

# THESE DE SABRINA NOEL

## RESUME

Le fer est un élément indispensable à la vie et les bactéries n'échappent pas à cette règle. En milieu carencé en fer, les bactéries excrètent des sidérophores, molécules de faible poids moléculaire capables de complexer le Fe(III). Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia*, bactéries responsables d'infections graves chez les patients atteints de mucoviscidose, excrètent un sidérophore commun : la pyochéline. La pyochéline ferrique est internalisée dans la bactérie par un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs protéines dont FptA, un récepteur spécifique de la membrane externe. Le système d'assimilation du fer pyochéline-dépendant est une cible de choix dans le cadre de nouvelles stratégies antibiotiques. En effet, les molécules développées devraient se révéler actives contre les souches possédant le système de transport du fer pyochéline-dépendant, tout en étant inoffensives pour les espèces bactériennes utiles à l'organisme humain et qui, en général, n'expriment pas ce système. Dans ce contexte, nous avons synthétisé une pyochéline fonctionnalisée en position N3" qui se lie au récepteur FptA et transporte le fer en utilisant la voie de transport pyochéline-dépendante. Cette pyochéline fonctionnalisée a ensuite été utilisée comme motif d'adressage d'antibiotiques de la famille des fluoroquinolones. Ces prodrogues de type « cheval de Troie » devaient accroître l'efficacité de l'antibiotique. Cependant, les conjugués testés sur *P. aeruginosa* n'ont malheureusement pas présenté une activité supérieure à celle des antibiotiques seuls. Les résultats obtenus tendent à montrer que la faible solubilité de nos conjugués et la nature des antibiotiques et du bras espaceur choisis sont à l'origine de cet échec. La synthèse de conjugués entre la pyochéline fonctionnalisée et le groupement fluorescent 4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD) a permis de montrer en revanche que la pyochéline synthétique est bien capable de vectoriser efficacement un xénobiotique à l'intérieur de la cellule bactérienne en utilisant spécifiquement le système de transport du fer pyochéline-dépendant. En parallèle, en nous servant de la structure tridimensionnelle du récepteur FptA de la pyochéline, nous avons conçu et synthétisé des inhibiteurs potentiels de cette protéine membranaire. Au nombre des composés synthétisés, plusieurs se lient fortement à la protéine cible. Néanmoins, aucune de ces molécules n'est parvenue à inhiber le transport du fer en entrant efficacement en compétition avec la pyochéline endogène. Ces molécules ont cependant permis d'affiner la cartographie du site de liaison et d'améliorer nos connaissances des relations structure-activité liant la pyochéline à son récepteur de membrane externe. Ce projet s'est prolongé par la synthèse de l'énantiopyochéline, un sidérophore de *Pseudomonas fluorescens*, mettant ainsi en évidence les fondements structuraux de la stéréospécificité de reconnaissance du récepteur FptA. Enfin, dans le cadre d'un projet parallèle, nous avons développé une nouvelle famille de conjugués en couplant l'ofloxacin, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones, avec des antennes trisaccharidiques. Ces composés, susceptibles d'accroître la solubilité de l'antibiotique en milieu physiologique et d'améliorer son efficacité sur des bactéries pathogènes organisées en biofilm, doivent encore être testés.

**Mots clés** : pyochéline, antibiotique, prodrogue, sonde fluorescente, inhibiteur, énantiopyochéline.

## ABSTRACT

Iron is a crucial element for almost all living beings and bacteria are not exceptions. In iron depleted conditions, bacteria synthesize and excrete low molecular weight iron(III) chelators called siderophores. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* are two pathogenic Gram-negative bacteria responsible of severe infections affecting especially cystic fibrosis affected patients. These two bacteria excrete a common siderophore : the pyochelin. The ferric pyochelin is translocated into bacterial cell using a subtle mechanism involving several proteins including FptA, the outer membrane receptor of pyochelin. The pyochelin-dependant iron uptake is a promising target to develop new antibiotic strategies. Indeed, the molecules designed in this context will be, on one hand, very active against the bacterial strains using pyochelin as a siderophore and, at the other hand, innocuous toward human friendly symbiotic bacteria. In this context, we synthesized a pyochelin analogue functionalized on the N3" position. This analogue binds to the FptA receptor and promote efficiently iron uptake using the pyochelin-dependant iron acquisition pathway. The functionalized pyochelin was then conjugated to fluoroquinolone antibiotics in the frame of a Trojan horse prodrug strategy. However, when tested on *P. aeruginosa* strains, these conjugates did not present a higher biological activity than the antibiotics tested alone. These results were shown to be linked both to the lack of solubility of our conjugates and to the choice of the labile spacer arm connecting the pyochelin and the antibiotics. However, the synthesis of conjugates between the N3" functionalized pyochelin and the 4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD) fluorophore proved that our synthetic siderophore analogue is able to transport efficiently a xenobiotic molecule using the pyochelin-dependant iron uptake system. In parallel, based on the tridimensional structure of the FptA receptor, we designed potential inhibitors of this membrane protein. Among the compounds synthesized several molecules were able to bind efficiently to the target receptor. However none of these molecules was able to inhibit the iron uptake by competition with endogenous pyochelin. Nevertheless, these molecules brought invaluable informations on the structure-activity relationships between the siderophore and its specific outer membrane receptor. In this context, the synthesis of enantiopyochelin, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens*, brought new insights in the structural basis underlying the high stereospecificity of the FptA receptor binding site. Finally, in the frame of a side project, we developed a new family of conjugates between tri-saccharide antennae and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin. These compounds,

designed both to improve the solubility of antibiotic in physiological media and to increase his efficiency against bacteria included into a biofilm, remain to be tested.

**Keywords** : pyochelin, antibiotic, prodrug, fluorescent probe, inhibitor, enantiopyochelin.