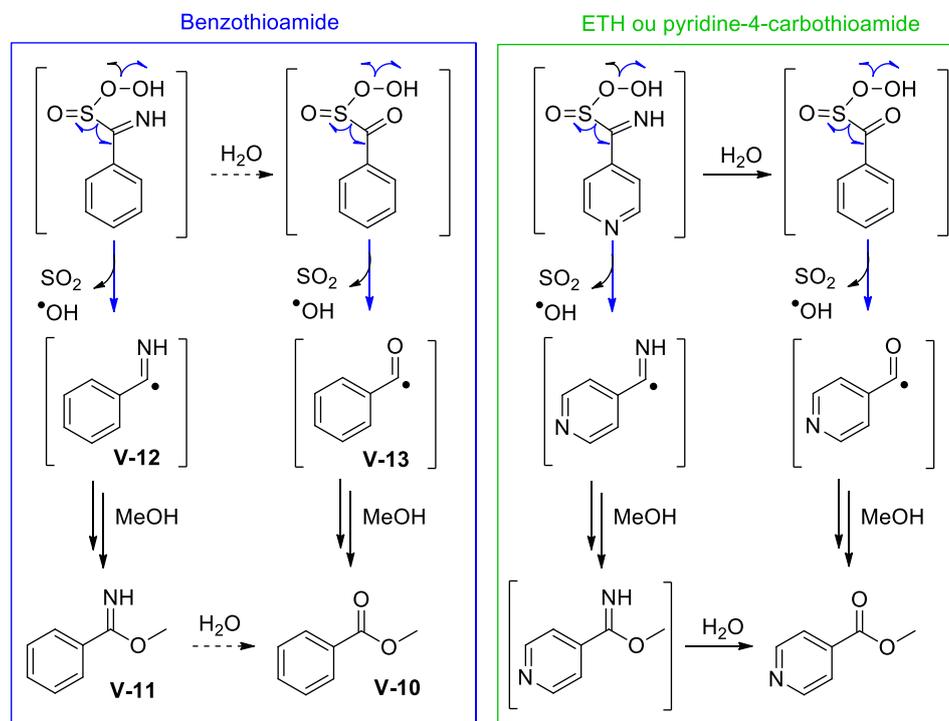


Figure 54 : Structures des radicaux iminoyl **V-12** et benzoyl **V-13** et mécanisme de formation du composé **V-11**

II.2.3. Oxydation du thiacétazone

L'enzyme EthA étant également impliquée dans l'activation des pro-drogues thiourées thiacétazone (TAC) et isoxyl (ISO) (Figure 55), nous avons voulu étudier si ces deux pro-drogues suivaient un mécanisme d'activation via une cycloaddition, similaire à celui proposé pour l'ETH [133,149,152]. Cependant, les mécanismes d'actions décrits pour ces deux pro-drogues ne sont pas complètement élucidés. Il est proposé que leur activation ne passe pas par un intermédiaire radicalaire comme pour l'ETH mais conduise à la création de pont disulfure entre l'atome de soufre du médicament et la fonctions SH d'un résidu cystéine d'enzymes essentielles pour le développement de la mycobactérie [151,154]. Les différents métabolites non-actifs et actifs décrits dans la littérature pour l'activation du TAC (et par analogie à l'activation de l'ISO) sont regroupés dans le schéma suivant (Schéma 33) [149,151,152].

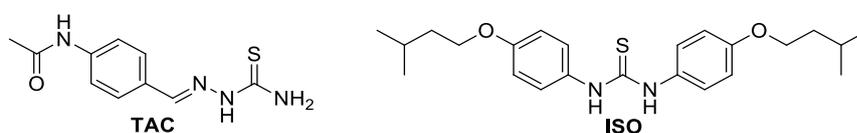


Figure 55: Structures du TAC et de l'ISO

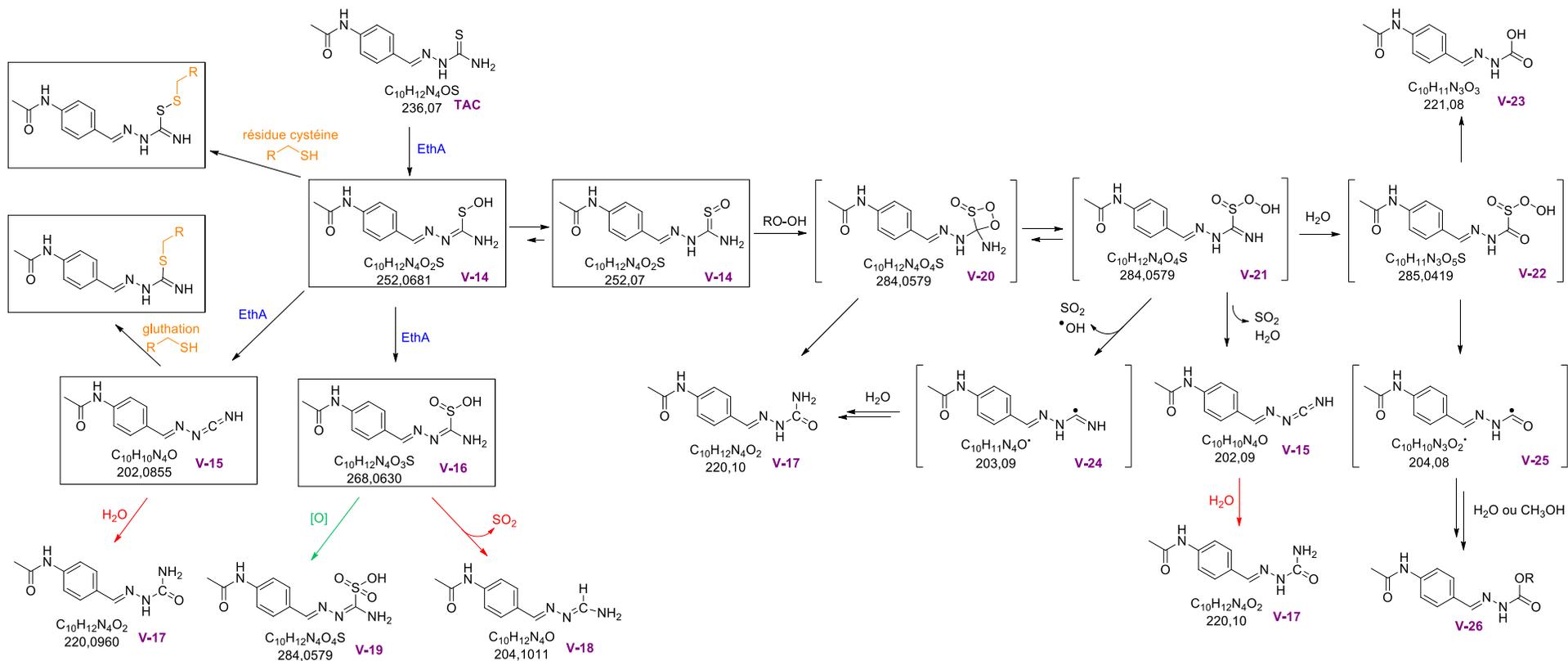


Schéma 33 : Mécanismes proposés pour l'activation du TAC. Les composés encadrés ont été identifiés dans la littérature [149,151,327].

Les flèches rouges correspondent aux observations faites pour l'analogue ISO lors d'une étude LC-MS des métabolites formés lors de l'oxydation de l'ISO par l'enzyme EthA [152]. La flèche verte permet d'expliquer la formation du composé V-19 observé en LC-MS. La partie de droite correspond à un mécanisme via une cycloaddition comme proposé pour l'ETH. Il est intéressant de noter que la formation des dérivés V-17 et V-15 peut aussi être expliquée par le mécanisme de cycloaddition [2+2].

Lors d'une activation par EthA, les composés majoritairement formés et observés par LC-MS sont le dérivé acide sulfonique V-16 et le dérivé carbodiimide V-17 [149]. Dans nos conditions, les composés majoritairement formés et observés en LC-MS sont les dérivés V-18 et V-19 (type acide sulfonique).

Nous avons choisi les meilleures conditions pour l'oxydation de l'ETH pour un suivi LC-MS et avons décidé de les appliquer à ces deux molécules. Malheureusement, le manque de solubilité de l'isoxyl nous a empêché de réaliser les expériences sur cette molécule. Pour le TAC, la réaction suivie par LC-HRMS correspond à l'oxydation de TAC (40 mM) en présence de KHSO_5 (80 mM) dans un milieu H_2O / méthanol contenant 10% de DMSO, agité 5 minutes et filtré avant injection. Le chromatogramme obtenu est représenté ci-dessous avec exactement les mêmes conditions LC-HRMS (ESI(+)) que celles décrites pour l'ETH dans l'article précédent (Figure 56).

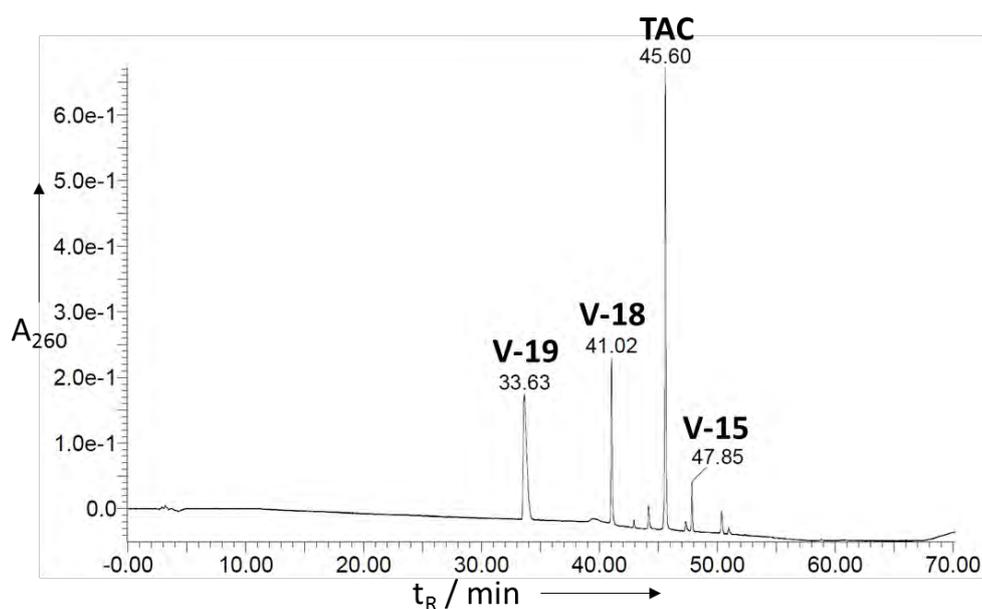


Figure 56 : Chromatogramme UV de la réaction d'oxydation du TAC par KHSO_5 .

Après 5 minutes d'agitation, la réaction n'est pas complète puisqu'il reste du TAC ($t_R = 45,60$ min, $m/z = 237,0819$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Le produit à $t_R = 33,63$ min correspond au composé **V-19** (forme sulfonique du TAC) avec une masse $m/z = 285,0660$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $m/z = 569,1233$ $[2\text{M}+\text{H}]^+$ pour une masse théorique calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ à 285,0658. Le produit à $t_R = 41,02$ min correspond au composé **V-18** avec une masse $m/z = 205,1090$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ pour une masse théorique calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$ à 205,1089. Le produit à $t_R = 47,85$ min semble correspondre au composé **V-15** avec une masse $m/z = 203,0936$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ pour une masse théorique calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}$ à 203,0933, cependant la présence d'une masse $m/z = 283,0867$ dans ce même pic reste inexplicée.

Les dérivés acide sulfénique **V-14** et acide sulfinique **V-16** n'ont pas été détectés dans nos conditions, le dérivé acide sulfonique **V-19** a quant à lui été détecté. Nous nous sommes posés la question de savoir si l'acide sulfinique **V-16** pouvait être observé dans nos conditions d'ionisation et si la présence du composé **V-18**, correspondant à la perte de SO_2 , avait lieu

dans le milieu réactionnel ou lors de l'ionisation du composé dans le spectromètre de masse. L'observation de l'acide sulfinique **V-16** en LC-MS décrite dans la littérature est réalisée dans les conditions suivantes : ionisation ESI positive ; tension capillaire de 3,5 kV ; tension de cône de 25 V ; température de désolvatation de 250 °C pour un débit de 0,2 mL.min⁻¹ [149,327]. Nos conditions sont : ionisation ESI positive ; tension capillaire de 3 kV ; tension de cône de 30 V ; température de désolvatation de 450 °C pour un débit de 0,5 mL.min⁻¹. La différence notable, entre les conditions de la littérature et les nôtres, est la température de désolvatation plus élevée dans nos expériences en raison d'un débit plus important. Cependant, ces conditions ne devraient pas entraîner une fragmentation totale de l'acide sulfinique **V-16** dont la masse n'est pas détectée dans nos conditions. L'acide sulfinique **V-16** se semble donc pas être présent dans notre milieu réactionnel et le composé **V-18** doit se former très probablement dans le milieu réactionnel. Ces résultats pourraient être également confirmés si l'analyse était refaite en diminuant la tension capillaire.

L'évolution au bout de 2 heures de la réaction entraîne l'augmentation du pic à $t_R = 43,0$ min correspondant au dérivé **V-17** avec une masse $m/z = 221,1041$ $[M+H]^+$ pour une masse théorique calculée pour $C_{10}H_{13}N_4O_2$ à 221,1039. Les autres pics, présents en faible quantité dans le milieu, n'ont pu être identifiés.

Ainsi les produits majoritaires observés lors de l'activation chimique sont les composés **V-18** et **V-19** montrant ainsi que le TAC subirait une activation de type substitution nucléophile de l'intermédiaire sulfénique **V-14** plutôt qu'un mécanisme de cycloaddition.

II.2.4. Conclusion

Ces résultats suggèrent que des structures de type pyridine-4-carbothioamide (**V-1**) et benzothioamide (**V-7**) suivent un mécanisme de type cycloaddition comme présenté pour l'ETH. Les métabolites formés lors de l'oxydation de ces composés sont, par analogie structurale, similaires à ceux formés pour l'activation de l'ETH. Cependant, dans le cas du benzothioamide (**V-7**), la formation du dérivé imidate **V-11** laisse supposer une hydrolyse plus lente des intermédiaires imidates.

A l'inverse, une structure thiourée comme celle du TAC semble suivre préférentiellement un mécanisme de type substitution nucléophile de l'intermédiaire sulfénique **V-14** et non de type cycloaddition comme proposé pour l'ETH.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les pro-drogues sont des composés essentiels dans le traitement de la tuberculose du fait de leur bonne activité biologique et de leur mécanisme d'action original et spécifique à MTB. Malheureusement, de nos jours de plus en plus de résistances à ces antituberculeux surviennent principalement à cause d'un défaut de l'enzyme d'activation suite à des mutations génétiques. Les travaux de cette thèse se sont concentrés sur les pro-drogues INH et ETH dont l'activation oxydante génère des radicaux capables de former des adduits avec le cofacteur NAD : les métabolites actifs INH-NADH et ETH-NADH.

Le premier axe de recherche de cette thèse a été d'étudier de nouvelles approches pour lutter contre les résistances liées aux enzymes d'activation des pro-drogues.

Dans la première approche proposée, nous avons développé des molécules de type thiohydrazide susceptibles d'être activées par les enzymes KatG et EthA. La synthèse de la molécule cible, la pyridine-4-carbothiohydrazide (**I-1**), n'a pu être menée à terme du fait de son instabilité conduisant à des cyclisations intramoléculaires. Toutefois, cette instabilité a pu être limitée en remplaçant le noyau pyridyle par un noyau benzyle, conduisant à des structures de type benzothiohydrazide. Concernant la préparation de ces composés, les voies de synthèse classiquement utilisées pour la synthèse des thioamides n'ont pu être extrapolées pour la formation des benzothiohydrazides. En effet, les conditions de thionation sont inappropriées à cause de conditions de chauffage trop drastiques. Les réactions de substitution nucléophile, par l'hydrazine, des dérivés thiocarbonylés activés par des groupements partants de type morpholine ou phosphonate ont été inefficaces, à la différence d'un groupement partant de type acide thioglycolique. Ainsi, neuf thiohydrazides *N* ou *N'*- substitués ont été synthétisés et évalués pour leurs capacités à être activés par KatG et EthA. Ainsi, la fonction thiohydrazide s'est avérée être un mime de la fonction hydrazide activable par KatG mais, malheureusement, n'est pas un équivalent de la fonction thioamide puisqu'elle n'est pas activable par EthA.

La deuxième approche développée a eu pour objectif d'étudier deux hypothèses de la littérature concernant les résistances à l'INH suite à des mutations de l'enzyme KatG. La première hypothèse suppose que l'hème de l'enzyme KatG mutée aurait un potentiel

d'oxydation différent de l'enzyme sauvage et la deuxième hypothèse présume que les mutations de l'enzyme KatG impliqueraient des modifications structurales de celle-ci et que cela aurait un impact sur le site de fixation l'INH. Afin d'examiner ces deux hypothèses, deux séries de molécules ont été synthétisées. La première série regroupe des hydrazides analogues de l'INH dont le cycle pyridine a été modifié par d'autres cycles aromatiques ou pour lesquels la fonction hydrazide a été substituée par des groupements alkyle, acyle ou une fonction carbamate (Figure 57).

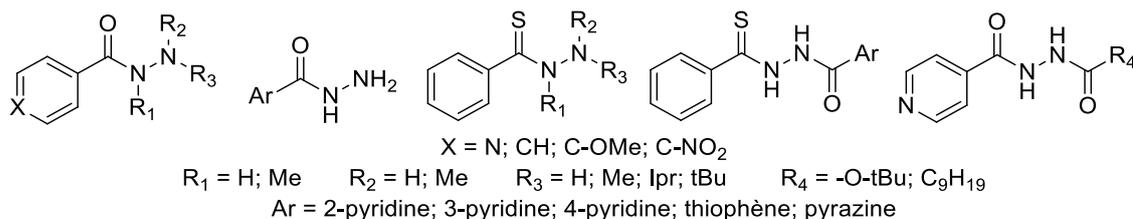


Figure 57 : Hydrazides analogues de l'INH et thiohydrazides synthétisés

L'oxydation de ces composés a ensuite été évaluée par électrochimie. L'activité antimycobactérienne de cette série, dont les potentiels de pic d'oxydation E_a varient entre 0,37 et 1,25 V/SHE, a été évaluée sur une souche MTB sauvage et sur deux souches cliniques résistantes à l'INH. Contrairement à l'hypothèse émise, il n'existe pas de corrélation entre le potentiel d'oxydation de ces composés et leur activité biologique sur MTB sauvage et mutée. La résistance à l'INH ne peut donc pas seulement s'expliquer par une modification du potentiel d'oxydation de l'hème de KatG.

La deuxième série de molécules est inspirée du composé **II-25**, décrit dans la littérature pour être actif sur souche mutée KatG(S315T) en contrebalançant les changements structuraux de l'enzyme impliqués par la mutation. Cependant, bien que le composé **II-25** et les analogues synthétisés présentent une très bonne activité sur souche sauvage dans nos tests, ces composés n'ont pas été capables de compenser les changements liés aux résistances. En effet, la CMI de ces composés sur les souches MTB résistantes à l'INH est au minimum 80 fois supérieure à celle sur souche sauvage. Néanmoins, deux composés (**I-5** et **II-29**), présentant une très bonne activité antimycobactérienne sur souche sauvage et également, pour le composé **II-29**, une activité modérée sur souches mutées, sont ressortis de cette étude (Figure 58). Ces deux composés, non cytotoxiques, sont de bons chefs de file pour le développement de nouvelles molécules antituberculeuses actives sur souches sensibles et résistantes.

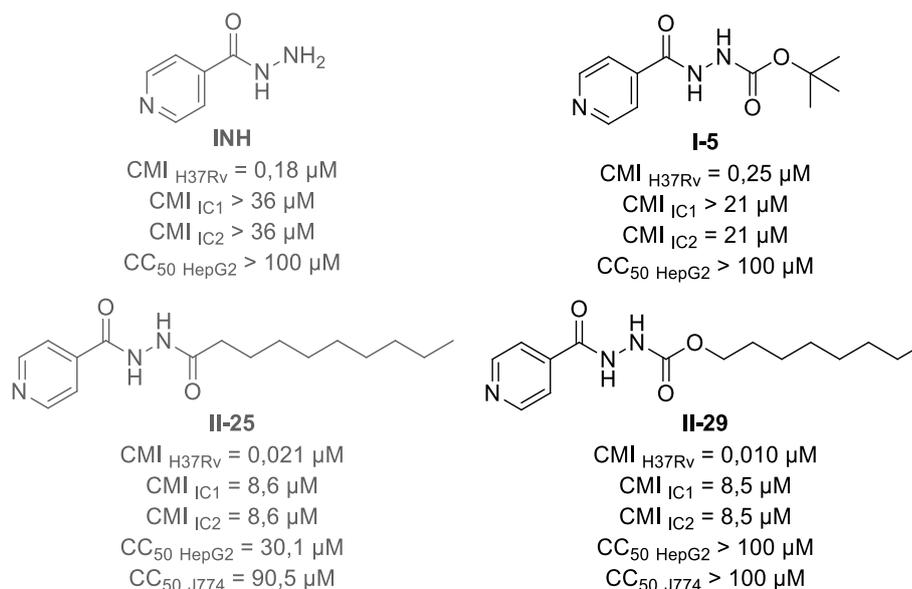


Figure 58 : Molécules de référence et composés actifs identifiés

La troisième et dernière stratégie étudiée s'appuie sur un travail de la littérature présentant le complexe (isoniazide)pentacyanoferrate (II) de sodium comme molécule chimio-activable (par un oxydant endogène de la bactérie tel que le peroxyde d'hydrogène) et présentant une bonne activité antimycobactérienne (CMI entre 0,45 et 0,56 μM sur souche H37Rv de MTB). Ce complexe, ainsi que des analogues présentant des ligands hydrazides, ont été synthétisés en tant que molécules capables de générer le radical aroyle et d'agir comme inhibiteurs potentiels de l'enzyme InhA. De plus, ces complexes ont été mis à profit pour étudier le processus de transfert d'électron intramoléculaire (du fer vers le ligand) proposé pour l'étape d'activation. Les études RPE, réalisées lors de l'oxydation de ces composés par le peroxyde d'hydrogène, ont mis en avant la formation de radicaux de type aroyle pour les complexes présentant des hydrazides non substitués comme ligand. D'autre part, l'oxydation des complexes de type hydrazide-fer(II), suivie par LC-MS, a conduit à la formation de métabolites de type acide et amide (minoritaire). Ces résultats confirment bien un mécanisme d'activation passant par un transfert d'électron intramoléculaire pour lequel nous proposons un mécanisme qui permet d'expliquer la formation des métabolites. L'oxydation du complexe (isoniazide)pentacyanoferrate (II) de sodium a également été réalisée en présence du cofacteur NAD⁺ et le suivi de cette réaction par LC-MS a montré, en faible quantité, la formation des adduits de type INH-NAD. Le complexe (isoniazide)pentacyanoferrate (II) de sodium peut donc agir via le même mécanisme d'action

que l'INH. Ces molécules sont en cours d'évaluation pour leur activité antimycobactérienne et des analogues pourront être développés en fonction des résultats obtenus.

Enfin, un analogue envisagé en perspective de ce travail est un complexe présentant un ligand hybride inspiré de la structure de l'INH et de la PZA comme présenté ci-dessous (Figure 59). Ce complexe, possédant trois sites de coordination possibles pour le fer pourrait, une fois activé, générer le radical aroyle, intermédiaire actif de l'INH et l'acide pyrazinoïque, métabolite actif du PZA.

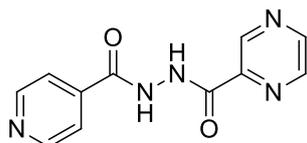


Figure 59 : Structure du ligand envisagé pour la synthèse d'un complexe chimio-activable libérant les espèces actives de l'INH et du PZA

Le deuxième axe de recherche développé au cours de ce travail de thèse concerne les mécanismes d'activation des pro-drogues INH et ETH. En effet, peu de données sont disponibles dans la littérature pour expliquer l'activation de ces molécules d'un point de vue moléculaire. Les résistances à ces médicaments étant liées aux enzymes d'activation, une meilleure compréhension des processus d'activation d'un point de vue moléculaire est essentielle afin de comprendre les mécanismes de résistance et de pouvoir les contourner.

Concernant l'activation de l'INH, la formation du radical isonicotinoyloyle IV-1 a été étudiée avec le système biomimétique utilisant le pyrophosphate de manganèse et les résultats obtenus par RPE sont identiques à ceux observés lors de l'activation par l'enzyme KatG, démontrant donc que ce système biomimétique est un très bon mime de KatG. Des études théoriques et de RPE nous ont permis de déterminer la position proximale de la fonction hydrazide comme étant la plus favorable pour la première oxydation. La différence d'énergie calculée entre les deux radicaux **IV-10** et **IV-11** étant faible (~ 5 kcal), il existe probablement un équilibre entre les deux structures. La formation du radical isonicotinoyloyle se fait donc via un clivage homolytique à partir de l'espèce **IV-11** libérant une molécule de diazène (Schéma 34).

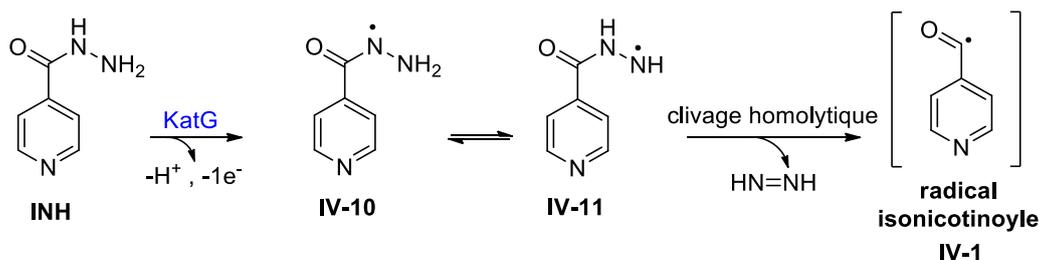


Schéma 34 : Mécanisme proposé pour la formation du radical isonicotinoyloyle.

L'étude d'hydrazides non substitués analogues de l'INH a, par ailleurs, démontré que ces molécules avaient un comportement chimique similaire à celui de l'INH. En effet, l'oxydation de ces molécules et leur analyse par RPE a permis de mettre en évidence la formation de radicaux de type aroyle. Cependant, la formation des adduits R-NAD, inhibiteurs potentiels de l'enzyme InhA, est plus difficile avec ces hydrazides analogues de l'INH. Dans nos conditions, l'étape limitante est donc la réaction avec le radical aroyle R• et le cofacteur NAD⁺, pouvant s'expliquer par la faible stabilité du radical aroyle R•. Ces résultats sont une hypothèse pour expliquer que des molécules telles que le benzohydrazide, la pyridine-2-carbohydrazide ou la pyridine-3-carbohydrazide, bien que activables, présentent une faible activité antimycobactérienne.

Afin d'étudier le mécanisme d'activation de l'ETH, nous avons développé le premier système biomimétique d'EthA permettant l'activation de l'ETH et la formation des adduits ETH-NAD. Ce système, utilisant un oxydant donneur d'oxygène, nous a permis d'étudier la formation des différents intermédiaires et métabolites issus de l'oxydation de l'ETH. Deux intermédiaires clefs ont ainsi été observés : l'ETH-S-oxyle dont l'analyse par diffraction des rayons-X a confirmé la structure et un radical de type aroyle piégé par du PBN et mis en évidence par RPE. L'absence de preuve de la formation de l'acide sulfinique nous a conduit à proposer un mécanisme original passant par une réaction de type cycloaddition [2+2] formelle pour la formation du radical iminoyloyle. Ce mécanisme d'activation est compatible, pour la première fois, avec la formation de tous les métabolites actifs et non-actifs de l'ETH. Lors de l'activation de l'ETH, il peut donc y avoir une compétition entre une substitution nucléophile conduisant à l'acide sulfinique et une cycloaddition conduisant à un intermédiaire radicalaire (Schéma 35) qui semble être favorisée dans le cas de l'ETH.

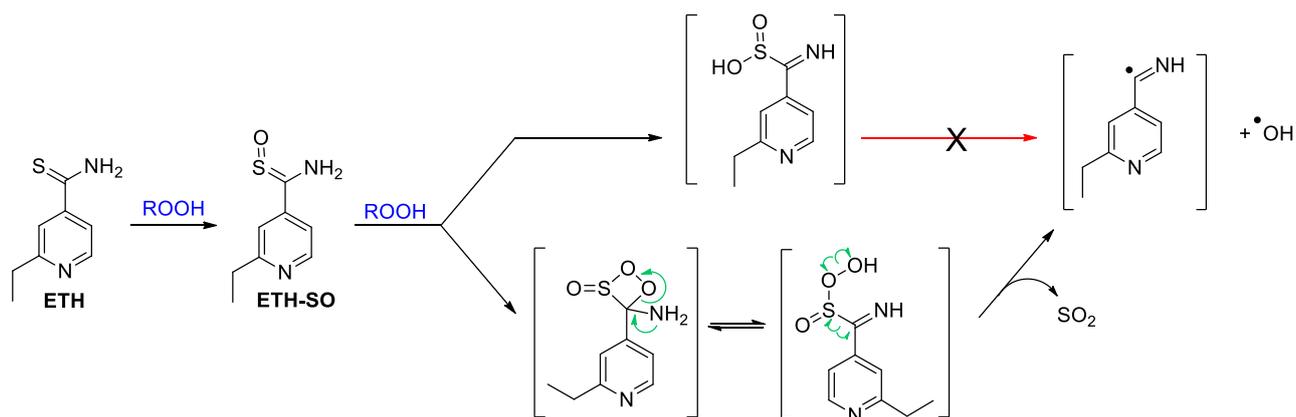


Schéma 35 : Mécanisme de formation du radical iminoyle de l'ETH

L'activation de deux autres thioamides (thiobenzamide et pyridine-4-thioamide), étudiée par LC-MS, a mis en évidence que ces deux thioamides suivaient un mécanisme de type cycloaddition comme l'ETH. Cependant, l'étude de l'activation du dérivé thiourée TAC suggère que son activation est majoritairement de type substitution nucléophile.

Les composés de type thioamide et thiourée étant connus pour leur toxicité, une perspective à ce travail est l'étude, par la méthode biomimétique développée, de la formation des différents métabolites et espèces radicalaires formés au cours de leur oxydation et pouvant être responsables des effets secondaires toxiques observés pour ces composés.

Table des illustrations

Tables des illustrations

I. Table des figures

Figure 1 : Estimation du nombre de nouveaux cas de tuberculoses en 2014 [11]	19
Figure 2 : Nombre de cas déclarés et taux de déclaration (pour 100 000 habitants) de tuberculose, en France en 2014 d'après les données de l'Institut de Veille Sanitaire[15].....	20
Figure 3: A. Colonies de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , B. Visualisation de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> au microscope électronique.....	22
Figure 4 : Cryo-microscopie électronique de l'enveloppe mycobactérienne [23].....	23
Figure 5 : Structure du complexe mycolyl arabinogalactane et de son mode de liaison au peptidoglycane [24].....	24
Figure 6 : Schéma de l'enveloppe mycobactérienne. Source : domaine public. © Wikimedia Commons	25
Figure 7 : Exemples de structures des acides mycoliques chez <i>M. tuberculosis</i>	27
Figure 8 : Exemples de structures d'inhibiteurs d'enzymes impliquées dans la synthèse des acides mycoliques	28
Figure 9 : Antituberculeux de 1 ^{ère} ligne	33
Figure 10 : Antituberculeux de seconde ligne.....	36
Figure 11 : Structures de la bédaquiline et du délamanid	37
Figure 12 : Structures des composés en cours d'étude pour le traitement de la tuberculose ...	40
Figure 13 : Principales cibles actuelles de MTB et composés associés, adapté de [59]	41
Figure 14 : Pipeline de TB Alliance pour leurs essais en phase clinique de développement. .	42
Figure 15 : Pipeline de nouveaux médicaments antituberculeux en cours d'étude, recensés par Working Group on New TB Drugs.	43
Figure 16 : Prodrugs used in tuberculosis treatment indexed by activation mechanism	44
Figure 17 : Mécanismes de résistances naturelles et pompes à efflux [205]	68
Figure 18 : Inactivation de l'antibiotique par modification directe [205]	69
Figure 19 : Résistance par modification de la cible [205].....	70
Figure 20 : Structure du triclosan	72
Figure 21 : Structures générales des adduits INH-NAD (A) et des adduits tronqués de INH-NAD (B, C, D)	73
Figure 22 : Chefs de file de la série (aza)isoindolinone	73
Figure 23 : Inhibiteurs direct d'InhA en cours d'étude	74

Figure 24 : Structures des produits de cyclisation intermoléculaire du composé I-1	87
Figure 25 : Structures des benzothiohydrazides cibles	91
Figure 26 : Structures proposées pour les sous-produits de la réaction de substitution de l'hydrazine sur le composé I-23.....	94
Figure 27 : Test d'inhibition de la croissance de MTB par les thiohydrazides en présence ou non de booster d'EthA.....	105
Figure 28 : Mécanisme proposé pour l'activation de l'INH par l'enzyme KatG par Ghiladi et al. [95]. En bleu le composé III, et en rouge le composé II.	109
Figure 29 : Structure de l'isoniazide	110
Figure 30: Structure du composé I-5.....	132
Figure 31 : Structure du N'-décanoylisonicotinohydrazide II-25	133
Figure 32 : MtKatG :.....	136
Figure 33 : Comparaison structurale du site de fixation de l'INH entre SeKatG (bleu) et A. BpKatG (rose) et B. MtKatG (jaune) à partir de structures obtenues par diffraction des rayons X [104]	138
Figure 34 : Structure du N'-acétylisonicotinohydrazide II-26.....	140
Figure 35: Meilleures conformations représentatives de INH et II-25 d'après une étude de docking avec l'enzyme KatG à l'état de repos.....	142
Figure 36 : Structures des analogues de l'INH synthétisés et valeurs de log P calculées (clog P) d'après ChemDraw v15.0.	143
Figure 37: Complexes de type pentacyanoferrate (II) synthétisés	153
Figure 38 : Métabolites non-actifs possibles de l'INH.....	180
Figure 39 : Structures proposées pour les radicaux carbone-centrés observés en RPE	180
Figure 40 : Structures des piègeurs de radicaux PBN, DMPO et TEMPO et de l'adduit INH-TEMPO	180
Figure 41 : Structures des adduits INH-NAD.	183
Figure 42 : Fragment déshydraté observé en spectrométrie de masse pour les structures fermées.	184
Figure 43 : Métabolites non-actifs de l'oxydation de INH.	184
Figure 44 : Signal RPE pour la réaction : INH (5,1 mM), pyrophosphate de Mn(III) (4,1 mM) et PBN (20,4 mM).....	189
Figure 45 : Signaux RPE pour les réactions : a. INH (5,1 mM), pyrophosphate de Mn(III) (4,1 mM) et PBN (20,4 mM), b. INH (5 mM), K ₃ Fe(CN) ₆ (5 mM), PBN (20 mM).	190
Figure 46 : Hydrazides substitués étudiés en RPE (numérotation reprise de l'article 1 [63])	190

Figure 47 : Signaux RPE pour les réactions : Hydrazides (5,1 mM), pyrophosphate de Mn(III) (4,1 mM) et PBN (20,4 mM) avec a. INH, b. molécule 9 , c. molécule 10 , d. molécule 11 , e. molécule 15	191
Figure 48 : Hydrazides étudiés en RPE et LC-MS (numérotation reprise de l'article 1 [63])	194
Figure 49 : Hydrazides étudiés en LC-MS	196
Figure 50 : Chromatogramme de la réaction d'oxydation de la pyridine-4-carbothioamide par KHSO ₅	213
Figure 51 : Produits observés lors de l'oxydation de la pyridine-4-carbothioamide (formules brutes et poids moléculaire)	213
Figure 52 : Chromatogramme de la réaction d'oxydation du benzothioamide par KHSO ₅ ...	214
Figure 53 : Produits supposés de l'oxydation du benzothioamide (formules brutes et poids moléculaire).....	214
Figure 54 : Structures des radicaux iminoyl V-12 et benzoyl V-13 et mécanisme de formation du composé V-11	215
Figure 55: Structures du TAC et de l'ISO	215
Figure 56 : Chromatogramme UV de la réaction d'oxydation du TAC par KHSO ₅	217
Figure 57 : Hydrazides analogues de l'INH et thiohydrazides synthétisés	222
Figure 58 : Molécules de référence et composés actifs identifiés.....	223
Figure 59 : Structure du ligand envisagé pour la synthèse d'un complexe chimio-activable libérant les espèces actives de l'INH et du PZA.....	224

II. Table des schémas

Schéma 1 : Biosynthèse des acides mycoliques extrait de [29]	29
Schéma 2 : Représentation de la réaction de réduction du substrat énoyl-ACP par l'enzyme InhA.....	30
Schéma 3 : Structures de l'INH, de l'ETH et de l'hybride INH-ETH I-1	84
Schéma 4 : Rétrosynthèse du composé I-1	85
Schéma 5 : Voie de synthèse de I-1 par thionation.....	85
Schéma 6 : Mécanisme de thionation. : A) et B) dissociation de P ₄ S ₁₀ et du réactif de Lawesson, respectivement, C) Thionation	86
Schéma 7 : Mécanismes proposés pour les produits de cyclisation intermoléculaire I-2 à I-4	87
Schéma 8 : Synthèse du composé I-6 via l'utilisation d'un groupement protecteur Boc	88
Schéma 9 : Réactions de Willgerodt-Kindler [253]	89

Schéma 10 : Synthèse du composé I-1 dans les conditions de la réaction de Willgerodt-Kindler, en présence de morpholine (1,4 éq) et de soufre (1,5 éq), suivie d'une substitution nucléophile par l'hydrazine.....	89
Schéma 11 : Substitution nucléophile du composé I-8 par des hydrazines monosubstituées..	90
Schéma 12 : Rétrosynthèse des benzothiohydrazides	90
Schéma 13 : Thionation par P ₄ S ₁₀ couplé à de la diméthicone (A ₁) ou à Al ₂ O ₃ (A ₂).....	91
Schéma 14 : Voie A ₃ : Thionation via un sel de pyridinium.....	92
Schéma 15 : Mécanisme de la voie A ₃ , thionation via un sel de pyridinium.....	92
Schéma 16 : Synthèse de thiohydrazides dans les conditions de la réaction de Willgerodt-Kindler.....	94
Schéma 17 : Benzothiohydrazides synthétisés à partir de l'acide S-(thiobenzoyl)-thioglycolique I-27	96
Schéma 18 : Voie de synthèse C via un organomagnésien	97
Schéma 19 : Voie de synthèse D via un phosphonate.....	97
Schéma 20 : Mécanisme de formation du O,O-diéthyl phosphorodithioate d'hydrazinium I-41	97
Schéma 21 : Mécanisme de la voie D	98
Schéma 22 : Voie de synthèse du N'-décanoylisonicotinohydrazide II-25	143
Schéma 23 : Voie de synthèse du déc-1-ène isonicotinoylhydrazone II-27 et du N'-décyl-N-isonicotinoic acid hydrazide II-28	143
Schéma 24 : Voie de synthèse du N'-octyloxycarbonyl-N-isonicotinoic hydrazide II-29	144
Schéma 25 : Mécanisme d'action de l'INH, activation enzymatique (I) et mécanisme proposé pour IQG-607, activation chimique (II), adapté de Sousa et al. [242].....	152
Schéma 26 : Mécanisme général de formation de l'adduit INH-NADH	180
Schéma 27 : Intermédiaires proposés pour la formation du radical isonicotinoyle (IV-1)....	181
Schéma 28 : Réaction entre le NAD ⁺ et le radical isonicotinoyle pour la formation des adduits INH-NAD.....	182
Schéma 29 : Mécanismes proposés pour la formation des différents métabolites de l'INH. .	186
Schéma 30 : Mécanisme d'oxydation proposé de l'INH pour la formation du radical isonicotinoyle IV-1	188
Schéma 31 : Mécanisme d'oxydation proposé dans le cas des hydrazides substitués.....	193
Schéma 32 : Mécanisme de formation du radical isonicotinoyle IV-1 à partir de l'INH	198
Schéma 33 : Mécanismes proposés pour l'activation du TAC. Les composés encadrés ont été identifiés dans la littérature [149,151,327].....	216

Schéma 34 : Mécanisme proposé pour la formation du radical isonicotinoylé.....	225
Schéma 35 : Mécanisme de formation du radical iminoylé de l'ETH.....	226

III. Scheme table

Scheme 1: FAS- II system.....	47
Scheme 2: Mechanism of action of INH.....	47
Scheme 3: Review of the proposed mechanisms for the activation of INH by KatG.....	50
Scheme 4: Mechanism of action of ETH. (ADPR: adenosine diphosphate ribose).....	53
Scheme 5: General mechanism of oxygenation reaction catalyzed by flavoprotein monooxygenases adapted from [138]. S, substrate; SO oxidized substrate.....	54
Scheme 6: TAC activation mechanism.....	56
Scheme 7: ISO activation mechanism.....	56
Scheme 8: Model of PAS mechanism of action and folate metabolism in <i>M. tuberculosis</i> adapted from [48–50].....	59
Scheme 9: PZA mechanism of action from Zhang et al. [47].....	62
Scheme 10: Reaction catalyzed by QAPRTase in the de novo pathway of NAD biosynthesis adapted from [182]. PPi : inorganic pyrophosphate.....	63
Scheme 11: Proposed mechanism of catalysis of PncA from Seiner et al. [193].....	64
Scheme 12: Proposed mechanism for the activation reaction of delamanid by the reduced F ₄₂₀ deazaflavin inside the Ddn active site adapted from Ellaf & al. [198]......	66

IV. Table des tableaux

Tableau 1 : Résumé des différents antituberculeux de 1 ^{ère} et de 2 ^{nde} ligne ainsi que leur mécanisme d'action, adapté de [54].....	39
Tableau 2 : Conditions de réactions pour la thionation de l'isoniazide.....	86
Tableau 3 : Conditions réactionnelles pour la thionation de l'INH-Boc I-5 par le réactif de Lawesson.....	88
Tableau 4 : Essais de thionation par la voie A.....	93
Tableau 5 : Taux de formation des adduits X-NAD par BpKatG.....	103
Tableau 6 : Potentiel d'oxydation et CMI pour l'INH et I-5	132
Tableau 7 : Activité antimycobactérienne des composés II-25 , II-27 , II-28 , II-29	144
Tableau 8 : Cytotoxicité des composés II-25 , II-27 ; II-28 ; II-29	146

Tableau 9 : Conditions de RPE testées pour la réaction entre l'INH et le pyrophosphate de Mn(III) en présence de PBN	189
Tableau 10 : Conditions de RPE testées pour la réaction entre l'INH et le $K_3Fe(CN)_6$ en présence de PBN	190
Tableau 11 : Conditions de RPE testées pour la réaction d'hydrazides substitués, de pyrophosphate de Mn(III) et de PBN	191
Tableau 12 : Conditions de RPE testées pour la réaction d'auto-oxydation des hydrazines en présence de $CuCl_2$ et de PBN	192
Tableau 13 : Taux de formation des adduits X-NAD par BpKatG	195
Tableau 14 : Signaux RPE des hydrazides en présence de PBN dans un tampon phosphate (40 mM, pH 7,4)	195
Tableau 15 : Observation des adduits R-NAD par LC-MS.	196

Bibliographie

Bibliographie

1. OMS. Tuberculosis. Fact sheet. Consulté en juillet 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
2. Daniel, T. M. The history of tuberculosis. *Respir. Med.* **2006**, *100*, 1862–1870.
3. M Cristina, G.; Brisse, S.; Brosch, R.; Fabre, M.; Omais, B.; Marmiesse, M.; Supply, P.; Vincent, V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **2005**, *1*, 0055–0061.
4. Daniel, T. M. René Théophile Hyacinthe Laënnec and the founding of pulmonary medicine. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2004**, *8*, 517–518.
5. McCarthy, O. R. The key to the sanatoria. *J. R. Soc. Med.* **2001**, *94*, 413–7.
6. Daniel, T. M. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2005**, *9*, 1181–1182.
7. Daniel, T. M. Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2005**, *9*, 944–945.
8. Glynn, J. R. Resurgence of tuberculosis and the impact of HIV infection. *Br. Med. Bull.* **1998**, *54*, 579–93.
9. Pawlowski, A.; Jansson, M.; Sköld, M.; Rottenberg, M. E.; Källenius, G. Tuberculosis and HIV Co-Infection. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002464.
10. Sharma, S. K.; Mohan, A.; Kadhiravan, T. HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis & management. *Indian J. Med. Res.* **2005**, *121*, 550–567.
11. Organisation Mondiale de la Santé. *Global Tuberculosis Report*; 2015; Vol. 20.
12. Nachega, J. B.; Chaisson, R. E. Tuberculosis Drug Resistance: A Global Threat. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, S24–S30.
13. Zhang, Y.; Yew, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. lung Dis.* **2009**, *13*, 1320–30.
14. Long, R. Drug-resistant tuberculosis. *Can. Med. Assoc. J.* **2000**, *163*, 425–8.
15. Institut de Veille Sanitaire - Tuberculose - Consulté en juillet 2016. <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Tuberculose/>.
16. Huchon, G. Tuberculose : infection et maladie. *EMC - Pneumol.* **2012**, *9*, 1–22.
17. Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L.; Martin, L. *Introduction à la microbiologie. 2ème édition.*; Pearson, 2012.
18. van Ingen, J.; Rahim, Z.; Mulder, A.; Boeree, M. J.; Simeone, R.; Brosch, R.; van Soolingen, D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex

Subspecies. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 653–655.

19. Hett, E. C.; Rubin, E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 126–156.

20. Brennan, P. J.; Nikaido, H. The Envelope of Mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 29–63.

21. Jarlier, V.; Nikaido, H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *123*, 11–18.

22. Crick, D. C.; Mahapatra, S.; Brennan, P. J. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **2001**, *11*, 107R–118R.

23. Niederweis, M.; Danilchanka, O.; Huff, J.; Hoffmann, C.; Engelhardt, H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol.* **2010**, *18*, 109–116.

24. Bhamidi, S.; Scherman, M. S.; Rithner, C. D.; Prenni, J. E.; Chatterjee, D.; Khoo, K.-H.; McNeil, M. R. The Identification and Location of Succinyl Residues and the Characterization of the Interior Arabinan Region Allow for a Model of the Complete Primary Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolyl Arabinogalactan. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 12992–13000.

25. Strohmeier, G. R.; Fenton, M. J. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes Infect.* **1999**, *1*, 709–717.

26. Daffé, M.; Etienne, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber. Lung Dis.* **1999**, *79*, 153–169.

27. Draper, P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front. Biosci.* **1998**, *3*, 1253–1261.

28. Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 81–101.

29. Marrakchi, H.; Lanéelle, M.-A.; Daffé, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 67–85.

30. Barry, C. E.; Lee, R. E.; Mdluli, K.; Sampson, A. E.; Schroeder, B. G.; Slayden, R. A.; Yuan, Y. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37*, 143–179.

31. Chollet, A.; Mourey, L.; Lherbet, C.; Delbot, A.; Julien, S.; Baltas, M.; Bernadou, J.; Pratiel, G.; Maveyraud, L.; Bernardes-Génisson, V. Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach. *J. Struct. Biol.* **2015**, *190*, 328–337.

32. Vilchèze, C.; Morbidoni, H. R.; Weisbrod, T. R.; Iwamoto, H.; Kuo, M.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 4059–67.

33. Delogu, G.; Fadda, G. The quest for a new vaccine against tuberculosis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2009**, *3*, 5–15.
34. Andersen, P.; Doherty, T. M. Opinion: The success and failure of BCG — implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 656–662.
35. Tang, J.; Yam, W.-C.; Chen, Z. Mycobacterium tuberculosis infection and vaccine development. *Tuberculosis* **2016**, *98*, 30–41.
36. Evans, T. G.; Schragar, L.; Thole, J. Status of vaccine research and development of vaccines for tuberculosis. *Vaccine* **2016**, *34*, 2911–2914.
37. Goonetilleke, N. P.; McShane, H.; Hannan, C. M.; Anderson, R. J.; Brookes, R. H.; Hill, A. V. S. Enhanced Immunogenicity and Protective Efficacy Against Mycobacterium tuberculosis of Bacille Calmette-Guerin Vaccine Using Mucosal Administration and Boosting with a Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 1602–1609.
38. Horwitz, M. A.; Harth, G.; Dillon, B. J.; Maslesa-Galic, S. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 13853–13858.
39. Wang, J.; Thorson, L.; Stokes, R. W.; Santosuosso, M.; Huygen, K.; Zganiacz, A.; Hitt, M.; Xing, Z. Single Mucosal, but Not Parenteral, Immunization with Recombinant Adenoviral-Based Vaccine Provides Potent Protection from Pulmonary Tuberculosis. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 6357–6365.
40. Vilaplana, C.; Gil, O.; Cáceres, N.; Pinto, S.; Díaz, J.; Cardona, P.-J. Prophylactic Effect of a Therapeutic Vaccine against TB Based on Fragments of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One* **2011**, *6*, e20404.
41. Yang, X.-Y.; Chen, Q.-F.; Li, Y.-P.; Wu, S.-M. Mycobacterium vaccae as Adjuvant Therapy to Anti-Tuberculosis Chemotherapy in Never-Treated Tuberculosis Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One* **2011**, *6*, e23826.
42. Gupta, A.; Ahmad, F. J.; Ahmad, F.; Gupta, U. D.; Natarajan, M.; Katoch, V.; Bhaskar, S. Efficacy of Mycobacterium indicus pranii Immunotherapy as an Adjunct to Chemotherapy for Tuberculosis and Underlying Immune Responses in the Lung. *PLoS One* **2012**, *7*, e39215.
43. Caminero, J. A.; Sotgiu, G.; Zumla, A.; Migliori, G. B. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 621–629.
44. Nath, H.; Ryoo, S. First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance. In *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*; InTech, 2013.
45. Scior, T.; Meneses Morales, I.; Garcés Eisele, S. J.; Domeyer, D.; Laufer, S. Antitubercular Isoniazid and Drug Resistance of Mycobacterium tuberculosis — A Review. *Arch. der Pharm. - Pharm. Med. Chem.* **2002**, *11*, 511–525.

46. Hazbon, M. H.; Brimacombe, M.; Bobadilla del Valle, M.; Cavatore, M.; Guerrero, M. I.; Varma-Basil, M.; Billman-Jacobe, H.; Lavender, C.; Fyfe, J.; Garcia-Garcia, L.; Leon, C. I.; Bose, M.; Chaves, F.; Murray, M.; Eisenach, K. D.; Sifuentes-Osornio, J.; Cave, M. D.; Ponce de Leon, A.; Alland, D. Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2640–2649.
47. Zhang, Y.; Mitchison, D.; Shi, W.; Zhang, W. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2014**, *2*, MGM2-0023-2013.
48. Zheng, J.; Rubin, E. J.; Bifani, P.; Mathys, V.; Lim, V.; Au, M.; Jang, J.; Nam, J.; Dick, T.; Walker, J. R.; Pethe, K.; Camacho, L. R. para-Aminosalicylic Acid Is a Prodrug Targeting Dihydrofolate Reductase in Mycobacterium tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 23447–23456.
49. Minato, Y.; Thiede, J. M.; Kordus, S. L.; McKlveen, E. J.; Turman, B. J.; Baughn, A. D. Mycobacterium tuberculosis folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 5097–5106.
50. Moradigaravand, D.; Grandjean, L.; Martinez, E.; Li, H.; Zheng, J.; Coronel, J.; Moore, D.; Török, M. E.; Sintchenko, V.; Huang, H.; Javid, B.; Parkhill, J.; Peacock, S. J.; Köser, C. U. dfrA thyA Double Deletion in para -Aminosalicylic Acid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 3864–3867.
51. Mahajan, R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* **2013**, *3*, 1–2.
52. Rustomjee, R.; Zumla, A. Delamanid expanded access novel treatment of drug resistant tuberculosis. *Infect. Drug Resist.* **2015**, *8*, 359–366.
53. Matsumoto, M.; Hashizume, H.; Tomishige, T.; Kawasaki, M.; Tsubouchi, H.; Sasaki, H.; Shimokawa, Y.; Komatsu, M. OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis In Vitro and In Mice. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e466.
54. Chollet, A. InhA, cible pour de nouveaux antituberculeux : étude cristallographique, synthèse et évaluation d'inhibiteurs. *Thèse* **2014**, *9 Octobre*, 33.
55. Bernardes-Génisson, V.; Deraeve, C.; Chollet, A.; Bernadou, J.; Pratviel, G. Isoniazid: an update on the multiple mechanisms for a singular action. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 4370–85.
56. Akbar Velayati, A.; Farnia, P.; Reza Masjedi, M. Totally drug-resistant tuberculosis (TDR-TB): A debate on global health communities. *Int. J. Mycobacteriology* **2013**, *2*, 71–72.
57. Lenaerts, A. J.; Gruppo, V.; Marietta, K. S.; Johnson, C. M.; Driscoll, D. K.; Tompkins, N. M.; Rose, J. D.; Reynolds, R. C.; Orme, I. M. Preclinical Testing of the Nitroimidazopyran PA-824 for Activity against Mycobacterium tuberculosis in a Series of In Vitro and In Vivo Models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2294–2301.

58. Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Barry, C. E. The mechanism of action of PA-824. *Commun. Integr. Biol.* **2009**, *2*, 215–218.
59. Hoagland, D. T.; Liu, J.; Lee, R. B.; Lee, R. E. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *102*, 55–72.
60. Bernstein, J.; Lott, W. A.; Steinberg, B. A.; Yale, H. L. Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *Am. Rev. Tuberc.* **1952**, *65*, 357–64.
61. Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 13881–6.
62. Wengenack, N. L.; Rusnak, F. Evidence for Isoniazid-Dependent Free Radical Generation Catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the Isoniazid-Resistant Mutant KatG(S315T). *Biochemistry* **2001**, *40*, 8990–8996.
63. Laborde, J.; Deraeve, C.; Lecoq, L.; Sournia-Saquet, A.; Stigliani, J.-L.; Orena, B. S.; Mori, G.; Pratviel, G.; Bernardes-Génisson, V. Synthesis, oxidation potential and anti-mycobacterial activity of isoniazid and analogues: insights into the molecular isoniazid activation mechanism. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 172–179.
64. Karakousis, P. C.; Williams, E. P.; Bishai, W. R. Altered expression of isoniazid-regulated genes in drug-treated dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 323–331.
65. Bardou, F.; Raynaud, C.; Ramos, C.; Laneelle, M. A.; Lanrelle, G. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **1998**, *144*, 2539–2544.
66. Vilchèze, C.; Jacobs, Jr., W. R. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 35–50.
67. Marrakchi, H.; Lanéelle, G.; Quémard, A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* **2000**, *146*, 289–296.
68. Dessen, A.; Quemard, A.; Blanchard, J.; Jacobs, W.; Sacchettini, J. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1995**, *267*, 1638–1641.
69. Takayama, K.; Wang, L.; David, H. L. Effect of Isoniazid on the In Vivo Mycolic Acid Synthesis, Cell Growth, and Viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *2*, 29–35.
70. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The catalase—peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **1992**, *358*, 591–593.
71. Amos, R. I. J.; Gourlay, B. S.; Schiesser, C. H.; Smith, J. a; Yates, B. F. A mechanistic study on the oxidation of hydrazides: application to the tuberculosis drug isoniazid. *Chem. Commun.* **2008**, 1695–1697.

72. Timmins, G. S.; Master, S.; Rusnak, F.; Deretic, V. Requirements for Nitric Oxide Generation from Isoniazid Activation In Vitro and Inhibition of Mycobacterial Respiration In Vivo. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5427–5431.
73. Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H. R.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C.; Jacobs Jr, W. R.; Sacchettini, J. C. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis. *Science* **1998**, *279*, 98–102.
74. Lei, B.; Wei, C.-J.; Tu, S.-C. Action Mechanism of Antitubercular Isoniazid. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2520–2526.
75. Zabinski, R. F.; Blanchard, J. S. The Requirement for Manganese and Oxygen in the Isoniazid-Dependent Inactivation of Mycobacterium tuberculosis Enoyl Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2331–2332.
76. Nguyen, M.; Quémard, A.; Broussy, S.; Meunier, B.; Bernadou, J. Mn (III) Pyrophosphate as an Efficient Tool for Studying the Mode of Action of Isoniazid on the InhA Protein of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2137–2144.
77. Broussy, S.; Coppel, Y.; Nguyen, M.; Bernadou, J.; Meunier, B. ¹H and ¹³C NMR characterization of hemiamidal isoniazid-NAD(H) adducts as possible inhibitors of InhA reductase of Mycobacterium tuberculosis. *Chemistry* **2003**, *9*, 2034–2038.
78. Ducasse-cabanot, S.; Cohen-gonsaud, M.; Nguyen, M.; Zerbib, D.; Bernadou, J.; Daffé, M.; Labesse, G.; Quémard, A.; Marrakchi, H. In Vitro Inhibition of the Mycobacterium tuberculosis β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Reductase MabA by Isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 242–249.
79. Banerjee, A.; Sugantino, M.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R. The mabA gene from the inhA operon of Mycobacterium tuberculosis encodes a 3ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. *Microbiology* **1998**, *144*, 2697–2704.
80. Argyrou, A.; Vetting, M. W.; Aladegbami, B.; Blanchard, J. S. Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase is a target for isoniazid. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 408–413.
81. Wang, F.; Jain, P.; Gulten, G.; Liu, Z.; Feng, Y.; Ganesula, K.; Motiwala, A. S.; Ioerger, T. R.; Alland, D.; Vilchèze, C.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Mycobacterium tuberculosis Dihydrofolate Reductase Is Not a Target Relevant to the Antitubercular Activity of Isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3776–3782.
82. Mdluli, K.; Slayden, R. A.; Zhu, Y.; Ramaswamy, S.; Pan, X.; Mead, D.; Crane, D. D.; Musser, J. M.; Barry, C. E. Inhibition of a Mycobacterium tuberculosis β -Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. *Science* **1998**, *280*, 1607–1610.
83. Kremer, L.; Dover, L. G.; Morbidoni, H. R.; Vilchèze, C.; Maughan, W. N.; Baulard, A. R.; Tu, S.-C.; Honoré, N.; Deretic, V.; Sacchettini, J. C.; Loch, C.; Jacobs, William, R.; Besra, G. S. Inhibition of InhA Activity, but Not KasA Activity, Induces Formation of a KasA-containing Complex in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20547–20554.

84. Larsen, M. H.; Vilchèze, C.; Kremer, L.; Besra, G. S.; Parsons, L.; Salfinger, M.; Heifets, L.; Hazbon, M. H.; Alland, D.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46*, 453–466.
85. Vilchèze, C.; Wang, F.; Arai, M.; Hazbón, M. H.; Colangeli, R.; Kremer, L.; Weisbrod, T. R.; Alland, D.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1027–1029.
86. Chan, J.; Xing, Y.; Magliozzo, R. S.; Bloom, B. R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* **1992**, *175*, 1111–1122.
87. Macmicking, J. D.; North, R. J.; Lacourse, R.; Mudgett, J. S.; Shah, S. K.; Nathan, C. F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 5243–5248.
88. Timmins, G. S.; Master, S.; Rusnak, F.; Deretic, V. Nitric Oxide Generated from Isoniazid Activation by KatG: Source of Nitric Oxide and Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3006–3009.
89. Wilming, M.; Johnsson, K. Inter- and intramolecular domain interactions of the catalase-peroxidase KatG from *M. tuberculosis*. *FEBS Lett.* **2001**, *509*, 272–276.
90. Díaz, A.; Loewen, P. C.; Fita, I.; Carpena, X. Thirty years of heme catalases structural biology. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *525*, 102–110.
91. Bertrand, T.; Eady, N. a J.; Jones, J. N.; Jesmin; Nagy, J. M.; Jamart-Grégoire, B.; Raven, E. L.; Brown, K. a Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38991–38999.
92. Ivancich, A.; Donald, L. J.; Villanueva, J.; Wiseman, B.; Fita, I.; Loewen, P. C. Spectroscopic and kinetic investigation of the reactions of peroxyacetic acid with *Burkholderia pseudomallei* catalase-peroxidase, KatG. *Biochemistry* **2013**, *52*, 7271–7282.
93. Singh, R.; Wiseman, B.; Deemagarn, T.; Jha, V.; Switala, J.; Loewen, P. C. Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *471*, 207–214.
94. Chouchane, S.; Lippai, I.; Magliozzo, R. S. Catalase-Peroxidase (*Mycobacterium tuberculosis* KatG) Catalysis and Isoniazid Activation. *Biochemistry* **2000**, *39*, 9975–9983.
95. Ghiladi, R. A.; Cabelli, D. E.; Ortiz de Montellano, P. R. Superoxide Reactivity of KatG: Insights into Isoniazid Resistance Pathways in TB. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4772–4773.
96. Ghiladi, R. A.; Medzihradzky, K. F.; Rusnak, F. M.; Ortiz de Montellano, P. R. Correlation between Isoniazid Resistance and Superoxide Reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13428–13442.
97. Cade, C. E.; Dlouhy, A. C.; Medzihradzky, K. F.; Salas-Castillo, S. P.; Ghiladi, R.

A. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Sci.* **2010**, *19*, 458–474.

98. Zhao, X.; Yu, H.; Yu, S.; Wang, F.; Sacchettini, J. C.; Magliozzo, R. S. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4131–4140.

99. Carpena, X.; Loprasert, S.; Mongkolsuk, S.; Switala, J.; Loewen, P. C.; Fita, I. Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7Å resolution. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 475–489.

100. Zhao, X.; Yu, S.; Magliozzo, R. S. Characterization of the Binding of Isoniazid and Analogues to *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase. *Biochemistry* **2007**, *46*, 3161–3170.

101. Wiseman, B.; Carpena, X.; Feliz, M.; Donald, L. J.; Pons, M.; Fita, I.; Loewen, P. C. Isonicotinic acid hydrazide conversion to isonicotinyl-NAD by catalase-peroxidases. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 26662–26673.

102. Zhao, X.; Hersleth, H.-P.; Zhu, J.; Andersson, K. K.; Magliozzo, R. S. Access channel residues Ser315 and Asp137 in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) control peroxidatic activation of the pro-drug isoniazid. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11650–11652.

103. Vidossich, P.; Loewen, P. C.; Carpena, X.; Fiorin, G.; Fita, I.; Rovira, C. Binding of the Antitubercular Pro-Drug Isoniazid in the Heme Access Channel of Catalase-Peroxidase (KatG). A Combined Structural and Metadynamics Investigation. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 2924–2931.

104. Kamachi, S.; Hirabayashi, K.; Tamoi, M.; Shigeoka, S.; Tada, T.; Wada, K. The crystal structure of isoniazid-bound KatG catalase-peroxidase from *Synechococcus elongatus* PCC7942. *FEBS J.* **2015**, *282*, 54–64.

105. Jakopitsch, C.; Auer, M.; Ivancich, A.; Ruker, F.; Furtmuller, P. G.; Obinger, C. Total Conversion of Bifunctional Catalase-Peroxidase (KatG) to Monofunctional Peroxidase by Exchange of a Conserved Distal Side Tyrosine. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20185–20191.

106. Rangelova, K.; Giroto, S.; Gerfen, G. J.; Yu, S.; Suarez, J.; Metlitsky, L.; Magliozzo, R. S. Radical Sites in *Mycobacterium tuberculosis* KatG Identified Using Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, the Three-dimensional Crystal Structure, and Electron Transfer Couplings. *J. Biol. Chem.* **2006**, *282*, 6255–6264.

107. Singh, R.; Wiseman, B.; Deemagarn, T.; Donald, L. J.; Duckworth, H. W.; Carpena, X.; Fita, I.; Loewen, P. C. Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 43098–43106.

108. Loewen, P. C.; Carpena, X.; Vidossich, P.; Fita, I.; Rovira, C. An Ionizable Active-Site Tryptophan Imparts Catalase Activity to a Peroxidase Core. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7249–7252.

109. Pierattelli, R.; Banci, L.; Eady, N. A. J.; Bodiguel, J.; Jones, J. N.; Moody, P. C. E.; Raven, E. L.; Jamart-Gregoire, B.; Brown, K. A. Enzyme-catalyzed Mechanism of Isoniazid

Activation in Class I and Class III Peroxidases. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39000–39009.

110. Svistunenko, D. A.; Worrall, J. A. R.; Chugh, S. B.; Haigh, S. C.; Ghiladi, R. A.; Nicholls, P. Ferric haem forms of Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase probed by EPR spectroscopy: Their stability and interplay with pH. *Biochimie* **2012**, *94*, 1274–1280.

111. Vlasits, J.; Jakopitsch, C.; Bernroitner, M.; Zamocky, M.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *500*, 74–81.

112. Middlebrook, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. *Am. Rev. Tuberc.* **1952**, *65*, 765–767.

113. Dalla Costa, E. R.; Ribeiro, M. O.; Silva, M. S.; Arnold, L. S.; Rostirolla, D. C.; Cafrune, P. I.; Espinoza, R. C.; Palaci, M.; Telles, M. A.; Ritacco, V.; Suffys, P. N.; Lopes, M. L.; Campelo, C. L.; Miranda, S. S.; Kremer, K.; da Silva, P.; Fonseca, L.; Ho, J. L.; Kritski, A. L.; Rossetti, M. L. Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in Mycobacterium tuberculosis clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 39.

114. Wengenack, N. L.; Uhl, J. R.; St. Amand, A. L.; Tomlinson, A. J.; Benson, L. M.; Naylor, S.; Kline, B. C.; Cockerill III, F. R.; Rusnak, F. Recombinant Mycobacterium tuberculosis KatG(S315T) Is a Competent Catalase-Peroxidase with Reduced Activity toward Isoniazid. *J. Infect. Dis.* **1997**, *176*, 722–727.

115. Deemagarn, T.; Carpena, X.; Singh, R.; Wiseman, B.; Fita, I.; Loewen, P. C. Structural characterization of the Ser324Thr variant of the catalase-peroxidase (KatG) from Burkholderia pseudomallei. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 21–28.

116. Teixeira, V. H.; Ventura, C.; Leitão, R.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Martins, F.; Machuqueiro, M. Molecular Details of INH-C 10 Binding to wt KatG and Its S315T Mutant. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 898–909.

117. Brossier, F.; Ene Boudinet, M.; Jarlier, V.; Ephanie Petrella, S.; Sougakoff, W. Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low- and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* **2016**, *100*, 15–24.

118. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W.; Urn, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; Lisle, G. De, Jr, W. R. J.; Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quémard, A. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science* **1994**, *263*, 227–230.

119. Leung, E. T. Y.; Ho, P. L.; Yuen, K. Y.; Woo, W. L.; Lam, T. H.; Kao, R. Y.; Seto, W. H.; Yam, W. C. Molecular Characterization of Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Identification of a Novel Mutation in inhA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1075–1078.

120. Abe, C.; Kobayashi, I.; Mitarai, S.; Wada, M.; Kawabe, Y.; Takashima, T.; Suzuki, K.; Sng, L.-H.; Wang, S.; Htay, H. H.; Ogata, H. Biological and Molecular Characteristics of Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates with Low-Level Resistance to Isoniazid in

Japan. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2263–2268.

121. Ando, H.; Miyoshi-Akiyama, T.; Watanabe, S.; Kirikae, T. A silent mutation in *mabA* confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **2014**, *91*, 538–547.

122. Ramaswamy, S.; Musser, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber. Lung Dis.* **1998**, *79*, 3–29.

123. Sherman, D. R.; Mdluli, K.; Hickey, M. J.; Arain, T. M.; Morris, S. L.; Barry, C. E.; Stover, C. K. Compensatory *ahpC* Gene Expression in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1996**, *272*, 1641–1643.

124. Johnson, R.; Streicher, E. M.; Louw, G. E.; Warren, R. M.; van Helden, P. D.; Victor, T. C. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2006**, *8*, 97–111.

125. Vilchèze, C.; Weisbrod, T. R.; Chen, B.; Kremer, L.; Hazbon, M. H.; Wang, F.; Alland, D.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R. Altered NADH/NAD⁺ Ratio Mediates Coresistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 708–720.

126. Xu, X.; Vilchèze, C.; Av-Gay, Y.; Gómez-Velasco, A.; Jacobs, W. R. Precise null deletion mutations of the mycothiol synthesis genes reveal their role in isoniazid and ethionamide resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 3133–3139.

127. Ramaswamy, S. V.; Reich, R.; Dou, S.-J.; Jasperse, L.; Pan, X.; Wanger, A.; Quitugua, T.; Graviss, E. A. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1241–1250.

128. Machado, D.; Couto, I.; Perdigão, J.; Rodrigues, L.; Portugal, I.; Baptista, P.; Veigas, B.; Amaral, L.; Viveiros, M. Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **2012**, *7*, e34538.

129. Li, G.; Zhang, J.; Guo, Q.; Jiang, Y.; Wei, J.; Zhao, L.; Zhao, X.; Lu, J.; Wan, K. Efflux Pump Gene Expression in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *PLoS One* **2015**, *10*, e0119013.

130. Vale, N.; Gomes, P.; Santos, H. a Metabolism of the antituberculosis drug ethionamide. *Curr. Drug Metab.* **2013**, *14*, 151–158.

131. Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 73–78.

132. Henderson, M. C.; Siddens, L. K.; Morr e, J. T.; Krueger, S. K.; Williams, D. E. Metabolism of the anti-tuberculosis drug ethionamide by mouse and human FMO1, FMO2 and FMO3 and mouse and human lung microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *233*, 420–7.

133. Dover, L. G.; Alahari, A.; Gratraud, P.; Gomes, J. M.; Bhowruth, V.; Reynolds, R. C.; Besra, G. S.; Kremer, L. EthA, a common activator of thiocarbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1055–1063.
134. Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; Brennan, P. J.; Locht, C.; Besra, G. S. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28326–28331.
135. DeBarber, A. E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L.-G. G.; Barry, C. E.; Barry Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 9677–9682.
136. Vannelli, T. a; Dykman, A.; Ortiz de Montellano, P. R. The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12824–12829.
137. Fraaije, M. W.; Kamerbeek, N. M.; Heidekamp, A. J.; Fortin, R.; Janssen, D. B. The prodrug activator EtaA from Mycobacterium tuberculosis is a Baeyer-Villiger monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3354–3360.
138. van Berkel, W. J. H.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 670–689.
139. Phillips, I.; Shephard, E. Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 294–301.
140. Engohang-Ndong, J.; Baillat, D.; Aumercier, M.; Bellefontaine, F.; Besra, G. S.; Locht, C.; Baulard, A. R. EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol. Microbiol.* **2004**, *51*, 175–188.
141. Grant, S. S.; Wellington, S.; Kawate, T.; Desjardins, C. A.; Silvis, M. R.; Wivagg, C.; Thompson, M.; Gordon, K.; Kazysanskaya, E.; Nietupski, R.; Haseley, N.; Iwase, N.; Earl, A. M.; Fitzgerald, M.; Hung, D. T. Baeyer-Villiger Monooxygenases EthA and MymA Are Required for Activation of Replicating and Non-replicating Mycobacterium tuberculosis Inhibitors. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 666–677.
142. Brossier, F.; Veziris, N.; Truffot-Pernot, C.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Molecular Investigation of Resistance to the Antituberculous Drug Ethionamide in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 355–360.
143. Morlock, G. P.; Metchock, B.; Sikes, D.; Crawford, J. T.; Cooksey, R. C. ethA, inhA, and katG Loci of Ethionamide-Resistant Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3799–3805.
144. Frénois, F.; Engohang-Ndong, J.; Locht, C.; Baulard, A. R.; Villeret, V. Structure of EthR in a Ligand Bound Conformation Reveals Therapeutic Perspectives against Tuberculosis. *Mol. Cell* **2004**, *16*, 301–307.
145. Frénois, F.; Baulard, A. R.; Villeret, V. Insights into mechanisms of induction and

ligands recognition in the transcriptional repressor EthR from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **2006**, *86*, 110–114.

146. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Dirié, B.; Carette, X.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Demirkaya, F.; Lens, Z.; Rucktooa, P.; Villeret, V.; Christophe, T.; Jeon, H. K.; Locht, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N. Ethionamide Boosters: Synthesis, Biological Activity, and Structure–Activity Relationships of a Series of 1,2,4-Oxadiazole EthR Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2994–3010.

147. Phetsuksiri, B.; Baulard, A. R.; Cooper, A. M.; Minnikin, D. E.; Douglas, J. D.; Besra, G. S.; Brennan, P. J. Antimycobacterial Activities of Isoxyl and New Derivatives through the Inhibition of Mycolic Acid Synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1042–1051.

148. Belardinelli, J. M.; Morbidoni, H. R. Mutations in the essential FAS II β -hydroxyacyl ACP dehydratase complex confer resistance to thiacetazone in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. *Mol. Microbiol.* **2012**, *86*, 568–579.

149. Qian, L.; Ortiz de Montellano, P. R. Oxidative Activation of Thiacetazone by the *Mycobacterium tuberculosis* Flavin Monooxygenase EtaA and Human FMO1 and FMO3. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 443–449.

150. Nishida, C. R.; Ortiz de Montellano, P. R. Bioactivation of antituberculosis thioamide and thiourea prodrugs by bacterial and mammalian flavin monooxygenases. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *192*, 21–25.

151. Grzegorzewicz, A. E.; Eynard, N.; Quémard, A.; North, E. J.; Margolis, A.; Lindenberger, J. J.; Jones, V.; Korduláková, J.; Brennan, P. J.; Lee, R. E.; Ronning, D. R.; McNeil, M. R.; Jackson, M. Covalent Modification of the *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II Dehydratase by Isoxyl and Thiacetazone. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 91–97.

152. Kordulakova, J.; Janin, Y. L.; Liav, A.; Barilone, N.; Dos Vultos, T.; Rauzier, J.; Brennan, P. J.; Gicquel, B.; Jackson, M. Isoxyl Activation Is Required for Bacteriostatic Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3824–3829.

153. Vilchèze, C.; Av-Gay, Y.; Attarian, R.; Liu, Z.; Hazbón, M. H.; Colangeli, R.; Chen, B.; Liu, W.; Alland, D.; Sacchetti, J. C.; Jacobs Jr, W. R. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **2008**, *69*, 1316–1329.

154. Grzegorzewicz, A. E.; Korduláková, J.; Jones, V.; Born, S. E. M.; Belardinelli, J. M.; Vaquié, A.; Gundi, V. a K. B.; Madacki, J.; Slama, N.; Laval, F.; Vaubourgeix, J.; Crew, R. M.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Morbidoni, H. R.; Brennan, P. J.; Quémard, A.; McNeil, M. R.; Jackson, M. A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 38434–38441.

155. Gannoun-Zaki, L.; Alibaud, L.; Kremer, L. Point Mutations within the Fatty Acid Synthase Type II Dehydratase Components HadA or HadC Contribute to Isoxyl Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 629–632.

156. Coxon, G. D.; Craig, D.; Corrales, R. M.; Vialla, E.; Gannoun-Zaki, L.; Kremer, L.; Herrmann, J. L. Synthesis, Antitubercular Activity and Mechanism of Resistance of Highly Effective Thiacetazone Analogues. *PLoS One* **2013**, *8*, e53162.
157. Sacco, E.; Covarrubias, A. S.; O'Hare, H. M.; Carroll, P.; Eynard, N.; Jones, T. A.; Parish, T.; Daffe, M.; Backbro, K.; Quemard, A. The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 14628–14633.
158. Alahari, A.; Trivelli, X.; Guérardel, Y.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Sacchetti, J. C.; Reynolds, R. C.; Coxon, G. D.; Kremer, L. Thiacetazone, an Antitubercular Drug that Inhibits Cyclopropanation of Cell Wall Mycolic Acids in *Mycobacteria*. *PLoS One* **2007**, *2*, e1343.
159. Phetsuksiri, B.; Jackson, M.; Scherman, H.; McNeil, M.; Besra, G. S.; Baulard, A. R.; Slayden, R. A.; DeBarber, A. E.; Barry, C. E.; Baird, M. S.; Crick, D. C.; Brennan, P. J. Unique Mechanism of Action of the Thiourea Drug Isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 53123–53130.
160. Alahari, A.; Alibaud, L.; Trivelli, X.; Gupta, R.; Lamichhane, G.; Reynolds, R. C.; Bishai, W. R.; Guérardel, Y.; Kremer, L. Mycolic acid methyltransferase, MmaA4, is necessary for thiacetazone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **2009**, *71*, 1263–1277.
161. Chakraborty, S.; Gruber, T.; Barry, C. E.; Boshoff, H. I.; Rhee, K. Y. Para-Aminosalicylic Acid Acts as an Alternative Substrate of Folate Metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2013**, *339*, 88–91.
162. Zhao, F.; Wang, X.-D.; Erber, L. N.; Luo, M.; Guo, A. -z.; Yang, S. -s.; Gu, J.; Turman, B. J.; Gao, Y. -r.; Li, D. -f.; Cui, Z. -q.; Zhang, Z. -p.; Bi, L. -j.; Baughn, A. D.; Zhang, X.-E.; Deng, J.-Y. Binding Pocket Alterations in Dihydrofolate Synthase Confer Resistance to para-Aminosalicylic Acid in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1479–1487.
163. Nagachar, N.; Ratledge, C. Knocking out salicylate biosynthesis genes in *Mycobacterium smegmatis* induces hypersensitivity to p-aminosalicylate (PAS). *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *311*, 193–199.
164. Adilakshmi, T.; Ayling, P. D.; Ratledge, C. Mutational Analysis of a Role for Salicylic Acid in Iron Metabolism of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 264–271.
165. Gobin, J.; Moore, C. H.; Reeve, J. R.; Wong, D. K.; Gibson, B. W.; Horwitz, M. A. Iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis*: isolation and characterization of a family of iron-binding exochelins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 5189–5193.
166. Fivian-Hughes, A. S.; Houghton, J.; Davis, E. O. *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate synthase gene *thyX* is essential and potentially bifunctional, while *thyA* deletion confers resistance to p-aminosalicylic acid. *Microbiology* **2012**, *158*, 308–318.
167. Ramon-Garcia, S.; Mick, V.; Dainese, E.; Martin, C.; Thompson, C. J.; De Rossi, E.; Manganello, R.; Ainsa, J. A. Functional and Genetic Characterization of the Tap Efflux

Pump in *Mycobacterium bovis* BCG. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2074–2083.

168. Siddiqi, N.; Pathak, N.; Banerjee, S.; Ahmed, N.; Katoch, V. M.; Hasnain, S. E.; Das, R. *Mycobacterium tuberculosis* Isolate with a Distinct Genomic Identity Overexpresses a Tap-Like Efflux Pump. *Infection* **2004**, *32*, 109–111.

169. Calgin, M. K.; Sahin, F.; Turegun, B.; Gerceker, D.; Atasever, M.; Koksall, D.; Karasartova, D.; Kiyani, M. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and reference strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *76*, 291–297.

170. Zhang, Y.; Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2003**, *7*, 6–21.

171. Vandal, O. H.; Nathan, C. F.; Ehrt, S. Acid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 4714–4721.

172. Njire, M.; Tan, Y.; Mugweru, J.; Wang, C.; Guo, J.; Yew, W.; Tan, S.; Zhang, T. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Adv. Med. Sci.* **2016**, *61*, 63–71.

173. Zhang, Y.; Permar, S.; Sun, Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Med. Microbiol.* **2002**, *51*, 42–49.

174. Via, L. E.; Savic, R.; Weiner, D. M.; Zimmerman, M. D.; Prideaux, B.; Irwin, S. M.; Lyon, E.; O'Brien, P.; Gopal, P.; Eum, S.; Lee, M.; Lanoix, J.-P.; Dutta, N. K.; Shim, T.; Cho, J. S.; Kim, W.; Karakousis, P. C.; Lenaerts, A.; Nuermberger, E.; Barry, C. E.; Dartois, V. Host-Mediated Bioactivation of Pyrazinamide: Implications for Efficacy, Resistance, and Therapeutic Alternatives. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 203–214.

175. Almeida Da Silva, P. E. A.; Palomino, J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 1417–30.

176. Raynaud, C.; Laneelle, M.-A.; Senaratne, R. H.; Draper, P.; Laneelle, G.; Daffe, M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* **1999**, *145*, 1359–1367.

177. Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H.; Sun, Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2044–2049.

178. Stehr, M.; Elamin, A. A.; Singh, M. Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, *13*, 593–603.

179. Sayahi, H.; Zimhony, O.; Jacobs, W. R.; Shekhtman, A.; Welch, J. T. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase i. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4804–4807.

180. Sayahi, H.; Pugliese, K. M.; Zimhony, O.; Jacobs, W. R.; Shekhtman, A.; Welch,

J. T. Analogs of the Antituberculous Agent Pyrazinamide Are Competitive Inhibitors of NADPH Binding to M. tuberculosis Fatty Acid Synthase I. *Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 2582–2596.

181. Zimhony, O.; Vilchèze, C.; Arai, M.; Welch, J. T.; Jacobs, W. R. Pyrazinoic Acid and Its n-Propyl Ester Inhibit Fatty Acid Synthase Type I in Replicating Tubercle Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 752–754.

182. Kim, H.; Shibayama, K.; Rimbara, E.; Mori, S. Biochemical Characterization of Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv and Inhibition of Its Activity by Pyrazinamide. *PLoS One* **2014**, *9*, e100062.

183. Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X.; Yuan, H.; Lee, J. S.; Barry, C. E.; Wang, H.; Zhang, W.; Zhang, Y. Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science* **2011**, *333*, 1630–1632.

184. Tan, Y.; Hu, Z.; Zhang, T.; Cai, X.; Kuang, H.; Liu, Y.; Chen, J.; Yang, F.; Zhang, K.; Tan, S.; Zhao, Y. Role of pncA and rpsA Gene Sequencing in Detection of Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from Southern China. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 291–297.

185. Yang, J.; Liu, Y.; Bi, J.; Cai, Q.; Liao, X.; Li, W.; Guo, C.; Zhang, Q.; Lin, T.; Zhao, Y.; Wang, H.; Liu, J.; Zhang, X.; Lin, D. Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of Mycobacterium tuberculosis by pyrazinamide. *Mol. Microbiol.* **2015**, *95*, 791–803.

186. Shi, W.; Chen, J.; Feng, J.; Cui, P.; Zhang, S.; Weng, X.; Zhang, W.; Zhang, Y. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Emerg. Microbes Infect.* **2014**, *3*, e58.

187. Zhang, S.; Chen, J.; Shi, W.; Liu, W.; Zhang, W.; Zhang, Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Emerg. Microbes Infect.* **2013**, *2*, e34.

188. Boshoff, H. I. M.; Xu, X.; Tahlan, K.; Dowd, C. S.; Pethe, K.; Camacho, L. R.; Park, T. H. T.-H.; Yun, C. S. C.-S.; Schnappinger, D.; Ehrt, S.; Williams, K. J.; Barry, C. E. Biosynthesis and recycling of nicotinamide cofactors in Mycobacterium tuberculosis: An essential role for NAD in nonreplicating bacilli. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 19329–19341.

189. Konno, K.; Feldmann, F. M.; McDermott, W. Pyrazinamide Susceptibility and Amidase Activity of Tubercle Bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1967**, *95*, 461–469.

190. Zhang, H.; Deng, J.-Y.; Bi, L.-J.; Zhou, Y.-F.; Zhang, Z.-P.; Zhang, C.-G.; Zhang, Y.; Zhang, X.-E. Characterization of Mycobacterium tuberculosis nicotinamidase/pyrazinamidase. *FEBS J.* **2008**, *275*, 753–62.

191. Petrella, S.; Gelus-Ziental, N.; Maudry, A.; Laurans, C.; Boudjelloul, R.; Sougakoff, W. Crystal Structure of the Pyrazinamidase of Mycobacterium tuberculosis: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. *PLoS One* **2011**, *6*, e15785.

192. Fyfe, P. K.; Rao, V. A.; Zemla, A.; Cameron, S.; Hunter, W. N. Specificity and Mechanism of Acinetobacter baumannii Nicotinamidase: Implications for Activation of the

Front-Line Tuberculosis Drug Pyrazinamide. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48*, 9176–9179.

193. Seiner, D. R.; Hegde, S. S.; Blanchard, J. S. Kinetics and Inhibition of Nicotinamidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9613–9619.

194. Lemaitre, N.; Callebaut, I.; Frenois, F.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Study of the structure-activity relationships for the pyrazinamidase (PncA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **2001**, *353*, 453–458.

195. Cohen, J. Approval of Novel TB Drug Celebrated-With Restraint. *Science* **2013**, *339*, 130–130.

196. Ryan, N. J.; Lo, J. H. Delamanid: First Global Approval. *Drugs* **2014**, *74*, 1041–1045.

197. Gurumurthy, M.; Mukherjee, T.; Dowd, C. S.; Singh, R.; Niyomrattanakit, P.; Tay, J. A.; Nayyar, A.; Lee, Y. S.; Cherian, J.; Boshoff, H. I.; Dick, T.; Barry, C. E.; Manjunatha, U. H. Substrate specificity of the deazaflavin-dependent nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* responsible for the bioreductive activation of bicyclic nitroimidazoles. *FEBS J.* **2012**, *279*, 113–125.

198. Mohamed, A. E.; Ahmed, F. H.; Arulmozhiraja, S.; Lin, C. Y.; Taylor, M. C.; Krausz, E. R.; Jackson, C. J.; Coote, M. L. Protonation state of F 420 H 2 in the prodrug-activating deazaflavin dependent nitroreductase (Ddn) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. BioSyst.* **2016**, *12*, 1110–1113.

199. Cellitti, S. E.; Shaffer, J.; Jones, D. H.; Mukherjee, T.; Gurumurthy, M.; Bursulaya, B.; Boshoff, H. I.; Choi, I.; Nayyar, A.; Lee, Y. S.; Cherian, J.; Niyomrattanakit, P.; Dick, T.; Manjunatha, U. H.; Barry, C. E.; Spraggon, G.; Geierstanger, B. H. Structure of Ddn, the Deazaflavin-Dependent Nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* Involved in Bioreductive Activation of PA-824. *Structure* **2012**, *20*, 101–112.

200. European Medicines Agency. Delamanid - Delytba. *European Medicines Agency - Assessment Report* **2013**.

201. Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.; Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry, C. E. PA-824 Kills Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by Intracellular NO Release. *Science* **2008**, *322*, 1392–1395.

202. Lewis, J. M.; Sloan, D. J. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2015**, *11*, 779–791.

203. Manjunatha, U. H.; Boshoff, H.; Dowd, C. S.; Zhang, L.; Albert, T. J.; Norton, J. E.; Daniels, L.; Dick, T.; Pang, S. S.; Barry, C. E. Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 431–436.

204. Lorenzo, D.; Mousa, S. A. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Trop.* **2011**, *119*, 5–10.

205. Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *13*, 42–51.
206. Black, P. A.; Warren, R. M.; Louw, G. E.; van Helden, P. D.; Victor, T. C.; Kana, B. D. Energy Metabolism and Drug Efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 2491–2503.
207. da Silva, P. E. A.; Von Groll, A.; Martin, A.; Palomino, J. C. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Table 1. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2011**, *63*, 1–9.
208. Rossi, E. De; Aínsa, J. A.; Riccardi, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 36–52.
209. Hartkoorn, R. C.; Uplekar, S.; Cole, S. T. Cross-Resistance between Clofazimine and Bedaquiline through Upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 2979–2981.
210. Hugonnet, J.-E.; Blanchard, J. S. Irreversible Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* β -Lactamase by Clavulanate. *Biochemistry* **2007**, *46*, 11998–12004.
211. Leclercq, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34*, 482–492.
212. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Villemagne, B.; Blondiaux, N.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Mathys, V.; Flament, M.-P.; Siepmann, J.; Villeret, V.; Wohlkönig, A.; Wintjens, R.; Soror, S. H.; Christophe, T.; Jeon, H. K.; Loch, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N. Ethionamide boosters. 2. Combining bioisosteric replacement and structure-based drug design to solve pharmacokinetic issues in a series of potent 1,2,4-oxadiazole EthR inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 68–83.
213. Flipo, M.; Willand, N.; Lecat-Guillet, N.; Hounsou, C.; Desroses, M.; Leroux, F.; Lens, Z.; Villeret, V.; Wohlkönig, A.; Wintjens, R.; Christophe, T.; Kyoung Jeon, H.; Loch, C.; Brodin, P.; Baulard, A. R.; Déprez, B. Discovery of novel N-phenylphenoxyacetamide derivatives as EthR inhibitors and ethionamide boosters by combining high-throughput screening and synthesis. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6391–6402.
214. Willand, N.; Deprez, B.; Baulard, A. R.; Brodin, P.; Flipo, M.; Maingot, L. Saturated nitrogen and N-acylated heterocycles potentiating the activity of an active antibiotic against mycobacteria. *Patent* **2014**, WO 2014/096378 A1.
215. Deprez, B.; Willand, N.; Flipo, M.; Desroses, M.; Baulard, A. R.; Leroux, F. Compounds having an EthR inhibiting activity - Use of said compounds as drugs - Pharmaceutical composition and product containing said compounds. *Patent* **2013**, WO 2013/060744 A2.
216. Leiba, J.; Carrère-Kremer, S.; Blondiaux, N.; Dimala, M. M.; Wohlkönig, A.; Baulard, A. R.; Kremer, L.; Molle, V. The *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional repressor EthR is negatively regulated by Serine/Threonine phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 1132–1138.
217. Pym, A. S.; Domenech, P.; Honore, N.; Song, J.; Deretic, V.; Cole, S. T.

Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Microbiol.* **2001**, *40*, 879–889.

218. Zahrt, T. C.; Song, J.; Siple, J.; Deretic, V. Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene katG. *Mol. Microbiol.* **2004**, *39*, 1174–1185.

219. Niki, M.; Niki, M.; Tateishi, Y.; Ozeki, Y.; Kirikae, T.; Lewin, A.; Inoue, Y.; Matsumoto, M.; Dahl, J. L.; Ogura, H.; Kobayashi, K.; Matsumoto, S. A Novel Mechanism of Growth Phase-dependent Tolerance to Isoniazid in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27743–27752.

220. Li, Q.; Fu, T.; Li, C.; Fan, X.; Xie, J. Mycobacterial IclR family transcriptional factor Rv2989 is specifically involved in isoniazid tolerance by regulating the expression of catalase encoding gene katG. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 54661–54667.

221. Parikh, S. L.; Xiao, G.; Tonge, P. J. Inhibition of InhA, the Enoyl Reductase from Mycobacterium tuberculosis, by Triclosan and Isoniazid. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7645–7650.

222. Sullivan, T. J.; Truglio, J. J.; Boyne, M. E.; Novichenok, P.; Zhang, X.; Stratton, C. F.; Li, H.-J.; Kaur, T.; Amin, A.; Johnson, F.; Slayden, R. A.; Kisker, C.; Tonge, P. J. High Affinity InhA Inhibitors with Activity against Drug-Resistant Strains of Mycobacterium tuberculosis. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 43–53.

223. Tonge, P. J.; Sullivan, T. J.; Johnson, F. Diphenyl ether antimicrobial compounds. *Patent* **2006**, WO 2006 137840.

224. Broussy, S.; Bernardes-Génisson, V.; Quémard, A.; Meunier, B.; Bernadou, J. The First Chemical Synthesis of the Core Structure of the Benzoylhydrazine–NAD Adduct, a Competitive Inhibitor of the Mycobacterium tuberculosis Enoyl Reductase. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10502–10510.

225. Delaine, T.; Bernardes-Génisson, V.; Quémard, A.; Constant, P.; Meunier, B.; Bernadou, J. Development of isoniazid-NAD truncated adducts embedding a lipophilic fragment as potential bi-substrate InhA inhibitors and antimycobacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4554–61.

226. Bonnac, L.; Gao, G.; Chen, L.; Felczak, K.; Bennett, E. M.; Xu, H.; Kim, T.; Liu, N.; Oh, H.; Tonge, P. J.; Pankiewicz, K. W. Synthesis of 4-phenoxybenzamide adenine dinucleotide as NAD analogue with inhibitory activity against enoyl-ACP reductase (InhA) of Mycobacterium tuberculosis. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 4588–4591.

227. Kuo, M. R.; Morbidoni, H. R.; Alland, D.; Sneddon, S. F.; Gourlie, B. B.; Staveski, M. M.; Leonard, M.; Gregory, J. S.; Janjigian, A. D.; Yee, C.; Musser, J. M.; Kreiswirth, B.; Iwamoto, H.; Perozzo, R.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C.; Fidock, D. A. Targeting Tuberculosis and Malaria through Inhibition of Enoyl Reductase. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20851–20859.

228. He, X.; Alian, A.; Stroud, R.; Ortiz de Montellano, P. R. Pyrrolidine Carboxamides as a Novel Class of Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase from Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6308–6323.

229. Wall, M. D.; Oshin, M.; Chung, G. A. C.; Parkhouse, T.; Gore, A.; Herreros, E.;

Cox, B.; Duncan, K.; Evans, B.; Everett, M.; Mendoza, A. Evaluation of N-(phenylmethyl)-4-[5-(phenylmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl]benzamide inhibitors of Mycobacterium tuberculosis growth. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2740–2744.

230. Shirude, P. S.; Madhavapeddi, P.; Naik, M.; Murugan, K.; Shinde, V.; Nandishaiah, R.; Bhat, J.; Kumar, A.; Hameed, S.; Holdgate, G.; Davies, G.; McMiken, H.; Hegde, N.; Ambady, A.; Venkatraman, J.; Panda, M.; Bhandodkar, B.; Sambandamurthy, V. K.; Read, J. A. Methyl-Thiazoles: A Novel Mode of Inhibition with the Potential to Develop Novel Inhibitors Targeting InhA in Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8533–8542.

231. Chollet, A.; Stigliani, J.-L.; Pasca, M. R.; Mori, G.; Lherbet, C.; Constant, P.; Quémard, A.; Bernadou, J.; Pratviel, G.; Bernardes-Génisson, V. Evaluation of the inhibitory activity of (aza)isoindolinone-type compounds: toward in vitro InhA action, Mycobacterium tuberculosis growth and mycolic acid biosynthesis. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, DOI: 10.1111/cbdd.12804.

232. Deraeve, C.; Dorobantu, I. M.; Rebbah, F.; Le Quémener, F.; Constant, P.; Quémard, A.; Bernardes-Génisson, V.; Bernadou, J.; Pratviel, G. Chemical synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship analysis of azaisoindolinones, a novel class of direct enoyl-ACP reductase inhibitors as potential antimycobacterial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6225–32.

233. Šink, R.; Sosič, I.; Živec, M.; Fernandez-Menendez, R.; Turk, S.; Pajk, S.; Alvarez-Gomez, D.; Lopez-Roman, E. M.; Gonzales-Cortez, C.; Rullas-Triconado, J.; Angulo-Barturen, I.; Barros, D.; Ballell-Pages, L.; Young, R. J.; Encinas, L.; Gobec, S. Design, synthesis, and evaluation of new thiadiazole-based direct inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase (InhA) for the treatment of tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 613–624.

234. Manjunatha, U. H.; S. Rao, S. P.; Kondreddi, R. R.; Noble, C. G.; Camacho, L. R.; Tan, B. H.; Ng, S. H.; Ng, P. S.; Ma, N. L.; Lakshminarayana, S. B.; Herve, M.; Barnes, S. W.; Yu, W.; Kuhen, K.; Blasco, F.; Beer, D.; Walker, J. R.; Tonge, P. J.; Glynne, R.; Smith, P. W.; Diagana, T. T. Direct inhibitors of InhA are active against Mycobacterium tuberculosis. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 269ra3.

235. Hartkoorn, R. C.; Sala, C.; Neres, J.; Pojer, F.; Magnet, S.; Mukherjee, R.; Uplekar, S.; Boy-Röttger, S.; Altmann, K.-H.; Cole, S. T. Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin - nature's isoniazid. *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 1032–1042.

236. Hartkoorn, R. C.; Pojer, F.; Read, J. a; Gingell, H.; Neres, J.; Horlacher, O. P.; Altmann, K.-H.; Cole, S. T. Pyridomycin bridges the NADH- and substrate-binding pockets of the enoyl reductase InhA. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *10*, 96–98.

237. Wengenack, N. L.; Lopes, H.; Kennedy, M. J.; Tavares, P.; Pereira, A. S.; Moura, I.; Moura, J. J. G.; Rusnak, F. Redox Potential Measurements of the Mycobacterium tuberculosis Heme Protein KatG and the Isoniazid-Resistant Enzyme KatG(S315T): Insights into Isoniazid Activation. *Biochemistry* **2000**, *39*, 11508–11513.

238. Wengenack, N. L.; Todorovic, S.; Yu, L.; Rusnak, F. Evidence for Differential Binding of Isoniazid by Mycobacterium tuberculosis KatG and the Isoniazid-Resistant Mutant

KatG(S315T). *Biochemistry* **1998**, *37*, 15825–15834.

239. Martins, F.; Ventura, C.; Santos, S.; Viveiros, M. QSAR Based Design of New Antitubercular Compounds: Improved Isoniazid Derivatives Against Multidrug-Resistant TB. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 4427–4454.

240. Rodrigues-Junior, V. S.; Dos Santos Junior, A.; Dos Santos, A. J.; Schneider, C. Z.; Calixto, J. B.; Sousa, E. H. S.; de França Lopes, L. G.; Souto, A. A.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Campos, M. M. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of Mycobacterium tuberculosis infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *40*, 182–185.

241. Rodrigues-Junior, V. S.; dos Santos Junior, A. A.; Villela, A. D.; Belardinelli, J. M.; Morbidoni, H. R.; Basso, L. A.; Campos, M. M.; Santos, D. S. IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against Mycobacterium tuberculosis in infected macrophages. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, *43*, 82–85.

242. Sousa, E. H. S.; de Mesquita Vieira, F. G.; Butler, J. S.; Basso, L. A.; Santiago, D. S.; Diógenes, I. C. N. N.; Lopes, L. G. de F.; Sadler, P. J. [Fe(CN)₅(isoniazid)]³⁻: An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *140*, 236–244.

243. Johnsson, K.; Schultz, P. G. Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from Mycobacterium tuberculosis. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7425–7426.

244. Quémard, A.; Sacchettini, J. C.; Dessen, A.; Vilchèze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W. R.; Blanchard, J. S. Enzymic Characterization of the Target for Isoniazid in Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8235–8241.

245. Quémard, A.; Dessen, A.; Sugantino, M.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C.; Blanchard, J. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C.; Blanchard, J. S. Binding of Catalase-Peroxidase-Activated Isoniazid to Wild-Type and Mutant Mycobacterium tuberculosis Enoyl-ACP Reductases. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1561–1562.

246. Forbes, L. V.; Furtmüller, P. G.; Khalilova, I.; Turner, R.; Obinger, C.; Kettle, A. J. Isoniazid as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: identification of amine adducts and the influence of superoxide dismutase on their formation. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 949–60.

247. Ventura, C.; Martins, F. Application of Quantitative Structure–Activity Relationships to the Modeling of Antitubercular Compounds. 1. The Hydrazide Family. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 612–624.

248. Palmer, A. L.; Leykam, V. L.; Larkin, A.; Krueger, S. K.; Phillips, I. R.; Shephard, E. a; Williams, D. E. Metabolism and pharmacokinetics of the anti-tuberculosis drug ethionamide in a flavin-containing monooxygenase null mouse. *Pharmaceuticals* **2012**, *5*, 1147–59.

249. Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. Use of Lawesson's Reagent in Organic Syntheses. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5210–5278.

250. Jesberger, M.; Davis, T. P.; Barner, L. Applications of Lawesson's Reagent in

Organic and Organometallic Syntheses. *Synthesis* **2003**, 8, 1929–1958.

251. Krstić, N. M.; Bjelaković, M. S.; Dabović, M. M.; Pavlović, V. D. Thionation of Some α,β -Unsaturated Steroidal Ketones. *Molecules* **2010**, 15, 3462–3477.

252. Lebrini, M.; Bentiss, F.; Lagrenée, M. Rapid synthesis of 2,5-disubstituted 1,3,4-thiadiazoles under microwave irradiation. *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, 42, 991–994.

253. Priebbenow, D. L.; Bolm, C. Recent advances in the Willgerodt–Kindler reaction. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 7870–7880.

254. Thomson, S. P.; Davies, R. T.; Allansin, N. M.; Kuvshinov, A. Antifungal agents. *Patent* **2005**, WO 2005/092304 A2.

255. Yadav, A. a; Patel, D.; Wu, X.; Hasinoff, B. B. Molecular mechanisms of the biological activity of the anticancer drug elesclomol and its complexes with Cu(II), Ni(II) and Pt(II). *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 126, 1–6.

256. Bharty, M. K.; Bharti, A.; Dani, R. K.; Kushawaha, S. K.; Dulare, R.; Singh, N. K. Studies on novel Cu(II) complexes of 5-(4-hydroxy-phenyl)-1,3,4-thiadiazole-2-thiol and 5-thiophen-2-yl-3H-1,3,4-oxadiazole-2-thione: Synthesis, spectral and structural characterization. *Polyhedron* **2012**, 41, 52–60.

257. Cho, D.; Ahn, J.; De Castro, K. A.; Ahn, H.; Rhee, H. P4S10/dimethicone tandem: efficient reagent for thionation of various aromatic amides and esters. *Tetrahedron* **2010**, 66, 5583–5588.

258. Polshettiwar, V.; Kaushik, M. P. A new, efficient and simple method for the thionation of ketones to thioketones using P4S10/Al2O3. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6255–6257.

259. Polshettiwar, V.; Kaushik, M. P. Alumina encapsulated phosphorus pentasulfide (P4S10/Al2O3) mediated efficient thionation of long chain amides. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2315–2317.

260. Charette, A. B.; Grenon, M. Mild method for the conversion of amides to thioamides. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5792–5794.

261. Kaboudin, B.; Yarahmadi, V.; Kato, J.; Yokomatsu, T. A simple and novel method for the direct conversion of carboxylic acids into thioamides. *RSC Adv.* **2013**, 3, 6435–6441.

262. Nguyen, T. B.; Ermolenko, L.; Al-Mourabit, A. Efficient and selective multicomponent oxidative coupling of two different aliphatic primary amines into thioamides by elemental sulfur. *Org. Lett.* **2012**, 14, 4274–7.

263. Ray, S.; Bhaumik, A.; Dutta, A.; Butcher, R. J.; Mukhopadhyay, C. A new application of rhodanine as a green sulfur transferring agent for a clean functional group interconversion of amide to thioamide using reusable MCM-41 mesoporous silica. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 2164–2170.

264. Jablonski, J. J.; Basu, D.; Engel, D. a; Geysen, H. M. Design, synthesis, and evaluation of novel small molecule inhibitors of the influenza virus protein NS1. *Bioorg.*

Med. Chem. **2012**, *20*, 487–497.

265. Valade, E.; Thibault, F. M.; Biot, F. V.; Vidal, D. R. Burkholderia pseudomallei : une bactérie à ne pas méconnaître. *Rev. Francoph. des Lab.* **2009**, *2009*, 49–55.

266. Carpena, X.; Switala, J.; Loprasert, S.; Mongkolsuk, S.; Fita, I.; Loewen, P. C. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the catalase–peroxidase KatG from Burkholderia pseudomallei. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 2184–2186.

267. Tatum, N. J.; Villemagne, B.; Willand, N.; Deprez, B.; Liebeschuetz, J. W.; Baulard, A. R.; Pohl, E. Structural and docking studies of potent ethionamide boosters. *Acta Crystallogr. C.* **2013**, *69*, 1243–50.

268. Carette, X.; Blondiaux, N.; Willery, E.; Hoos, S.; Lecat-Guillet, N.; Lens, Z.; Wohlkonig, A.; Wintjens, R.; Soror, S. H.; Frenois, F.; Dirie, B.; Villeret, V.; England, P.; Lippens, G.; Deprez, B.; Locht, C.; Willand, N.; Baulard, A. R. Structural activation of the transcriptional repressor EthR from Mycobacterium tuberculosis by single amino acid change mimicking natural and synthetic ligands. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 3018–3030.

269. Deprez, B.; Willand, N.; Dirie, B.; Toto, P.; Villeret, V.; Locht, C.; Baulard, A. R. Composés à effet potentialisateur de l'activité de l'éthionamide et leurs applications. *Patent* **2008**, WO 2008/003861 A1.

270. Kapetanaki, S. M.; Zhao, X.; Yu, S.; Magliozzo, R. S.; Schelvis, J. P. M. Modification of the active site of Mycobacterium tuberculosis KatG after disruption of the Met–Tyr–Trp cross-linked adduct. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 422–433.

271. Tong, J.; Dang, X.-J.; Li, H.-L. Electrochemical oxidation of isoniazid catalyzed by the 2,2,6,6,-tetramethyl-4-acetylpiperidine-1-oxy radical and its analytical application. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 165–168.

272. Hansen, E. B.; Dooley, K. L.; Thompson, H. C. High-performance liquid chromatographic analysis of the antituberculosis drugs aconiazide and isoniazid. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1995**, *670*, 259–266.

273. Er-Kang, W.; Wei-Hong, Z. Determination of isoniazid and hydrazine by capillary electrophoresis with amperometric detection at a Pt-particle modified carbon fiber microelectrode. *Chinese J. Chem.* **1996**, *14*, 131–137.

274. Hammam, E.; Beltagi, A. ; Ghoneim, M. . Voltammetric assay of rifampicin and isoniazid drugs, separately and combined in bulk, pharmaceutical formulations and human serum at a carbon paste electrode. *Microchem. J.* **2004**, *77*, 53–62.

275. Atta, N. F.; Galal, A.; Abu-Attia, F. M.; Azab, S. M. Characterization and electrochemical investigations of micellar/drug interactions. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 2510–2517.

276. Gaussian 09, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonne, and D. J. F. R. D. Gaussian 09. *Inc., Wallingford CT* **2013**.

277. Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
278. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
279. Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Can. J. Phys.* **1980**, *58*, 1200–1211.
280. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3094.
281. Wiberg, K. B. Application of the pople-santry-segal CNDO method to the cyclopropylcarbiny and cyclobutyl cation and to bicyclobutane. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1083–1096.
282. Foster, J. P.; Weinhold, F. Natural hybrid orbitals. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7211–7218.
283. NBO 6.0. E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, C. R. Landis, and F. Weinhold, NBO 6.0. E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, C. R. Landis, and F. W. NBO 6.0. *Theor. Chem. Institute, Univ. Wisconsin, Madison* **2013**.
284. Tissandier, M. D.; Cowen, K. A.; Feng, W. Y.; Gundlach, E.; Cohen, M. H.; Earhart, A. D.; Coe, J. V.; Tuttle, T. R. The Proton's Absolute Aqueous Enthalpy and Gibbs Free Energy of Solvation from Cluster-Ion Solvation Data. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 7787–7794.
285. André, D. Électrochimie appliquée - Caractérisations des systèmes électrochimiques. *Tech. l'ingénieur Propriétés électriques électrochimiques* **2010**, *K 800 V2*.
286. Paloque, L.; Verhaeghe, P.; Casanova, M.; Castera-Ducros, C.; Dumètre, A.; Mbatchi, L.; Hutter, S.; Kraiem-M'Rabet, M.; Laget, M.; Remusat, V.; Rault, S.; Rathelot, P.; Azas, N.; Vanelle, P. Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 75–86.
287. Martins, F.; Santos, S.; Ventura, C.; Elvas-Leitao, R.; Santos, L.; Vitorino, S.; Reis, M.; Miranda, V.; Correia, H. F.; Aires-De-Sousa, J.; Kovalishyn, V.; Latino, D. A. R. S.; Ramos, J.; Viveiros, M. Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 119–138.
288. Metcalfe, C.; Macdonald, I. K.; Murphy, E. J.; Brown, K. A.; Raven, E. L.; Moody, P. C. E. The Tuberculosis Prodrug Isoniazid Bound to Activating Peroxidases. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6193–6200.
289. Colin, J.; Wiseman, B.; Switala, J.; Loewen, P. C.; Ivancich, A. Distinct role of specific tryptophans in facilitating electron transfer or as [Fe(IV)=O Trp(*)] intermediates in the peroxidase reaction of *Bulkholderia pseudomallei* catalase-peroxidase: a multifrequency EPR spectroscopy investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8557–8563.

290. Todorović, S.; Juranić, N.; Macura, S.; Rusnak, F. Binding of 15 N-Labeled Isoniazid to KatG and KatG(S315T): Use of Two-Spin [zz]-Order Relaxation Rate for 15 N-Fe Distance Determination. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10962–10966.
291. Singh, R.; Switala, J.; Loewen, P. C.; Ivancich, A. Two [Fe(IV)=O Trp*] intermediates in M. tuberculosis catalase-peroxidase discriminated by multifrequency (9-285 GHz) EPR spectroscopy: reactivity toward isoniazid. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15954–63.
292. Giannola, L. I.; Giammona, G.; Alotta, R. Pro-drugs of isoniazid: synthesis and diffusion characteristics of acyl derivatives. *Pharmazie* **1992**, *47*, 423–5.
293. Naveen Kumar, H. S.; Parumasivam, T.; Ibrahim, P.; Asmawi, M. Z.; Sadikun, A. Synthesis of hydrophobic N-acylated isonicotinic acid hydrazide derivatives as potential enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) inhibitors. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 1267–1277.
294. Augustynowicz-Kopec, E.; Zwolska, Z. Bioavailability factors of isoniazid in fast and slow acetylators, healthy volunteers. *Acta Pol. Pharm.* **2002**, *59*, 452–457.
295. Augustynowicz-Kopec, E.; Zwolska, Z. The type of isoniazid acetylation in tuberculosis patients treated at National Tuberculosis and Lung Diseases Research Institute. *Acta Pol. Pharm.* **2002**, *59*, 443–447.
296. Kumar, A.; Patel, G.; Menon, S. K. Fullerene Isoniazid Conjugate - A Tuberculostat with Increased Lipophilicity: Synthesis and Evaluation of Antimycobacterial Activity. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *73*, 553–557.
297. Chang, G.; Spencer, R. H.; Lee, A. T.; Barclay, M. T.; Rees, D. C. Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **1998**, *282*, 2220–2226.
298. Rastogi, N.; Goh, K. S. Action of 1-isonicotinyl-2-palmitoyl hydrazine against the Mycobacterium avium complex and enhancement of its activity by m-fluorophenylalanine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 2061–2064.
299. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
300. Oliveira, J. S.; Sousa, E. H. S.; Basso, L. a; Palaci, M.; Dietze, R.; Santos, D. S.; Moreira, I. S. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from Mycobacterium tuberculosis. *Chem. Commun.* **2004**, 312–3.
301. Oliveira, J. S.; de Sousa, E. H. S.; de Souza, O. N.; Moreira, I. S.; Santos, D. S. D.; Basso, L. A.; Moreira, Icaro; Santos, D. S. D.; Basso, L. A. Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from Mycobacterium tuberculosis by an inorganic complex. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2409–24.
302. Basso, L. A.; Schneider, C. Z.; Santos, A. J. A. B. dos; Santos Jr, A. A. dos; Campos, M. M.; Souto, A. A.; Santos, D. S. An inorganic complex that inhibits Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1384–1389.

303. Sousa, E. H. S.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Diógenes, I. C. N.; Longhinotti, E.; Lopes, L. G. D. F.; Moreira, I. D. S.; De França Lopes, L. G.; De Sousa Moreira, Í. Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 275–283.
304. Youatt, J. The metabolism of isoniazid and other hydrazides by mycobacteria. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **1960**, *38*, 245–50.
305. Youatt, J. The metabolism of isoniazid and pyridine aldehydes by Mycobacteria. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **1962**, *40*, 191–196.
306. Youatt, J. A Review of the Action of Isoniazid. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1969**, *99*, 729–749.
307. Buettner, G. R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, *3*, 259–303.
308. Timmins, G. S.; Deretic, V. Mechanisms of action of isoniazid. *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 1220–1227.
309. Ito, K.; Yamamoto, K.; Kawanishi, S. Manganese-mediated oxidative damage of cellular and isolated DNA by isoniazid and related hydrazines: non-Fenton-type hydroxyl radical formation. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11606–11613.
310. Sinha, B. K. Enzymatic Activation of Hydrazine Derivatives. A spin-trapping study. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 796–801.
311. Sipe, H. J.; Jaszewski, A. R.; Mason, R. P. Fast-flow EPR spectroscopic observation of the isoniazid, iproniazid, and phenylhydrazine hydrazyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 226–33.
312. Wilming, M.; Johnsson, K. Spontaneous formation of the bioactive form of the tuberculosis drug isoniazid. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, *38*, 2588–2590.
313. Nguyen, M.; Claparols, C.; Bernadou, J.; Meunier, B. A fast and efficient metal-mediated oxidation of isoniazid and identification of isoniazid-NAD(H) adducts. *Chembiochem* **2001**, *2*, 877–83.
314. Broussy, S.; Bernardes-Génisson, V.; Coppel, Y.; Quémard, A.; Bernadou, J.; Meunier, B. ¹H and ¹³C NMR characterization of pyridinium-type isoniazid–NAD adducts as possible inhibitors of InhA reductase of Mycobacterium tuberculosis. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 670–673.
315. Bodiguel, J.; Nagy, J. M.; Brown, K. A.; Jamart-Grégoire, B. Oxidation of Isoniazid by Manganese and Mycobacterium tuberculosis Catalase–Peroxidase Yields a New Mechanism of Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3832–3833.
316. Amos, R. I. J.; Schiesser, C. H.; Smith, J. A.; Yates, B. F. Nucleophilic acyl substitution of acyl diimides. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5707–10.
317. Nguyen, M.; Quémard, A.; Marrakchi, H.; Bernadou, J.; Meunier, B. The nonenzymatic activation of isoniazid by Mn III -pyrophosphate in the presence of NADH

produces the inhibition of the enoyl-ACP reductase InhA from *Mycobacterium tuberculosis*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. IIC, Chim.* **2001**, *4*, 35–40.

318. Nguyen, M.; Claparols, C.; Bernadou, J.; Meunier, B. Is the isonicotinoyl radical generated during activation of isoniazid by Mn(III)-pyrophosphate? *Comptes Rendus Chim.* **2002**, *5*, 325–330.

319. Kulkarni, S. D.; Nandibewoor, S. T. A kinetic and mechanistic study on oxidation of Isoniazid drug by alkaline diperiodatocuprate(III) – A free radical intervention. *Transit. Met. Chem.* **2006**, *31*, 1034–1039.

320. Albano, E.; Tomasi, A. Spin Trapping of Free Radical Intermediates Produced During the Metabolism of Isoniazid and Iproniazid in Isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **1987**, *36*, 2913–2920.

321. Augusto, O.; de Montellano, P. R. O.; Quintanilha, A. Spin-trapping of free radicals formed during microsomal metabolism of ethylhydrazine and acetylhydrazine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *101*, 1324–1330.

322. Amos, R. I. J.; Gourlay, B. S.; Yates, B. F.; Schiesser, C. H.; Lewis, T. W.; Smith, J. A. Mechanistic investigation of the oxidation of hydrazides: implications for the activation of the TB drug isoniazid. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 170–176.

323. Laborde, J.; Deraeve, C.; Duhayon, C.; Pratviel, G.; Bernardes-Génisson, V. Ethionamide biomimetic activation and an unprecedented mechanism for its conversion into active and non-active metabolites. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8848–8858.

324. Hanouille, X.; Wieruszkeski, J. M.; Rousselot-Pailley, P.; Landrieu, I.; Baulard, A. R.; Lippens, G. Monitoring of the ethionamide pro-drug activation in mycobacteria by ¹H high resolution magic angle spinning NMR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 452–458.

325. Hanouille, X.; Wieruszkeski, J.-M.; Rousselot-Pailley, P.; Landrieu, I.; Locht, C.; Lippens, G.; Baulard, A. R. Selective intracellular accumulation of the major metabolite issued from the activation of the prodrug ethionamide in mycobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 768–72.

326. Cashman, J. R.; Hanzlik, R. P. Oxidation and other reactions of thiobenzamide derivatives of relevance of their hepatotoxicity. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4645–4650.

327. Francois, A. A.; Nishida, C. R.; Ortiz de Montellano, P. R.; Phillips, I. R.; Shephard, E. A. Human flavin-containing monooxygenase 2.1 catalyzes oxygenation of the antitubercular drugs thiacetazone and ethionamide. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 178–86.

Titre : Pro-drogues antituberculeuses : approches pour lutter contre les résistances et compréhension des mécanismes oxydatifs d'activation.

Résumé : La tuberculose est l'une des maladies infectieuses les plus meurtrières au monde. Malgré l'existence d'un traitement polychimiothérapeutique efficace, le nombre de cas de tuberculose incurable augmente sensiblement en raison de l'apparition de souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes aux traitements de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} intentions actuellement disponibles. Parmi les antibiotiques spécifiques de la tuberculose, nous nous intéressons plus particulièrement, dans le cadre de cette thèse, aux pro-drogues isoniazide et éthionamide. Ces deux médicaments ciblent l'enzyme InhA du *Mycobacterium tuberculosis*, qui est impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne. Les principales résistances de *Mycobacterium tuberculosis* à ces pro-drogues résident en un défaut des enzymes responsables de l'activation de ces médicaments à l'intérieur du pathogène.

Le but de cette thèse est, dans un premier temps, d'étudier différentes approches originales visant à contourner ces résistances. La première stratégie consiste à concevoir des pro-drogues hybrides d'isoniazide et d'éthionamide qui pourraient être activées indifféremment par KatG et EthA. KatG est la catalase-peroxydase responsable de l'activation de l'isoniazide, et EthA la mono-oxygénase à flavine qui active l'éthionamide. Les chances de bio-activation de ces nouvelles molécules seraient donc supérieures même si l'une des deux enzymes est mutée. La deuxième stratégie examinée consiste à synthétiser des molécules capables d'être activées par l'enzyme KatG mutée qui reste fonctionnelle. Nous avons alors préparé des molécules analogues de l'isoniazide qui pourraient être éventuellement reconnues et activées par une KatG mutée montrant une modification du potentiel d'oxydation ou de la structure protéique. La dernière stratégie étudiée consiste à synthétiser des molécules qui ne nécessitent pas d'être activées par une enzyme pour exercer leur action mais simplement par des agents oxydants endogènes. En se basant sur une molécule décrite dans la littérature par nos collaborateurs brésiliens, le complexe d'isoniazide-fer(II) ((isoniazide)pentacyanoferrate(II) de sodium), nous avons synthétisé différents analogues de ce complexe en faisant varier le ligand et avons évalué par RPE leur capacité à générer des radicaux. Cette étude de relation structure-réactivité a permis de mieux comprendre le mécanisme d'activation de ces complexes en présence de H₂O₂. La deuxième partie de cette thèse est consacrée au mécanisme d'activation des pro-drogues isoniazide et éthionamide. Même si ces molécules sont utilisées depuis plus de 50 ans dans le traitement de la tuberculose, leur mécanisme d'activation d'un point de vue chimique est très mal décrit. Dans la mycobactérie, ces pro-drogues, une fois activées, forment un adduit avec le cofacteur NAD(H) donnant ainsi l'inhibiteur ultime de l'enzyme InhA. Dans le cas de l'isoniazide, nous avons utilisé le système biomimétique mis en place dans l'équipe pour étudier son mécanisme d'activation d'un point de vue moléculaire. Dans le cas de l'éthionamide, nous avons développé un système chimique biomimétique qui, pour la première fois, a conduit à la formation de l'adduit éthionamide-NAD⁺ *in vitro*. Grâce au succès de cette approche et à la caractérisation des intermédiaires et métabolites formés, nous avons pu proposer un mécanisme d'oxydation moléculaire de l'éthionamide entièrement original, s'affranchissant de l'intermédiaire clé acide sulfinique évoqué jusque-là dans la littérature sans aucune preuve expérimentale.

Mots clés : Tuberculose, Pro-drogues, Isoniazide, Ethionamide, Résistances, Mécanismes oxydatifs d'activation.

Title: Antitubercular prodrugs: approaches to fight against resistances and understanding of oxidative activation mechanisms.

Resume: Tuberculosis is one of the leading causes of death in the world among infectious diseases. Despite the existence of efficient multidrug treatment, the number of incurable cases of tuberculosis substantially increases due to the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to available 1st-, 2nd- and 3rd-lines-treatments. Among the specific drugs currently employed to treat tuberculosis, we particularly focus on prodrugs (isoniazid and ethionamide) for which resistances mainly result in a default of their activation enzymes inside the pathogen.

The aim of this thesis is, firstly, to study various innovative approaches to overcome the resistance. The first strategy consists in designing hybrid prodrugs, by combination of isoniazid and ethionamide moieties, which could be activated by two different enzymes, KatG and EthA. KatG is the mycobacterial catalase peroxidase enzyme which activates isoniazid, and EthA the flavin monooxygenase responsible of ethionamide activation. Probability of bio-activation of these new molecules would therefore be higher even if one of the two enzymes is mutated. The second strategy discussed herein is the synthesis of molecules able to be activated by mutated KatG enzyme, which remains functional. We synthesized isoniazid derivatives, which might be recognized and activated by a mutated KatG enzyme showing a modification of its oxidation potential or in the protein structure. The last strategy is founded on the development of molecules that do not need to be activated by an enzyme but by a simple chemical oxidation. Based on a molecule described in the literature by our brazilian collaborators, an isoniazid-iron (II) complex (sodium (isoniazid)pentacyanoferrate(II)), we synthesized various analogues of this complex by varying the ligand structure and evaluated by ESR their ability to generate radicals in the presence of H₂O₂. The structure-reactivity relationship analysis led to better understanding of the molecular activation mechanism of these complexes in the presence of H₂O₂.

The second part of this thesis is dedicated to the activation mechanisms of prodrugs isoniazid and ethionamide. Even though these molecules have been used for more than 50 years for the treatment of tuberculosis, their activation mechanism on a molecular point of view is poorly described. In the mycobacterium, once activated these prodrugs form an adduct with the NAD(H) cofactor, leading to the active metabolite. For isoniazid, we used the biomimetic system developed previously by our team to clarify the molecular activation mechanism. For ethionamide, we have developed a biomimetic system which, for the first time, leads to the formation of the ethionamide-NAD⁺ adduct *in vitro*. We used this method to study the molecular oxidation mechanism of ethionamide and to characterize intermediates and metabolites. We finally proposed a completely original mechanism, not involving the sulfinic acid intermediate, which has been mentioned in the literature without any experimental evidence.

Key words: Tuberculosis, Prodrugs, Isoniazid, Ethionamide, Resistances, Oxidative activation mechanisms.